

**CONTROLES BIOLÓGICOS Y NO
BIOLÓGICOS DE LAS EMISIONES DE
GASES NITROGENADOS (N₂O Y N₂) EN
SUELOS AGRÍCOLAS Y GANADEROS**

Tesis para optar al grado de:
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

TESISTA:
ESTEBAN A. CIARLO

DIRECTOR:
MARTA E. CONTI (FAUBA)

CONSEJERO DE ESTUDIOS:
GERARDO RUBIO (FAUBA)

JURADO DE TESIS

DIRECTOR DE TESIS:

**MARTA E. CONTI
INGENIERA AGRÓNOMA (FAUBA)
M.Sc. EN CIENCIAS DEL SUELO (UNLP)**

JURADO:

**Ing. Agr. Liliana Picone
M.Sc. en Agronomía**

JURADO:

**Ing. Agr. María Julia Mazzarino
Dra. en Ciencias Agrarias**

JURADO:

**Lic. Amy Austin
Dra. en Ciencias Biológicas**

DEDICATORIA

ESTE TRABAJO DE TESIS ESTÁ DEDICADO A MI MUJER MARÍA DE LOS ANGELES Y A MI HIJO SANTIAGO, QUE SON LOS SOLES QUE ME ILUMINAN LOS PASOS. TAMBIEN A MIS PADRES QUE SON LOS DUEÑOS Y RESPONSABLES DE TODO LO QUE SOY.

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES

A LA ING. MARTA CONTI

AL ING. GERARDO RUBIO

AL ING. NORBERTO BARTOLONI

A LA CÁTEDRA DE EDAFOLOGÍA

A MIS COMPAÑEROS DE RUTA FEDERICO LAGRASSA E IGNACIO CIAMPITTI

A LAS EVALUADORAS

A LA CÁTEDRA DE QUÍMICA ANALÍTICA

A LA CÁTEDRA DE QUÍMICA INORGÁNICA

A LA CÁTEDRA DE BIOQUÍMICA

AL RESTO DE MI FAMILIA Y AMIGOS

AL VOLUNTARIO OLVIDADO...

ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	Página 1
Abstract.....	Página 1
Capítulo 1. Introducción y Metodología General	Página 2
1.a. Problema objeto de la tesis.....	Página 2
1.b. Antecedentes generales existentes.....	Página 2
1.b.1. Óxido nitroso y problemática ambiental.....	Página 2
1.b.2. Óxido nitroso y procesos generadores.....	Página 2
1.b.3. Emisiones de N ₂ O y N ₂ : Tasa N ₂ O/(N ₂ O+N ₂) de las emisiones.....	Página 3
1.b.4. Emisiones de gases nitrogenados y regulación ambiental... ..	Página 4
1.b.5. Emisiones de gases nitrogenados y agricultura	Página 5
1.c. Objetivo general.....	Página 6
1.d. Metodología General.....	Página 7
1.d.1. Muestreo y acondicionamiento de los suelos.....	Página 7
1.d.2. Medición de emisiones de N gaseoso.....	Página 7
1.d.3. Pretratamientos y determinaciones químicas.....	Página 9
1.d.4. Cálculos y análisis estadísticos.....	Página 10
Capítulo 2. Humedad y emisiones de gases nitrogenados.....	Página 11
2.1. Antecedentes, objetivos e hipótesis específicos del capítulo 2: Emisiones de gases nitrogenados y humedad y aireación	Página 11
2.1.1. Antecedentes Específicos.....	Página 11
2.1.1.1. Anegamiento y disponibilidad de O ₂ : denitrificación en suelos anegados.....	Página 11
2.1.1.2. Condiciones de anegamiento y emisiones de N ₂ O y tasa N ₂ O/(N ₂ O+N ₂).....	Página 12
2.1.2. Objetivo específico.....	Página 13
2.1.3. Hipótesis específicas.....	Página 13
2.2. Metodología específica.....	Página 13
2.2.1. Muestreo y acondicionamiento del suelo.....	Página 13
2.2.2. Tratamientos e incubación del suelo.....	Página 14
2.2.3. Pretratamientos y determinaciones químicas.....	Página 14
2.2.4. Cálculos y análisis estadísticos.....	Página 14
2.3. Resultados.....	Página 15
2.3.1. Efecto de la humedad sobre las emisiones de N ₂ O+N ₂ por denitrificación.....	Página 15
2.3.2. Efecto de la humedad sobre las emisiones de N ₂ O y tasa N ₂ O/(N ₂ O+N ₂) de las emisiones.....	Página 16
2.3.3. Relación entre emisiones de gases nitrogenados y variables edáficas.....	Página 17
2.3.4. Figuras.....	Página 19
2.4. Discusión.....	Página 23
2.5. Conclusiones.....	Página 28
Capítulo 3. Manejo de la fertilización nitrogenada y emisiones de gases nitrogenados.....	Página 30
3.1. Antecedentes, objetivos e hipótesis específicos del capítulo 3: Emisiones de gases nitrogenados y manejo de la fertilización nitrogenada	Página 30

3.1.1. Antecedentes Específicos.....	Página 30
3.1.1.1. Fertilización nitrogenada y agricultura.....	Página 30
3.1.1.2. Disponibilidad de N-NO ₃ ⁻ y producción de N ₂ y N ₂ O.....	Página 30
3.1.1.3. Fertilización nitrogenada y emisiones de N ₂ y N ₂ O.....	Página 31
3.1.2. Objetivo específico.....	Página 32
3.1.3. Hipótesis específicas.....	Página 33
3.2. Metodología específica.....	Página 33
3.2.1. Muestreo y acondicionamiento del suelo.....	Página 33
3.2.2. Tratamientos e incubación del suelo.....	Página 33
3.2.3. Pretratamientos y determinaciones químicas.....	Página 34
3.2.4. Cálculos y análisis estadísticos.....	Página 34
3.3. Resultados.....	Página 35
3.3.1. Nitratos y pH del suelo.....	Página 35
3.3.2. Emisiones gaseosas de N.....	Página 36
3.3.3. Relación entre las emisiones gaseosas y las variables edáficas medidas.....	Página 38
3.3.4. Figuras.....	Página 40
3.4. Discusión.....	Página 46
3.5. Conclusiones.....	Página 51
Capítulo 4. Manejo de residuos y emisiones de gases nitrogenados.....	Página 52
4.1. Antecedentes, objetivos e hipótesis específicos del capítulo 4: Emisiones de gases nitrogenados y manejo de los residuos de cultivos.....	Página 52
4.1.1. Antecedentes específicos.....	Página 52
4.1.1.1. Disponibilidad de C y denitrificación.....	Página 52
4.1.1.2. Disponibilidad de C y emisiones de N ₂ O y tasa N ₂ O/(N ₂ O+N ₂).....	Página 52
4.1.1.3. Descomposición de los residuos de un cultivo y emisiones de N ₂ y N ₂ O.....	Página 53
4.1.2. Objetivo específico.....	Página 55
4.1.3. Hipótesis específicas.....	Página 55
4.2. Metodología específica.....	Página 55
4.2.1. Muestreo y acondicionamiento del suelo.....	Página 55
4.2.2. Tratamientos e incubación del suelo.....	Página 56
4.2.2.1. Experimento 1.....	Página 56
4.2.2.2. Experimento 2.....	Página 56
4.2.3. Pretratamientos y determinaciones químicas.....	Página 57
4.2.4. Cálculos y análisis estadísticos.....	Página 57
4.3. Resultados.....	Página 58
4.3.1. Experimento 1.....	Página 58
4.3.1.1. Potencial rédox y contenidos de N-NO ₃ ⁻ del suelo.....	Página 58
4.3.1.2. Emisiones gaseosas de N.....	Página 58

4.3.1.3. Relación entre las emisiones gaseosas y otras variables edáficas.....	Página 60
4.3.2. Experimento 2.....	Página 60
4.3.2.1. Potencial rédox, pH, N-NO ₃ ⁻ y fracciones de C.....	Página 60
4.3.2.2. Emisiones gaseosas de N.....	Página 61
4.3.2.3. Emisiones de CO ₂	Página 63
4.3.2.4. Relación entre las emisiones gaseosas y otras variables edáficas.....	Página 63
4.3.3. Figuras.....	Página 64
4.3.3.1. Figuras Experimento 1.....	Página 64
4.3.3.2. Figuras Experimento 2.....	Página 65
4.4. Discusión.....	Página 70
4.4.1. Experimento 1.....	Página 70
4.4.2. Experimento 2.....	Página 72
4.5. Conclusiones.....	Página 77
Capítulo 5. Tipo de suelo, aplicación de pesticidas y emisiones de gases nitrogenados.....	Página 79
5.1. Antecedentes, objetivos e hipótesis específicos del capítulo 5: Emisiones de gases nitrogenados y aplicación de pesticidas.....	Página 79
5.1.1. Antecedentes específicos.....	Página 79
5.1.1.1. Tipo de suelo y emisiones de gases de N.....	Página 79
5.1.1.2. Uso del suelo, nivel de materia orgánica y emisiones de gases nitrogenados.....	Página 80
5.1.1.3. Efecto de los pesticidas sobre las emisiones de gases nitrogenados.....	Página 81
5.1.2. Objetivo específico.....	Página 83
5.1.3. Hipótesis específicas.....	Página 83
5.2. Metodología específica.....	Página 83
5.2.1. Muestreo y acondicionamiento del suelo.....	Página 83
5.2.2. Tratamientos e incubación del suelo.....	Página 84
5.2.3. Pretratamientos y determinaciones químicas.....	Página 84
5.2.4. Cálculos y análisis estadísticos.....	Página 85
5.3. Resultados.....	Página 85
5.3.1. Emisiones de gases nitrogenados.....	Página 85
5.3.2. Emisiones de CO ₂	Página 87
5.3.3. Carbono orgánico total y soluble, NO ₃ ⁻ y pH.....	Página 87
5.3.4. Figuras.....	Página 89
5.4. Discusión.....	Página 94
5.5. Conclusiones.....	Página 100
Capítulo 6. Conclusiones generales y significado.....	Página 101
6.1. Conclusiones generales e implicancias para estudios futuros.....	Página 101
6.1. Significado.....	Página 107
Capítulo 7. Bibliografía General.....	Página 108

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1.....	Página 14
Tabla 2.2.....	Página 18
Tabla 3.1.....	Página 33
Tabla 3.2.....	Página 39
Tabla 4.1.....	Página 56
Tabla 5.1.....	Página 83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.....	Página 19
Figura 2.2.....	Página 20
Figura 2.3.....	Página 21
Figura 2.4.....	Página 22
Figura 2.5.....	Página 23
Figura 3.1.....	Página 40
Figura 3.2.....	Página 41
Figura 3.3.....	Página 42
Figura 3.4.....	Página 43
Figura 3.5.....	Página 44
Figura 3.6.....	Página 44
Figura 3.7.....	Página 45
Figura 3.8.....	Página 45
Figura 3.9.....	Página 46
Figura 4.1.....	Página 64
Figura 4.2.....	Página 64
Figura 4.3.....	Página 65
Figura 4.4.....	Página 65
Figura 4.5.....	Página 66
Figura 4.6.....	Página 67
Figura 4.7.....	Página 68
Figura 4.8.....	Página 68
Figura 4.9.....	Página 68
Figura 4.10.....	Página 69
Figura 4.11.....	Página 69
Figura 4.12.....	Página 70
Figura 5.1.....	Página 89
Figura 5.2.....	Página 89
Figura 5.3.....	Página 90
Figura 5.4.....	Página 90
Figura 5.5.....	Página 90
Figura 5.6.....	Página 91
Figura 5.7.....	Página 91
Figura 5.8.....	Página 92
Figura 5.9.....	Página 93
Figura 5.10.....	Página 93

Declaración

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no ha sido presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

Esteban A. Ciarlo

Abreviaturas

N: Nitrógeno

C: Carbono

O₂: Oxígeno molecular

N₂O: Gas óxido nitroso

N₂: Gas dinitrógeno

NO: Gas óxido nítrico

NO₃⁻: Nitrato

NO₂⁻: Nitrito

NH₄⁺: Amonio

NH₃: Gas amoníaco

Corg: Carbono orgánico total del suelo

Csol: Carbono orgánico soluble en solución acuosa de K₂SO₄ 0,5M

COP: Carbono orgánico particulado, de tamaño mayor a 53µm

Cmin: Carbono orgánico asociado al mineral o no particulado, de tamaño menor a 53µm

Eh: Potencial Rédox, expresado en mV

WFPS: Porcentaje de la porosidad ocupada por agua (de *water filled porosity space*)

Resumen

La presente tesis plantea el problema de los controles de las emisiones de óxido nitroso (N_2O) y dinitrógeno (N_2) desde suelos agrícolas y ganaderos. El cálculo de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$, que permite concluir acerca del origen o destino del N_2O formado, presenta en la literatura escasa información. El primer ensayo tuvo como objetivo estudiar el efecto de contenidos de humedad crecientes sobre las emisiones de gases nitrogenados. Los ensayos posteriores se refirieron al efecto de diferentes prácticas agrícolas sobre las emisiones de gases de N. En el último ensayo, además, se compararon las emisiones gaseosas desde suelos Argiudoles y Hapludoles. Para todos los experimentos, se extrajeron muestras no disturbadas de suelos con aptitud agrícola dentro de cilindros de PVC. Estos cilindros fueron sometidos a los tratamientos correspondientes, incubados y la acumulación de gases se midió con cromatografía gaseosa. Las emisiones de N_2O fueron máximas con contenidos de humedad de 80-100% WFPS (porcentaje de poros ocupados por agua), donde las condiciones no fueron lo suficientemente reductoras como para completar la reducción del N_2O a N_2 . Las emisiones acumuladas de N_2O y de N_2O+N_2 fueron mayores con aplicaciones de fertilizantes a base de nitratos (NO_3^-) que con aplicaciones de urea, no existiendo en general diferencias en estas emisiones entre aplicaciones únicas o divididas. Ciclos de saturación-secado aumentaron las emisiones de N_2O y de N_2 con respecto a condiciones constantes de humedad, siendo este efecto más relevante con la presencia de residuos susceptibles de atravesar la secuencia descomposición-mineralización-denitrificación. Las mayores emisiones de N_2O y tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$ en los suelos arcillosos con respecto a los suelos arenosos pudo explicarse por mayores niveles medios de $N-NO_3^-$ en los primeros, inhibiendo la actividad óxido nitroso reductasa. Ni las emisiones diarias o acumuladas de N_2O ni de N_2O+N_2 fueron afectadas por la aplicación de pesticidas.

Palabras Clave

Controles, óxido nitroso, dinitrógeno, denitrificación

Abstract

The present thesis outlines the problem of the controls of the emissions of nitrous oxide (N_2O) and dinitrogen (N_2) from agricultural and grassland soils. The calculation of the $N_2O/(N_2O+N_2)$ ratio, is scarcely presented in scientific literature. The first experiment had as objective to study the effect of growing moisture contents on N gaseous emissions. The other experiments referred to the effect of different conditions, as a result of agricultural practices, on the emissions of N gases. In the last experiment, gaseous emissions were also compared from Argiudoll and Hapludoll soils. For all the experiments, undisturbed soil cores of agricultural soils were extracted inside PVC cylinders. These cylinders were subjected to corresponding treatments, incubated, and the accumulation of gases was measured with gas chromatography. Nitrous oxide emissions were maximum at moisture contents of 80-100% WFPS (water filled porosity space), where the conditions were not reductive enough to complete the reduction of N_2O to N_2 . Cumulative N_2O and N_2O+N_2 emissions were greater with applications of nitrate-based fertilizers than with urea applications, generally without differences in these emissions between single or split applications. Saturation-drying cycles increased N_2O and N_2 emissions with regard to constant moisture conditions, being this effect more relevant at the presence of residues capable of going through the sequence decomposition-mineralization-denitrification. The largest emissions in N_2O and ratio $N_2O/(N_2O+N_2)$ ratio in the clayey soils with regard to the sandy soils could be explained by higher mean levels of nitrates, $N-NO_3^-$, in the first ones, inhibiting the activity of the enzyme nitrous oxide-reductase. Neither daily nor cumulative emissions of N_2O or N_2O+N_2 were affected by pesticides application.

Key Words

Controls, nitrous oxide, dinitrogen, denitrification

1. Introducción

1.a. Problema objeto de la tesis

La presente tesis se plantea el problema de las variaciones y controles de las emisiones de gases de nitrógeno gaseoso, óxido nitroso y dinitrógeno, desde suelos agrícola-ganaderos ante diferentes condiciones ambientales y de manejo. La tesis hace hincapié en las emisiones de óxido nitroso, dado que este gas acarrea una problemática ambiental relacionada al calentamiento global de la tierra y a la destrucción de la capa de ozono. En el análisis de los resultados de los distintos experimentos se analiza no sólo la magnitud absoluta de las emisiones de N sino también la proporción de los gases de N que se emiten como óxido nitroso y dinitrógeno, con el fin de obtener información más consistente con respecto a estas emisiones y sus controles. El enfoque de los experimentos hace énfasis en los efectos de distintas prácticas agrícolas que puedan afectar los controles de las emisiones de óxido nitroso desde los suelos.

1.b. Antecedentes generales existentes

1.b.1. Óxido nitroso y problemática ambiental

El nuevo énfasis en aspectos ambientales que se ha verificado en los últimos años ha provocado notorios cambios en las actividades de investigación relacionadas con el nitrógeno (N). Durante el siglo 20, la temperatura media global de la superficie terrestre ha aumentado $0.6 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ (IPCC, 2001), y este efecto de calentamiento ha resultado primariamente de incrementos en las concentraciones de gases de efecto invernadero en la atmósfera debido a actividades humanas. El óxido nitroso, N_2O , es un constituyente importante de la atmósfera porque absorbe radiación infrarroja y, por lo tanto contribuye al efecto invernadero. La concentración original de N_2O en la atmósfera, cuando no existía la influencia antrópica, era de 275 ppb (Bøckman y Olf, 1998), y comenzó a incrementarse en un período cercano al año 1700. La concentración atmosférica en la actualidad de N_2O es de alrededor de 310 ppb y está aumentando a un ritmo de 0,6-0,9 ppb (0,25%) por año y su vida media es de 166 ± 16 años (Kaiser *et al.*, 1998). El potencial de calentamiento global de cada molécula de N_2O es de alrededor de 296 veces mayor que cada molécula de dióxido de carbono (CO_2) para un marco de tiempo de 100 años (IPCC, 2001), por lo que el balance total de gases de efecto invernadero de cualquier ecosistema es más sensible a cambios en sus emisiones que a cambios en las emisiones de CO_2 (Venterea *et al.*, 2005).

El incremento en las emisiones de N_2O no ha sido acompañado por incrementos correspondientes en los destinos del N_2O formado (Smith, 1997). El único mecanismo significativo de eliminación del N_2O atmosférico es el transporte hacia la estratósfera donde es fotolíticamente oxidado a óxido nítrico (NO) el cual reacciona con el ozono estratosférico, destruyéndolo (Crutzen, 1979). Aunque ha sido sugerido que los suelos continuamente anegados pueden ser un destino importante del N_2O (Blackmer y Bremner, 1976; Chapuis-Lardy *et al.*, 2007) y que algunos trabajos han encontrado leves incorporaciones de N_2O atmosférico al suelo (Smith *et al.*, 1998; Jungkunst, 2004), otros estudios indican que la potencia de los suelos como destino de dicho gas es muy baja (Jenkinson, 1990; Mosier *et al.*, 1996), debido a una escasa difusión del N_2O hacia estos suelos anegados.

1.b.2. Óxido nitroso y procesos generadores

Las fuentes conocidas de N_2O son los procesos microbianos en suelos y océanos, producción de ácido nítrico, generación de fertilizantes nitrogenados, deshechos animales domésticos, automóviles, quema de biomasa vegetal, producción de ácido adípico y nylon y probablemente conversión del amoníaco, NH_3 en la atmósfera (Zumft, 1997). Sin embargo, está ampliamente aceptado que las emisiones de N_2O derivan fundamentalmente de transformaciones microbianas del N en ecosistemas terrestres y marinos (Firestone y Davidson, 1989).

La denitrificación es el proceso por el cual compuestos oxidados de N, principalmente nitratos (NO_3^-) y nitritos (NO_2^-), son reducidos en forma no asimilatoria a gases como N_2O y N_2 . La ruta del proceso de denitrificación ha sido muy estudiada desde los años 80. Es claro ahora, al menos para la mayoría de los organismos denitrificadores, que el proceso de denitrificación involucra cuatro enzimas que actúan en forma secuencial (Tiedje, 1994; Zumft, 1997). La enzima que cataliza el último paso, la reducción del N_2O a N_2 es la enzima óxido nitroso reductasa, la cual es una proteína periplásmica que existe en una forma única (Zumft, 1997). El N_2O gaseoso es un intermediario obligado pero libre del proceso de denitrificación (Knowles, 1982). Aún en un organismo que posea todas las enzimas denitrificadoras, éstas mantienen cierto grado de independencia dado que responden a combinaciones de señales internas y externas en forma diferente; los sistemas enzimáticos de reducción del N-NO_3^- y del $\text{N-N}_2\text{O}$ son los más independientes del proceso de denitrificación, mientras que la reducción del N-NO_2^- y del N-NO son controladas en forma interdependiente a nivel transcripcional y de actividad enzimática (Zumft, 1997).

La nitrificación, llevada a cabo principalmente por organismos quimioautótrofos, también puede generar como subproducto N_2O . Ritchie y Nicholas (1972) proveyeron evidencia clara que el organismo nitrificador *Nitrosomonas europaea* podía producir pequeñas cantidades de N_2O por la reducción enzimática del NO_2^- y del NO . La producción de N_2O por nitrificación, o por dismutación del HNO , se da únicamente a través de la acción de los organismos que oxidan el N-NH_4^+ a N-NO_2^- (Blackmer *et al.*, 1980), que reducen el N-NO_2^- formado antes que puedan ser oxidados a N-NO_3^- . Se considera que las enzimas que reducen a los óxidos de N son las mismas que en el proceso de denitrificación (Wrage *et al.*, 2001). No se conoce mucho acerca de la producción de N_2O por nitrificadores porque no existe un método simple para determinarlo y porque se le han asignado diferentes nombres, como “denitrificación por nitrificadores” o simplemente “nitrificación”. Dado que el N_2O no es un intermediario regular del proceso de oxidación del N-NH_4^+ , sino que parece ser un producto de un cambio metabólico que ocurre en los organismos nitrificadores ante situaciones de stress de O_2 (Poth y Focht, 1985), el término más apropiado en términos de funcionalidad para definir el proceso sería denitrificación por nitrificadores. Sin embargo, en este trabajo, consideraremos como sinónimos “nitrificación” y “denitrificación por nitrificadores”, sólo con respecto al proceso formador de N_2O , dada la elevada cantidad de trabajos internacionales que utilizan los dos términos. Menos común es la producción de N_2O por reducción desasimilatoria de NO_3^- a NH_4^+ , la cual es regulada por el oxígeno y puede ser estimulada por altos niveles de C disponibles (Tiedje, 1994).

1.b.3. Emisiones de N_2O y N_2 : Tasa $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ de las emisiones

La formación de N_2O , su acumulación y subsecuente emisión del suelo depende de su producción y de su reducción a N_2 . Este balance entre la producción y la reducción de N_2O está controlado por fenómenos ligados a la difusión y a la actividad de la enzima responsable del paso terminal de la secuencia denitrificadora (Smith y Arah, 1992; Holtan Hartwig *et al.*, 2000). La reducción del N_2O a N_2 por denitrificación en ecosistemas acuáticos y terrestres es el único destino biológico del N_2O (Jungkunst, 2004).

Dado que la capacidad de reducción del N_2O en el suelo ha probado ser determinante para las emisiones de N_2O (Henault *et al.*, 1998), la alta sensibilidad de la enzima óxido nitroso-reductasa a las condiciones ambientales es una condición de carácter principal en las emisiones de N_2O . La enzima óxido nitroso reductasa parece ser más sensible que las otras enzimas de la secuencia denitrificadora al O_2 , a bajas relaciones carbono:nitrógeno (C:N), acidez y bajas temperaturas, principales reguladores de la síntesis y actividad de dichas enzimas (Tiedje, 1988). No todos los organismos denitrificadores expresan la enzima óxido nitroso-reductasa, que cataliza

la reducción del N_2O ; sin embargo la enzima ha sido identificada en varias importantes especies denitrificadoras, incluyendo *Pseudomonas stutzeri*, *P. denitrificans*, *Alcaligenes faecalis* y *Tiosphaera pantotropha* (Gerspacher y Altosaar, 2004; Zumft, 1997).

La composición de las emisiones nitrogenadas, o la proporción de los distintos gases emitidos desde el suelo presenta en la literatura información inconsistente aunque ha sido remarcada su importancia (Curtin *et al.*, 1994). Se han realizado relativamente pocos estudios dedicados al análisis de las proporciones relativas de los distintos gases en las emisiones nitrogenadas (Firestone y Tiedje, 1979; Weier *et al.*, 1993; Estavillo *et al.*, 2002; Elmi *et al.*, 2003). La denitrificación es considerada el principal proceso de formación de N_2O de los suelos. La producción de N_2O de un suelo depende entonces en la mayoría de los casos de la tasa de denitrificación y de su fracción molar o tasa $N_2O/(N_2O + N_2)$ (Bandibas *et al.*, 1994), por lo tanto el uso de una sola relación en la estimación de las pérdidas de N_2O puede conducir a conclusiones erróneas. La fracción molar es un concepto teórico, y tiene valores entre 0 y 1, o 0 y 100%. La tasa $N_2O/(N_2O + N_2)$ es un concepto empírico, que surge del cociente entre las emisiones de N_2O sin la presencia de acetileno y con la presencia de acetileno, que inhibe tanto la nitrificación como la reducción del N_2O a N_2 (ver sección Metodología General). De la misma manera que la denitrificación total, la tasa $N_2O/(N_2O + N_2)$ producida es en general altamente variable en tiempo y espacio (Stevens y Laughlin, 1998), lo que hace que las estimaciones de las emisiones de N en un balance global sean inciertas. En consecuencia, aún hoy existe información insuficiente de los factores que controlan la tasa $N_2O/(N_2O + N_2)$.

1.b.4. Emisiones de gases nitrogenados y regulación ambiental

De los procesos microbianos, la denitrificación es uno de los más sensibles a la regulación ambiental, debido a que muchos factores participan a través de complejas interacciones. A nivel celular, las tasas de denitrificación están limitadas por los contenidos de O_2 , óxidos de N y C respirable (Knowles, 1982). Mientras que el nivel de aireación, o disponibilidad de O_2 , es el principal control de la síntesis y actividad de las enzimas denitrificadoras, la competencia por el C durante los períodos aeróbicos parece ser el principal determinante de la densidad y composición de la comunidad denitrificadora (Tiedje, 1994). Una investigación de los factores que afectan la variabilidad de la denitrificación y sus productos finales (Dendooven y Anderson, 1995) indicó con claridad que la dinámica de las enzimas reductoras involucradas en la denitrificación, e influenciadas por la historia de aireación del suelo, constituía un control adicional de las emisiones de gases nitrogenados.

La presencia de óxidos gaseosos no afecta la reducción de las formas oxidadas iónicas. Estas últimas son preferentemente reducidas antes que las formas gaseosas, causando la mencionada acumulación y emisión de N_2O (Knowles, 1982). Este fenómeno puede deberse a una competencia por electrones o a diferencias intrínsecas de las actividades específicas de las enzimas reductasas (Betlach y Tiedje, 1981). Las concentraciones de $N-NO_3^-$ regulan su reducción con cinéticas de primer orden y generalmente inhiben la reducción del N_2O (Blackmer y Bremner, 1978).

Debido a que un alto número de microorganismos es capaz de denitrificar, y a que las enzimas son estables un largo período posterior a su formación, la biomasa denitrificadora y la disponibilidad de enzimas rara vez limitan la denitrificación (Bremner, 1997).

Sólo a través del estudio profundo de los factores físicos, biológicos y químicos que gobiernan las emisiones de N_2O será posible la modelización y generación de capacidad predictiva (Mosier *et al.*, 1996). En un trabajo clásico, Firestone y Davidson (1989) propusieron el modelo "hoyo en la tubería" según el cual las emisiones de N_2O están controladas a tres niveles; el primer nivel determina la tasa absoluta de denitrificación o cantidad de N que es ciclado, el segundo nivel controla la proporción

de N₂O relativa al N₂ en las emisiones, y el tercer nivel determina la difusión de estos gases desde el sitio de producción a la atmósfera. Jetten *et al.* (2001) propuso que las principales causas de la acumulación de intermediarios del proceso de denitrificación, como el N₂O, se relacionaban a limitaciones de dadores de electrones y la presencia de compuestos tóxicos. A pesar de más de treinta años de investigación y publicaciones sobre las emisiones de N₂O, aún hoy se destaca la necesidad de complementar la información de mediciones de flujos de N₂O con técnicas analíticas que permitan la identificación de correlaciones entre estos flujos y los factores controladores (Stehfest y Bouwman, 2006). Además, aún hoy existe insuficiente información con respecto a los factores que controlan la tasa N₂O/(N₂O+N₂), información necesaria para poder manipular las condiciones de modo de reducir la producción y emisión de N₂O.

1.b.5. Emisiones de gases nitrogenados y agricultura

Los suelos agrícolas son considerados como una de las mayores fuentes de N₂O, contribuyendo con el 80% del incremento neto del N₂O atmosférico en los últimos años (Mosier y Kroeze, 2000). Aunque la agricultura sólo contribuye con un 1% de las emisiones globales de CO₂, esta representa el 60% de las emisiones mundiales de N₂O (OECD, 2000). Por lo tanto, se asume que cambios en el ciclo del N en los suelos agrícolas han influenciado en los aumentos en N₂O atmosférico durante el siglo pasado (Mosier *et al.*, 1996). No obstante no debe desconocerse la importancia de los ecosistemas naturales como las selvas tropicales, las cuales presentan reportes de elevadas tasas de emisión de N₂O (Stehfest y Bouwman, 2006), que podrían contribuir con hasta el 21% de las emisiones globales totales de N₂O (Matson y Vitousek, 1990). Es claro también que en suelos arenosos las pérdidas por lixiviación de nitratos pueden ser cuantiosas, de la misma manera que cuando la urea es aplicada en superficie sobre estos suelos pueden producirse elevadas pérdidas de N-NH₃ volatilizado. Sin embargo estas pérdidas, con controles predominantemente abióticos, van fuera del alcance de estudio de estas tesis.

Los distintos usos y prácticas de manejo agrícola afectan los niveles de denitrificación, a través del cambio en los parámetros que regulan este tipo de pérdidas de N. Entre los años 1969 y 1990 el área mundial dedicada a la agricultura no aumentó, aunque el uso agrícola se ha intensificado, con una adopción más común de prácticas como la fertilización y la irrigación (Granli y Bøckman, 1994). Además, la generación de cultivos de alto rendimiento induce elevados ingresos de C durante la incorporación del rastrojo y se promueve intensamente la actividad de organismos nitrificadores y denitrificadores, (Conti *et al.*, 1997). Los sistemas agrícolas de alta tecnología requieren además de elevadas fertilizaciones, un estricto control de plagas que se lleva a cabo casi completamente con el uso de pesticidas. Debido a su efecto biocida, deben considerarse los efectos de los pesticidas sobre microorganismos de suelo no objetivos, y aquellos ligados al ciclado del N están en los grupos de mayor interés en cuanto a la función general del suelo (Carlisle y Trevors, 1986).

En la Región Pampeana Argentina, existen suelos sometidos a sucesivas inundaciones y períodos de buen drenaje, y muchos suelos de la región son dedicados a un uso agrícola continuo (Giambiagi *et al.*, 1990). Algunas mediciones de emisiones de N₂O (Ciampitti *et al.*, 2005) y de gases nitrogenados por denitrificación desde suelos agrícolas han sido realizadas en suelos de la Región Pampeana (Giambiagi *et al.*, 1990; Rodríguez y Giambiagi, 1995; Rodríguez, 1997; Picone y Videla, 1998; Picone *et al.*, 1997; Palma *et al.*, 1997; Sainz Rozas *et al.*, 2001 y 2004), aunque aún existe una carencia de datos de emisiones absolutas y relativas de N₂O. A través de un modelo que incluía la tasa de fertilización nitrogenada, porcentajes de C edáfico, clima, cultivo y valores de pH y textura del suelo, Stehfest y Bouwman (2006) estimaron emisiones anuales de N₂O desde la Región Pampeana entre 0 y 6 kg N ha⁻¹, valor que fue influido por la alta intensidad del cultivo de soja en la Región.

Como consecuencia del análisis de estos antecedentes, se decidió conducir la investigación sobre aspectos no estudiados de los controles de las emisiones gaseosas de N desde suelos agrícolas y ganaderos. Para ello, se organizó el trabajo de doctorado en 4 capítulos que abordan diferentes puntos de estudio. El primer capítulo tuvo como objetivo estudiar en profundidad el efecto de contenidos de humedad crecientes hasta incluir la presencia de una capa de agua sobrenadante sobre las emisiones de gases nitrogenados y sobre la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ de las emisiones, dado un vacío en el conocimiento del tema. Los capítulos 2,3 y 4 se refirieron al efecto de diferentes condiciones producto de la práctica agrícola, como el manejo de la fertilización, de los residuos y de los pesticidas aplicados, sobre las emisiones de gases de N. En el último capítulo, además, se compararon los dos grandes grupos de suelos típicos de la agricultura en la Región Pampeana Argentina, Argiudoles y Hapludoles, y el uso agrícola o pastoril de estos suelos en sus efectos sobre las emisiones de gases nitrogenados.

1.c. Objetivo general

Analizar la influencia de distintos factores biológicos y no biológicos sobre las emisiones absolutas y relativas de gases de nitrógeno gaseoso, óxido nitroso y dinitrógeno, en suelos pertenecientes a sistemas agrícolas y ganaderos.

1.d. Metodología General

1.d.1. Muestreo y acondicionamiento de los suelos

Para todos los experimentos, se extrajeron muestras no disturbadas de los suelos dentro de cilindros de PVC de 10 cm de largo y 5 cm de diámetro interno, según lo recomendado por Mosier y Klemetsson (1994). La porción que contiene los primeros 10 cm del suelo es la principal responsable de la emisión de gases nitrogenados a la atmósfera (Khera *et al.*, 1999; Estavillo *et al.*, 2002). Parkin *et al.* (1987) encontraron que cilindros de más de 4,2 cm de diámetro dieron los resultados más confiables debido a que se necesitaba este tamaño de muestra para incluir a los *hot spots* de la denitrificación y no submuestrear la distribución en “parches” de estos micrositios, y para obtener distribuciones más uniformes. Todos los cilindros se extrajeron aleatoriamente de una superficie de 3 X 3 metros, para minimizar el efecto de heterogeneidad del suelo. Al menos cinco cilindros de suelo adicionales a los necesarios para el ensayo fueron siempre extraídos para la caracterización inicial de las propiedades del suelo, especialmente de su densidad aparente, no siendo estos incubados o sujetos a tratamiento alguno.

Los cilindros extraídos para cada experimento se sellaron en la base y se condujeron al cuarto de crecimiento para su incubación a temperatura de habitación (room temperature). Se considera que estudios de incubación en laboratorio son buenos indicadores para el estudio de los factores que afectan los productos de denitrificación a campo (Mosier y Klemetsson, 1994). El suelo de los cilindros fue secado al aire previo al inicio del ensayo y luego preincubado a 24-30% WFPS por lo menos por diez días, para que todos los cilindros llegaran al inicio de la incubación con una humedad uniforme. Los cilindros constituyen la unidad experimental de los ensayos y se asignaron aleatoriamente a los tratamientos específicos. Los cilindros de suelo se colocaron para su incubación en frascos de plástico con tapas herméticas a las que se les agregó un septum de goma para la inyección del acetileno y para la extracción de las muestras gaseosas, por lo que el método utilizado correspondería a los de “cámara cerrada estática” (Mosier y Klemetsson, 1994). El uso de cámaras cerradas estáticas, tiene como principal desvío que la composición de la atmósfera cambia constantemente, pudiendo alterar procesos de difusión de gases desde el suelo; sin embargo, el hecho de que ofrece la oportunidad de conducir experimentos en laboratorio, donde los factores que covarían o que pueden confundir los resultados pueden ser controlados a través de su manipulación o del diseño experimental, hace que esos pequeños desvíos sean irrelevantes ante los efectos de los factores controladores o tratamientos de interés (Hutchinson y Livingston, 2002).

1.d.2. Medición de emisiones de N gaseoso

El método utilizado para determinar la denitrificación y relación $N_2O/ (N_2O+N_2)$ del mismo proceso fue la técnica del bloqueo con acetileno, C_2H_2 (Yoshinari *et al.*, 1977). La precisión de este método ha sido confirmada con estudios radioisotópicos de ^{15}N en una variada cantidad de situaciones (Aulakh *et al.* 1983; 1984a; Bergsma *et al.*, 2002). El acetileno, C_2H_2 , a altas concentraciones inhibe la reducción enzimática de N_2O a N_2 , de modo que la cantidad de N_2O medida por cromatografía gaseosa se toma como medida de la denitrificación total. El acetileno es generado a través de la reacción entre carburo de calcio, CaC_2 y agua destilada, lo que permite obtener un gas limpio y libre de acetona, que suele encontrarse en grandes cantidades en los tanques industriales de acetileno, y que es un buen sustrato para los organismos heterótrofos (Mosier y Klemetsson, 1994).

La principal desventaja del uso del acetileno en cámaras cerradas es que este puede no difundir a todos los sitios donde el proceso de denitrificación es factible de

ocurrir (Smith, 1990), por lo que se recomienda no usar esta técnica en estudios a campo donde la permeabilidad del suelo sea baja. Esto ha llevado al uso de cilindros intactos de suelo, incubándolos en ambientes cerrados, donde puedan acumularse los gases emitidos para su posterior cuantificación (Ryden *et al.*, 1987). El uso de cilindros de suelo también permite el uso del suelo para análisis posteriores, y disminuye el tiempo necesario para que el acetileno difunda lo suficiente para inhibir la reducción de N_2O de todo el suelo (cámara cerrada: 17 horas, cilindros: 1h). Una vez que el acetileno difunde, la acción es inmediata. Otra de las desventajas de la técnica de inhibición con acetileno es que al bloquear la reducción del N_2O a N_2 , quedan más electrones disponibles para la reducción de los NO_3^- , estimulando en teoría la denitrificación total. Sin embargo, Aulakh *et al.* (1991c) encontraron que el acetileno no aumentaba la denitrificación o la reducción de los NO_3^- después de cuatro días de exposición al acetileno, coincidiendo con lo hallado por Strong y Fillery (2002) y Ryden *et al.* (1979 a y b) luego de 8 días de exposición del suelo a este inhibidor, por lo que no debería esperarse este efecto en veinticuatro horas que es el tiempo de acumulación en este trabajo. El acetileno también inhibe el proceso de nitrificación (Klemetdsson *et al.*, 1988), lo que podría afectar las tasas de denitrificación si los NO_3^- fueran limitantes aunque existen evidencias que este efecto es de poca importancia en la dinámica de los NO_3^- y del proceso denitrificatorio (Dendooven *et al.*, 1996; Ellis *et al.*, 1996). Sin embargo, la técnica de inhibición con acetileno es una técnica sensible, barata, que requiere equipamiento sencillo (Smith, 1990), y su principal ventaja es que se apoya en la abundancia y distribución natural de los NO_3^- (Tiedje *et al.*, 1984). Por ello, y debido a que permite la realización de grandes cantidades de muestras que permite lidiar con la alta variabilidad intrínseca del proceso de denitrificación, la aplicación de acetileno a cilindros de suelo bajo la modalidad de “cámara estática” es la técnica más difundida para la medición de tal proceso (Groffman *et al.*, 2006).

Cada repetición incluyó un cilindro al que se incubó con acetileno y otro al que se incubó sin acetileno, por lo que cada tratamiento (tres repeticiones) contaba con seis cilindros de suelo. Para ello se buscó asegurar la homogeneidad entre las muestras que se incubaron con y sin acetileno dentro de cada repetición, extrayéndolas a distancias lo más cortas posibles. La producción de N_2O se estimó midiendo directamente las emisiones de N_2O en las incubaciones sin acetileno, en muestras intactas y con los procedimientos similares a las usadas para medir denitrificación pero sin la aplicación de acetileno. En los frascos con los cilindros destinados a la medición de la denitrificación total, el aire fue reemplazado por acetileno con una jeringa hasta llegar a una concentración de este gas en el espacio aéreo de los frascos de 10% v/v (Aulakh *et al.*, 2000). La velocidad de la inhibición de la reducción del N_2O por el acetileno es extremadamente rápida y reversible (Ryden *et al.*, 1979a). La difusión del acetileno puede ser suficientemente veloz aún en suelos saturados, debido a su alta solubilidad en agua, aproximadamente 1 ml cm^{-3} (Ryden *et al.*, 1979a), lo que resulta en una concentración equivalente en cualquier punto de la fase acuosa. Veinticuatro horas luego de finalizada la aplicación del acetileno, y luego de la homogeneización de la atmósfera interna por el bombeo con una jeringa de 50 ml, se tomaron muestras por triplicado del gas interior de todos los frascos, en jeringas descartables que fueron transportadas inmediatamente al laboratorio para ser leídas con cromatografía gaseosa. Es necesario un día de incubación para incluir la fluctuación diaria de la temperatura en las mediciones (Aulakh *et al.*, 1991c) dado que se ha registrado que los flujos máximos durante un día fueron hasta cinco veces mayor que los flujos mínimos del mismo día (Williams *et al.*, 1999), mientras que incubaciones de más de 30 horas pueden disminuir la eficiencia del bloqueo de la reducción del N_2O por parte del acetileno (Ryden *et al.*, 1979a). En adición, la extracción de las muestras gaseosas fue siempre temprano en la mañana, para disminuir el impacto de la variación térmica diaria. Los cilindros destinados a la

medición de gases nitrogenados fueron siempre los mismos, es decir que los mismos cilindros fueron usados para las determinaciones de N gaseoso en todos los tiempos de medición. Tres frascos adicionales sin suelo fueron agregados para ser usados como blancos.

Las emisiones de N_2O y de N_2O+N_2 por denitrificación fueron expresadas en $\mu g N kg^{-1} día^{-1}$. Las emisiones acumuladas de N_2O y de N_2O+N_2 fueron estimadas asumiendo que las tasas diarias cambiaban linealmente entre mediciones (Venterea *et al.*, 2005), lo que fue considerado correcto estudiando las diferencias con ^{15}N (Aulakh y Rennie, 1984; Parkin *et al.*, 1985). Para obtener la acumulación total de emisiones gaseosas, los flujos medios se calcularon promediando las tasas entre una medición y la siguiente, por el tiempo ocurrido entre mediciones (Cai *et al.*, 1997). Cuando se perdió algún dato, el flujo de los días previos fue usado para calcular las emisiones acumuladas (Ellis *et al.*, 1998). Luego de su acumulación, las emisiones se dividieron por la cantidad de días de incubación, expresándose en μg de $N kg^{-1} d^{-1}$, para una mejor comparación con otros trabajos con incubaciones de duración diferente.

La cromatografía gaseosa es una técnica analítica adecuada para la determinación de la mayoría de los gases en muestras de aire recolectados usando métodos de acumulación en cámaras cerradas (Hutchinson y Livingston, 2002). Por ello, las determinaciones se realizaron en Cromatógrafo Gaseoso Agilent 6890 y detector ECD, con columna capilar Carboplot, usando como carrier gas helio; las temperaturas de trabajo fueron de $100^{\circ}C$ para el horno y el inyector y de $250^{\circ}C$ para el detector.

1.d.3. Pretratamientos y determinaciones químicas

Paralelamente se extrajeron y se incubaron en todos los experimentos, tres cilindros de suelo por repetición y por cada fecha de medición (Sainz Rozas *et al.*, 2001), para el muestreo destructivo y la realización de determinaciones de distintas variables edáficas que la bibliografía acepta como principales controles de las emisiones de gases nitrogenados. Estas determinaciones fueron realizadas en los mismos días de las determinaciones de emisiones gaseosas, y no todas fueron realizadas en todos los experimentos. Las muestras fueron sometidas a los pretratamientos de secado al aire y tamizado por tamiz de 0,2 mm. y a las siguientes determinaciones básicas:

- pH en agua en relación suelo:agua 1:2,5 (Thomas, 1996)
- Carbono orgánico total (Nelson y Sommers, 1996). Este método presenta la desventaja de que no todo el C del suelo llega a ser oxidado, por lo que requiere factores de conversión. En nuestro caso un factor de corrección de 1,3 (alrededor de 77% de oxidación) según lo recomendado por los autores. Este método también asume que la valencia general del C orgánico es 0, lo que puede aceptarse en un amplio rango de condiciones (Nelson y Sommers, 1996).
- Carbono orgánico soluble en K_2SO_4 0,5M (Csol) (Dambreville *et al.*, 2006). Para esta determinación, se agitaron suspensiones de suelo (10 g de suelo en 20 ml de solución de K_2SO_4 0,5M) por 30 minutos en agitador horizontal, el sobrenadante se extrajo con jeringa y fue filtrado al vacío en filtro Whatman No42. Al filtrado se le analizó el C soluble a través del método de oxidación por dicromato (Nelson y Sommers, 1996) modificado. En esta modificación 3 ml del extracto filtrado son tratados con 1,5 ml de dicromato de potasio 0.06N y 3 ml de H_2SO_4 concentrado. El dicromato residual es titulado con Sal de Mohr 0,03N.
- Para la determinación de $N-NO_3^-$, se tomaron 20 gramos de suelo sin secar ni tamizar, que fueron extraídos con 100 ml de solución 0.25% $CuSO_4+0.01MBO_3H_3$, y

determinados colorimétricamente por el método de reducción con hidrazina (Carole y Scarigelli 1971).

- N-NH₄⁺ soluble+intercambiable a través del extracto de suelo con KCl 2M, MgO y destilación directa con vapor (Richter, 1980)
- Potencial Rédox, Eh, con electrodo específico (Patrick *et al.*, 1996) de combinación de platino (Digital Ionalyzer/501, Orion Research, Boston, MA, USA). El valor de Eh fue medido a una profundidad constante de 3 cm. Debido a que la variación del pH entre las muestras en los experimentos donde esta variable fue medida fue muy escasa, puede considerarse que las variaciones en el Eh se debieron exclusivamente a las actividades relativas de las parejas rédox del suelo.
- Carbono orgánico particulado (COP) (Cambardella y Elliott, 1992). Brevemente, se toman 10 gramos de suelo tamizado con malla de 2mm, y se dispersan en 30 ml de hexametáfosfato de sodio 5 g l⁻¹. Las muestras de suelo dispersadas se pasan a través de un tamiz de 53 µm para remover la materia orgánica particulada. La suspensión de suelo que atraviesa el tamiz se evapora en estufa a 50°C y la muestra secada es molida con un mortero y se le determina su contenido de carbono. El carbono orgánico particulado es calculado como la diferencia en carbono total antes y después de su remoción. Debido a que las partículas >53 µm son retenidas en el tamiz, el valor de carbono de la suspensión se corrige por la fracción de arena del suelo. Se calculó luego la relación entre el carbono orgánico total y el carbono orgánico particulado (relación COP/COT).

Respiración en laboratorio (Jenkinson y Powlson, 1976). Brevemente se colocaron un cilindro de suelo junto con otro frasco que contenía 10 ml de NaOH 1N dentro de un frasco de vidrio de mayor tamaño, herméticamente cerrado, en oscuridad durante 7 días; el NaOH atrapa el CO₂ liberado por el suelo. Luego se agregó BaCl₂ en el frasco que contenía el NaOH para precipitar el CO₃²⁻ formado como BaCO₃ y el exceso de NaOH fue titulado con HCl 0.5N, usando como indicador fenolftaleína.

1.d.4. Cálculos y análisis estadísticos

El valor de WFPS determina el status global de aireación, y fue calculado como la relación entre la humedad volumétrica y la porosidad total. La humedad gravimétrica correspondiente a cada tratamiento se determinó a través de la fórmula:

$$HG = \frac{WFPS * porosidadtotal}{dap} \quad (eq 1)$$

Las emisiones de N₂ fueron obtenidas de la diferencia entre la emisión de N₂O con acetileno y la emisión de N₂O sin acetileno para cada repetición (Ryden *et al.*, 1979a). La tasa N₂O/(N₂O+N₂) de las emisiones fue obtenida según la siguiente ecuación:

$$\frac{N2O}{N2O + N2} = \frac{N - N2O sin C2H2}{N - N2O con C2H2} \quad (eq 2)$$

Ryden *et al.* (1979b) concluyeron luego de estudios con ¹³N que la relación entre la tasa de N₂O producida en ausencia de acetileno y la tasa de N₂O producida en presencia de acetileno es una aproximación válida de la tasa N₂O/(N₂O+N₂).

Los datos se analizaron con el paquete informático SAS (SAS Institute Inc., 1999). Previamente se corroboraron los supuestos de normalidad, a través del test de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965), homogeneidad de varianzas e independencia de las observaciones. Las emisiones de gases nitrogenados, diarias y acumuladas, fueron log-transformadas en todos los casos para obtener su normalidad, debido a la gran variación en los datos, de hasta cuatro órdenes de magnitud. De la misma manera fueron manejados los valores de la tasa N₂O/ (N₂O+N₂). Cuando los valores eran 0 la transformación se realizó con la fórmula Log(1+x) (Bandibas *et al.*, 1994).

2. Capítulo 2. Humedad y emisiones de gases nitrogenados

2.1. Antecedentes, objetivos e hipótesis específicos del capítulo 2: Emisiones de gases nitrogenados y humedad y aireación

2.1.1. Antecedentes Específicos

2.1.1.1. Anegamiento y disponibilidad de O₂: denitrificación en suelos anegados

Las inundaciones transitorias, de suelos bien drenados, son un evento natural en muchas regiones del mundo (Wang y Bettany, 1995), y son una situación común en muchas zonas de la región pampeana argentina. Las inundaciones han afectado a un vasto sector de la región pampeana argentina en los últimos años, especialmente en el año 2001, en lo que se ha convertido en un verdadero estigma para sus pobladores y productores agropecuarios. En adición, un incremento del 50% en las precipitaciones anuales registrado en los últimos 40 años ha elevado los niveles de las napas de agua, por lo que algunas áreas de la región permanecen saturadas por períodos extendidos de tiempo (Tanco y Kruse, 2001).

La humedad del suelo tiene múltiples efectos en las emisiones de gases nitrogenados. El agua es esencial para la vida y la actividad de los microorganismos. Tanto las condiciones de óxido-reducción de los suelos como la difusión de los gases son afectadas por el porcentaje de poros del suelo ocupados por agua (WFPS). El efecto de la humedad sobre las tasas de denitrificación se da largamente a través de su efecto en la aireación, que puede ser medida a través del potencial rédox, Eh. El valor de WFPS es el indicador general más útil del status de aireación del suelo, y por lo tanto del potencial de denitrificación (Linn y Doran, 1984). A medida que la humedad del suelo aumenta, disminuye fuertemente la difusión del O₂ hacia micrositios metabólicamente activos (Bandibas *et al.*, 1994), y aumenta rápidamente la fracción del suelo que se torna anaeróbica, causando fuertes aumentos en las tasas de denitrificación (Aulakh *et al.*, 1991b; Li *et al.*, 1992a; Dambreville *et al.*, 2006). Khalil *et al.* (2002) señalan que las tasas de denitrificación son nulas o bajas debido a zonas anóxicas dentro de los agregados cuando los valores de WFPS de un suelo bajan por debajo de 65-75%, coincidiendo con lo reportado por Estavillo *et al.* (1994). El punto de transición entre los procesos que operan aeróbicamente y aquellos que lo hacen anaeróbicamente es comúnmente citado en 60% WFPS (Davidson, 1993; Kaiser *et al.*, 1998; Webb *et al.*, 2004).

Las transformaciones del N y el transporte de ese elemento gobiernan en gran medida las pérdidas de N por denitrificación en suelos anegados por períodos extendidos de tiempo. Los suelos inundados se caracterizan por dos capas debajo del agua superficial, una capa de suelo aeróbica superficial y una capa de suelo anaeróbica subyacente. Las reacciones del N son influenciadas en gran medida por la presencia de O₂ en el agua superficial. En la capa aeróbica ocurre la nitrificación del NH₄⁺ que difunde desde la capa anaeróbica subsuperficial de suelo y del que es producto de la amonificación en esta misma capa (Reddy y Patrick, 1984). Los NO₃⁻ producidos en la capa aeróbica difunden rápidamente por diferencia de concentración hacia abajo hacia la zona anóxica, donde se pueden denitrificar y perder. Reddy *et al.* (1980) encontraron que los pasos más lentos en el proceso de pérdida de N de suelos anegados eran la baja tasa de difusión del NH₄⁺ hacia la capa aeróbica y principalmente la baja oxidación del NH₄⁺ producto de la dificultosa difusión del O₂ a través del agua suprayacente, constituyéndose estos procesos en reguladores de la pérdida de N en suelos inundados.

2.1.1.2. Condiciones de anegamiento y emisiones de N_2O y tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$

El contenido de agua es uno de los factores más influyentes en el control de las emisiones de N_2O (del Prado *et al.*, 2006; Tietema *et al.*, 2007). El contenido de humedad del suelo regula la permeabilidad a los gases del suelo debido a que la difusividad en líquidos de los gases O_2 y N_2O es substancialmente menor que en el aire, pudiendo este efecto sobre ambos gases afectar las emisiones de N_2O . Según el clásico modelo conceptual de los hoyos en la tubería, propuesto por Firestone y Davidson (1989), la cantidad de N que se escapa por los hoyos como N_2O está determinado por numerosas propiedades del suelo, pero más común y fuertemente por la humedad del suelo. Se han observado aumentos de hasta 30 veces en las emisiones de N_2O desde suelos agrícolas con incrementos en la humedad de 60 a 80% WFPS (Dobbie y Smith, 2001). Ha sido calculado por modelos de simulación que diferentes incrementos en la producción de N_2O pueden ser explicados por incrementos diferentes en el volumen anaeróbico del suelo (Tietema *et al.*, 2007). Las crecientes emisiones N_2O ante aumentos en los niveles de humedad se deben inequívocamente al proceso de denitrificación, como fue probado por Grundmann y Rolston (1987) con el uso de la técnica del bloqueo con acetileno. Sin embargo, y debido a la fuerte variabilidad general en las emisiones de N_2O , existen antecedentes donde la humedad del suelo no se asoció con estas emisiones (Ginting y Eghball, 2005), o sólo se asoció en determinadas condiciones de fertilización nitrogenada (Venterea *et al.*, 2005).

La presencia de una capa de agua superficial puede modificar el balance entre el consumo y renovación del oxígeno, incrementando la necesidad de aceptores de electrones alternativos al O_2 . La existencia de altas emisiones de N_2O desde suelos con altos contenidos de humedad pero sin una capa de agua superficial llevó a Bandibas *et al.* (1994) a concluir que condiciones marginalmente anaeróbicas propician la acumulación y emisión de N_2O . En una revisión sobre el tema se propone que la condición de mayor riesgo para la formación de N_2O es cuando el suelo está húmedo con una WFPS entre 40 y 80% (Bøckman y Olf, 1998). Wrage *et al.* (2001) indican que la nitrificación acoplada a la denitrificación ocurre en suelos donde se den las condiciones favorables para ambos procesos en hábitats vecinos, siendo las interfases entre estos ambientes los principales sitios de generación de N_2O , concluyendo que la producción de N_2O es máxima bajo condiciones que son subóptimas tanto para nitrificadores como para denitrificadores, coincidiendo con lo encontrado por otros autores (McSwiney *et al.*, 2002).

La relación entre las emisiones de N_2 y N_2O no es constante en el tiempo para una situación de anegamiento, dado que la biomasa denitrificadora se caracteriza por una habilidad progresiva para la reducción del N_2O (Khalil *et al.*, 2005), que lleva a una importante variabilidad temporal en la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ de los productos finales de la denitrificación. En un trabajo ampliamente citado, Firestone y Tiedje (1979) separaron el proceso de reducción de óxidos de N durante una secuencia de anegamiento en tres períodos que son (i) uno inicial de reducción lenta pero constante de NO_3^- y N_2O (1-3 hs), (ii) un incremento en la reducción de NO_3^- con la subsecuente producción de N_2O (1-3 a 16-33 hs), y (iii) un incremento en la tasa de reducción de N_2O a N_2 (luego de 16-33 hs). Este fenómeno fue confirmado por Dendooven y Anderson (1995), quienes encontraron que la enzima nitrato-reductasa se formaba a las 2-3 hs a partir de comenzada la condición de anaerobiosis y que la enzima óxido nitroso-reductasa se formaba recién entre las 24 y 42 hs a partir de comenzada la condición de anaerobiosis. El largo de los períodos reportados por Firestone y Tiedje (1979) no serían absolutos, ya que factores como la disponibilidad de C (Letey *et al.*, 1981) o $N-NO_3^-$ (Khalil *et al.*, 2005) podrían generar variaciones.

Existe poca información acerca de las consecuencias que acarrearán distintos niveles de humedad sobre la tasa $N_2O / (N_2O + N_2)$ de la denitrificación. Granli y Bøckman (1994) sugirieron que incrementar la aireación podría aumentar la proporción de N_2O producido por denitrificación, debido a una mayor sensibilidad del sistema óxido nitroso-reductasa al O_2 comparado con otras enzimas de la secuencia denitrificadora (Knowles, 1982) y a la disminución de la tasa de denitrificación; disminuciones en la tasa de denitrificación, debidas por ejemplo a bajas temperaturas o bajos niveles de C disponible, han sido relacionadas a aumentos en la tasa $N_2O / (N_2O + N_2)$ (Dalal *et al.*, 2003). Weier *et al.* (1993) en condiciones de laboratorio, y Rudaz *et al.* (1999) en condiciones de campo, encontraron las menores tasas $N_2O / (N_2O + N_2)$ con los mayores niveles de humedad, aunque los mayores valores de humedad edáficos que se usaron no llegaron a los niveles de saturación (90 y 97% WFPS, respectivamente). En una reciente revisión de más de 1100 datos de campos agrícolas, Stehfest y Bouwman (2006) hallaron que las emisiones desde suelos inundados para el cultivo de arroz fueron consistentemente menores que para el resto de los tipos de cultivos, lo que atribuyeron a que la inundación promovía condiciones anaeróbicas; en esas condiciones el N_2O era probablemente reducido antes de ser emitido desde el suelo. Del análisis de estos antecedentes podría extraerse que la presencia de una capa de agua superficial contribuiría a aumentar la reducción del N_2O a N_2 , en condiciones de ausencia de limitaciones por dadores de electrones, y por lo tanto una reducción en la tasa de emisiones $N_2O / (N_2O + N_2)$ de la denitrificación en condiciones de anegamiento.

2.1.2. Objetivo específico

El objetivo de este capítulo es analizar la influencia de condiciones crecientes de humedad hasta la presencia de agua sobrenadante y, por lo tanto, de la disponibilidad de O_2 , sobre las emisiones absolutas y relativas de gases de N, N_2O y N_2 , de un suelo Argiudol vértico.

2.1.3. Hipótesis específicas

I) La presencia de agua superficial aumenta las emisiones de $N_2O + N_2$ por denitrificación debido a condiciones de mayor reducción.

II) La presencia de una capa de agua superficial disminuye las emisiones de N_2O y la tasa $N_2O / (N_2O + N_2)$ resultante con respecto a suelos con altos niveles de humedad sin la presencia de esta capa de agua por una mayor necesidad de aceptores de electrones.

2.2. Metodología específica

2.2.1. Muestreo y acondicionamiento del suelo

El suelo es un Argiudol vértico de la estación experimental INTA Castelar (S 34°36' 20", O 58°40'20") serie Martín Fierro, de textura franco limosa, con 166 g kg^{-1} , 587 g kg^{-1} y 247 g kg^{-1} de arena, limo y arcilla respectivamente, cuyas principales características se presentan en la Tabla 2.1. Al momento del muestreo, el suelo se encontraba bajo un pastizal que forma parte del parque de la estación experimental. Este suelo fue elegido debido a que por sus niveles de C y N naturales, presenta pocas chances de limitar procesos de denitrificación o nitrificación por deficiencia de compuestos carbonados solubles o por deficientes procesos de mineralización y generación de N mineral.

TABLA 2.1: Características generales del suelo.

N-NO₃⁻ (mg kg⁻¹)	Corg(%)	Nt (%)	Dens. ap.(g cm⁻³)	HE (%)	WFPS(%) a HE	P ext. (mg kg⁻¹)
22,32	2,59	0,24	0,958	28,1 4	42,71	24,1

2.2.2. Tratamientos e incubación del suelo

Luego de su extracción, los cilindros se condujeron al cuarto de crecimiento para su incubación, donde la temperatura osciló entre 18 y 22 °C. El diseño del experimento fue completamente aleatorizado con un factor, humedad, y tres repeticiones por tratamiento.

Se agregó agua destilada a los cilindros de suelo, cuidando de minimizar la alteración del suelo y el entrapado de gas, hasta llegar al nivel de humedad asignado en cada tratamiento, a saber:

- Suelo con el 40% del espacio poroso ocupado por agua (40% WFPS)
- Suelo con el 80% del espacio poroso ocupado por agua (80% WFPS)
- Suelo con el 100% del espacio poroso ocupado por agua, saturado (100% WFPS)
- Suelo con 120% del espacio poroso ocupado por agua, anegado con 2 cm. de agua superficial (120% WFPS)

El porcentaje de humedad necesario para alcanzar tales valores de WFPS fue estimado por el uso de la Ecuación 1 (Sección V Metodología General) y el WFPS correspondiente; conociendo el peso seco de cada cilindro de suelo se obtenía la cantidad de agua necesaria para alcanzar cada nivel de humedad. El agregado de agua fue llevado a cabo por lo menos 2 horas antes del muestreo de gases para minimizar posibles pulsos gaseosos generados por el llenado de los poros con agua. Los cilindros asignados a situaciones de anegamiento fueron encastrados herméticamente en su parte superior por otra pieza cilíndrica de PVC de 5 cm de largo y un diámetro interno algo superior al cilindro base, con el objeto de permitir el exceso de agua superficial de 2 cm de altura. Los frascos con los cilindros permanecieron expuestos a la atmósfera entre mediciones y su humedad fue corregida por gravimetría regularmente para subsanar las pérdidas por evaporación.

Se realizaron tres mediciones por tratamiento de pérdidas de nitrógeno por desnitrificación en distintos momentos. Estos momentos fueron al inicio, a los 2 días, 7 días, 14 días y 21 días de la incubación.

2.2.3. Pretratamientos y determinaciones químicas

Las muestras de suelo adicionales fueron sometidas a las siguientes determinaciones básicas según las metodologías descritas en el Capítulo 1:

- pH en agua en relación suelo:agua 1:2,5 (Thomas, 1996)
- N-NO₃⁻ (Carole and Scorigelli 1971).
- N-NH₄⁺ soluble+intercambiable (Richter, 1980).
- Carbono orgánico total (Nelson y Sommers, 1996)
- Carbono orgánico soluble en K₂SO₄ 0,5M (Dambreville *et al.*, 2006).
- Potencial Redox (Eh) (Patrick *et al.*, 1996).

2.2.4. Cálculos y análisis estadísticos

Se realizaron diagnósticos de influencia (Myers, 1986), y luego se evaluó nuevamente el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas para las variables estudiadas. Se realizaron con el procedimiento PROC

REG del programa SAS análisis de regresión simple entre las variables respuesta (pérdidas por denitrificación y emisiones de N_2O) y las distintas variables químicas edáficas medidas. También se realizó un análisis de regresión múltiple con el procedimiento PROC REG, con el objetivo de encontrar a las variables edáficas que expliquen en mayor medida la variabilidad de las emisiones de N_2O y las pérdidas por denitrificación. Los diagnósticos de multicolinealidad fueron hechos previamente a los distintos análisis de regresión para evitar problemas de inestabilidad en los coeficientes estimados, a través de los valores de VIF (factor de inflación de varianza) e índice de condición (Myers, 1986). Se eligió el modelo más adecuado dentro de todos los modelos existentes posibles con las variables explicatorias, de acuerdo a los criterios de C_p de Mallows (Mallows, 1973), CME y coeficiente de determinación R^2 ajustado por el número de parámetros (MacNeil, 1983).

Se evaluó luego a través del análisis de varianza con el procedimiento PROC MIXED del programa SAS, la existencia de diferencias en las pérdidas por denitrificación y en las emisiones de N_2O causadas por los diferentes tratamientos de humedad. Debido a que las mediciones de las tasas fueron realizadas en las mismas macetas a lo largo de la incubación, el modelo estadístico elegido fue el de medidas repetidas; las condiciones de esfericidad, de Huynh-Feldt y de Greenhouse-Geisser de las matrices variancia-covariancia fueron chequeadas (Huynh y Feldt, 1970). De esta manera, el efecto del tiempo de incubación y su interacción con los tratamientos impuestos fueron directamente analizados. Luego se realizó un test de comparaciones múltiples (LSD: Mínima diferencia significativa) para ver cuales tratamientos realmente diferían. Las emisiones acumuladas y tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$ promedio entre fechas fueron evaluadas con análisis de varianza convencionales, a través del procedimiento PROC GLM del paquete estadístico SAS, siendo luego realizada la separación de medias según Duncan cuando el estadístico-F entre tratamientos fue significativo ($p < 0,05$).

2.3. Resultados

2.3.1. Efecto de la humedad sobre las emisiones de N_2O+N_2 por denitrificación

Las emisiones de N_2 representaron en promedio el 78% de las emisiones totales de N_2O+N_2 por denitrificación; de hecho las emisiones de N_2 y las emisiones de N_2O+N_2 presentaron una evolución muy similar en el tiempo (Fig. 2.1a y b). Las emisiones de N_2O+N_2 por denitrificación fueron altas al comienzo de la incubación, y tendieron a decrecer con el tiempo de incubación (Fig. 2.1a), con excepción del tratamiento de 40% WFPS que presentó valores bajos y relativamente constantes. Los distintos niveles de humedad generaron emisiones de N_2O+N_2 por denitrificación diarias que fueron significativamente diferentes ($p=0,003$), aumentando con el aumento en los valores de WFPS (Fig. 2.1a; Tabla 2.2). Los tratamientos de anaerobiosis marginal, de 80 y 100% WFPS, presentan valores intermedios y similares de pérdidas diarias de N gaseoso por denitrificación, significativamente mayores a las pérdidas con 40% WFPS ($p < 0,05$) y significativamente menores ($p < 0,05$) al tratamiento de anegamiento (120% WFPS), el cual presentó los mayores niveles de emisiones gaseosas por denitrificación. No se detectó interacción entre los niveles de humedad y el tiempo de incubación (Tabla 2.2); los flujos medios durante el período estudiado fueron de 2,26, 12,42, 17,31 y 28,47 $\mu g N \cdot kg^{-1}$ de suelo dia^{-1} para los tratamientos de 40, 80, 100 y 120% WFPS respectivamente.

Las emisiones de N_2O+N_2 por denitrificación acumuladas durante los 21 días de incubación crecieron a medida que aumentó el contenido de humedad; estas fueron de 2,26, 12,42, 17,31 y 28,46 $\mu g N \cdot kg^{-1} d^{-1}$ de suelo para los niveles de WFPS de 40, 80, 100 y 120% respectivamente; las emisiones acumuladas en el tratamiento de 40% WFPS fueron significativamente inferiores ($p=0,02$; Fig. 2.2a) a las correspondientes a

los tratamientos de 80, 100 y 120% WFPS, siendo estas estadísticamente similares entre sí.

2.3.2. Efecto de la humedad sobre las emisiones de N_2O y tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ de las emisiones

Las emisiones diarias de N_2O fueron afectadas significativamente por el tiempo de incubación ($p < 0,005$; Tabla 2.2), existiendo un alto pico inicial en la emisión de este gas de distinta magnitud según el nivel de humedad (Fig. 2.1c). Este efecto fue especialmente marcado en la situación de anegamiento (120% WFPS); las emisiones de N_2O bajo anegamiento disminuyeron seriamente durante la incubación, siendo éstas aún menores a la situación de 40% WFPS en los días 14 y 21 de la incubación. Hacia el décimo día de incubación se produjo un importante aumento en las emisiones de N_2O en las condiciones marginalmente anaeróbicas (80 y 100% WFPS) (Fig. 2.1c). Bajo condiciones predominantemente aeróbicas (40% WFPS) las emisiones de N_2O fueron bajas y prácticamente constantes. Las emisiones de N como N_2O presentaron promedios diarios de 0,53, 5,84, 2,58 y 2,05 $\mu\text{g N kg}^{-1}$ de suelo por día para los tratamientos de 40, 80, 100 y 120% WFPS respectivamente. Las emisiones diarias de N_2O fueron significativamente diferentes ($p = 0,008$) entre los distintos niveles de humedad, no existiendo interacción entre los niveles de humedad y el tiempo de incubación ($p = 0,52$) (Tabla 2.2). Las emisiones diarias de este gas fueron estadísticamente superiores en el tratamiento de 80% WFPS ($p < 0,05$).

Las condiciones de anaerobiosis marginal presentaron emisiones acumuladas de N_2O de 5,84 y 2,58 $\mu\text{g N kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ de suelo, para los niveles de WFPS de 80 y 100% respectivamente. Estas pérdidas fueron mayores a las halladas para WFPS de 40% (0,53 $\mu\text{g N kg}^{-1} \text{d}^{-1}$) y de 120% (2,04 $\mu\text{g N kg}^{-1} \text{d}^{-1}$). Sin embargo, las emisiones acumuladas de N_2O en la incubación fueron estadísticamente similares ($p = 0,31$; Fig. 2.2b).

La tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ mostró al igual que las emisiones absolutas de gases, alta variabilidad, indicada por un coeficiente de variación de 153%. A pesar de su fuerte variación temporal, sin una tendencia definida a través del tiempo de incubación (Fig. 2.1d), el tratamiento de 40% WFPS presentó los mayores valores diarios de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ de las emisiones del suelo, significativamente mayores a los del resto de los tratamientos ($p = 0,0008$; Tabla 2.2). Las tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$ van aumentando con el tiempo, luego del séptimo día en los suelos con los tratamientos de humedad de 80 y 100% WFPS (Fig. 2.1d). A partir del día 14, las tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$ diarias de los tratamientos de 80 y 100% WFPS se diferenciaron significativamente del tratamiento de 120% WFPS ($p < 0,05$), el cual permaneció con una tasa baja y relativamente constante (0 – 0,051) durante la incubación.

Las tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$ promedio para la incubación fueron de 0,32, 0,27, 0,19 y 0,13, para los tratamientos de 40, 80, 100 y 120% WFPS, respectivamente, siendo diferentes solamente los tratamientos de 40 y 120% WFPS ($p = 0,04$; Fig. 2.2c).

Las emisiones acumuladas de N_2O mostraron una relación lineal y positiva con las emisiones de N_2O+N_2 por denitrificación ($p = 0,04$, $R^2 = 0,48$) (Fig. 2.3a). La tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ también presentó una relación lineal, pero de sentido inverso con las emisiones totales por denitrificación ($R^2 = 0,48$) (Fig. 2.3b), mientras que la asociación entre las emisiones de N_2O con la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ fue poco consistente ($R^2 = 0,0002$); estas últimas asociaciones no presentan valores de probabilidad dado que entre las variables además de una asociación estadística existe una relación matemática.

2.3.3. Relación entre emisiones de gases nitrogenados y variables edáficas

Los niveles de N-NO_3^- tendieron a disminuir durante la incubación en los tratamientos correspondientes a altos niveles de humedad, 80, 100 y 120% WFPS (Fig. 2.4a). Los valores de Eh bajo condiciones cercanas a capacidad de campo, 40% WFPS, presentaron valores altos durante toda la incubación (Fig. 2.4b). Bajo contenidos de humedad de 80% WFPS, el valor de Eh disminuyó inicialmente hasta aproximadamente el séptimo día de incubación y luego se mantuvo en valores cercanos a los 90 mV. En los suelos con tratamientos de humedad de 100 y 120% WFPS, los valores de Eh disminuyeron hasta el día 14 de la incubación, y se estabilizaron en las últimas mediciones en valores de Eh de alrededor de -150 y -240 mV, respectivamente (Fig. 2.4b). Los contenidos de C soluble bajo niveles de humedad de 120% WFPS bajaron inicialmente y luego se mantuvieron constantes, mientras que en los otros tratamientos los niveles de C soluble aumentaron inicialmente y luego decrecieron levemente (Fig. 2.4c). Los valores de pH se mantuvieron constantes y sin diferencias importantes (Fig. 2.4d).

Las emisiones acumuladas de $\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2$ por denitrificación se correlacionaron significativamente y en forma negativa con los niveles medios de NO_3^- edáficos ($p=0,03$; $R^2=0,73$) y con el Eh del suelo ($p=0,01$, $R^2=0,61$) (Fig. 2.5), aumentando las pérdidas ante disminuciones del potencial redox. Las emisiones diarias de $\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2$ por denitrificación estuvieron asociadas a los niveles de N-NO_3^- ($R^2=0,66$), cuando no se incluyó en el análisis al tratamiento de 40% WFPS, aunque no puede darse a este análisis un valor de probabilidad significativa debido a la no independencia de las mediciones de emisiones de gases diarias. Las emisiones de $\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2$ por denitrificación no presentaron relación significativa con los valores de C orgánico total, C soluble, N-NH_4^+ o de pH. Las emisiones de N_2O no se relacionaron en forma significativa con ninguna de las variables edáficas incluidas en el presente análisis. La tasa $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ sólo se asoció significativa y positivamente con los niveles de Eh ($p=0,02$, $R^2=0,4$) (Fig. 2.5).

Los modelos explicativos de las emisiones de $\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2$ por denitrificación y de la tasa $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ que incluyen a todas las variables que suelen proponerse como controladoras de dichos procesos (WFPS, N-NO_3^- , C oxidable, C soluble, pH y Eh) son significativos ($p<0,05$), pero con grados bajos de ajuste, por lo que no se los presenta en el presente trabajo. Más aún, ningún modelo de regresión múltiple explica satisfactoriamente los cambios en las emisiones de N_2O .

Tabla 2.2. Análisis de varianza de los tratamientos de humedad y día de incubación sobre las emisiones diarias y acumuladas de N_2O+N_2 y de N_2O , y sobre la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$.

Efecto de la variable	Valor F	Valor p
Emisiones diarias de $N_2O + N_2$		
Nivel de humedad	10,94	0,003
Tiempo de incubación	1,37	0,26
Humedad X Día	0,75	0,68
Emisiones diarias de N_2O		
Nivel de humedad	7,94	0,008
Tiempo de incubación	6,06	0,0009
Humedad X Tiempo	0,91	0,52
$N_2O/(N_2O + N_2)$		
Nivel de humedad	16,85	0,008
Tiempo de incubación	3,87	0,42
Humedad X Tiempo	2,91	0,65
Emisiones de $N_2O + N_2$ acumuladas		
Nivel de humedad	8,08	0,02
Emisiones de N_2O acumuladas		
Nivel de humedad	1,44	0,31

2.3.4. Figuras

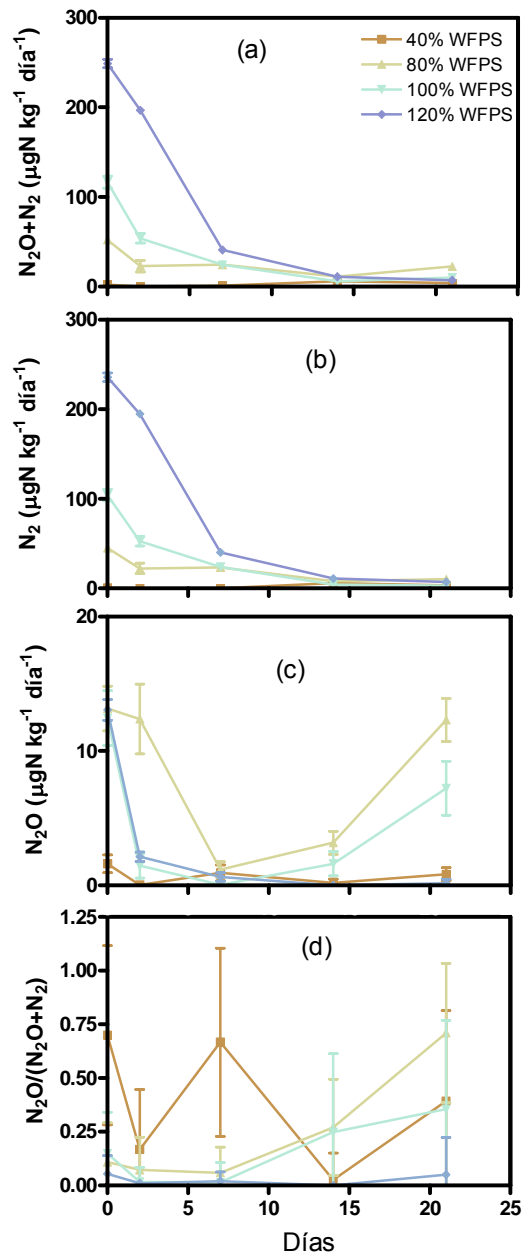


Figura 2.1. Emisiones de N_2O+N_2 por denitrificación (a), emisiones de N_2 (b), emisiones de N_2O (c) y tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ de las emisiones durante el período de incubación de 21 días, para los cuatro tratamientos de humedad. Los puntos son la media de tres repeticiones, con las barras verticales representando el error estándar de la media.

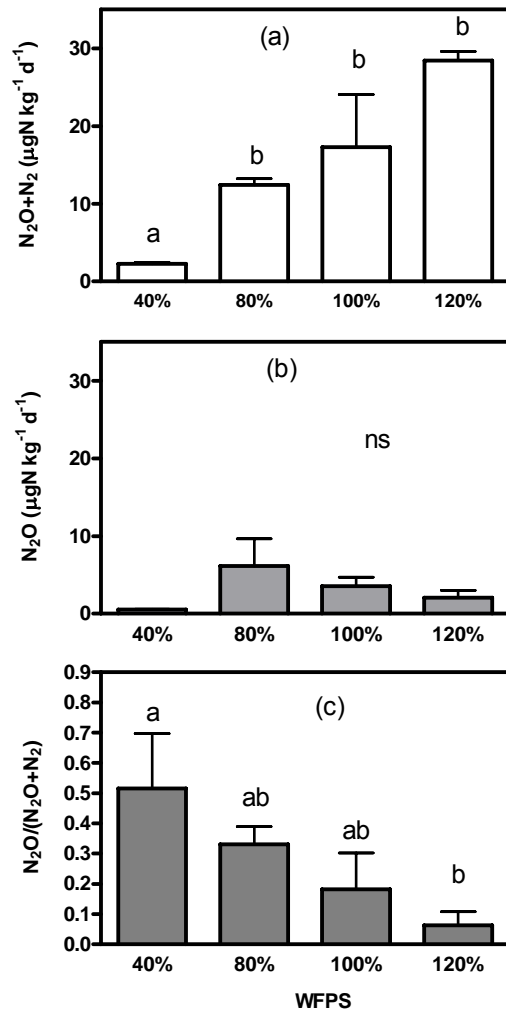


Figura 2.2. Emisiones acumuladas de N_2O+N_2 por denitrificación (a) de N_2O (b) y tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ promedio (c) para los 4 tratamientos de humedad. Las barras grandes representan la media de tres repeticiones, y las barras pequeñas el desvío estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

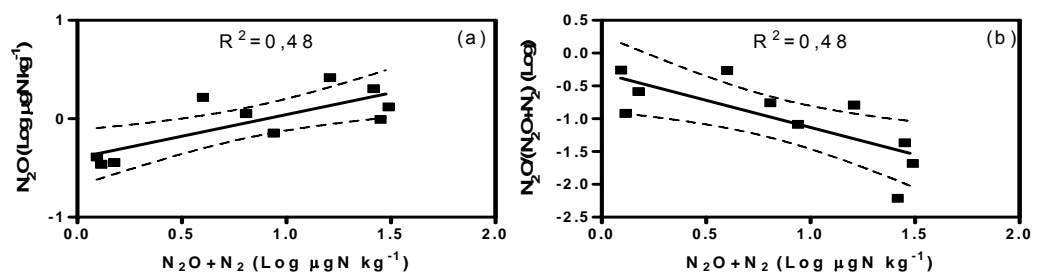


Figura 2.3. Relación entre las emisiones acumuladas de N_2O y las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 (a) y entre la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ promedio y las emisiones

acumuladas de N_2O+N_2 (b). Las 3 variables fueron log-transformadas para obtener su normalidad. Las líneas punteadas representan los intervalos de confianza de 95%.

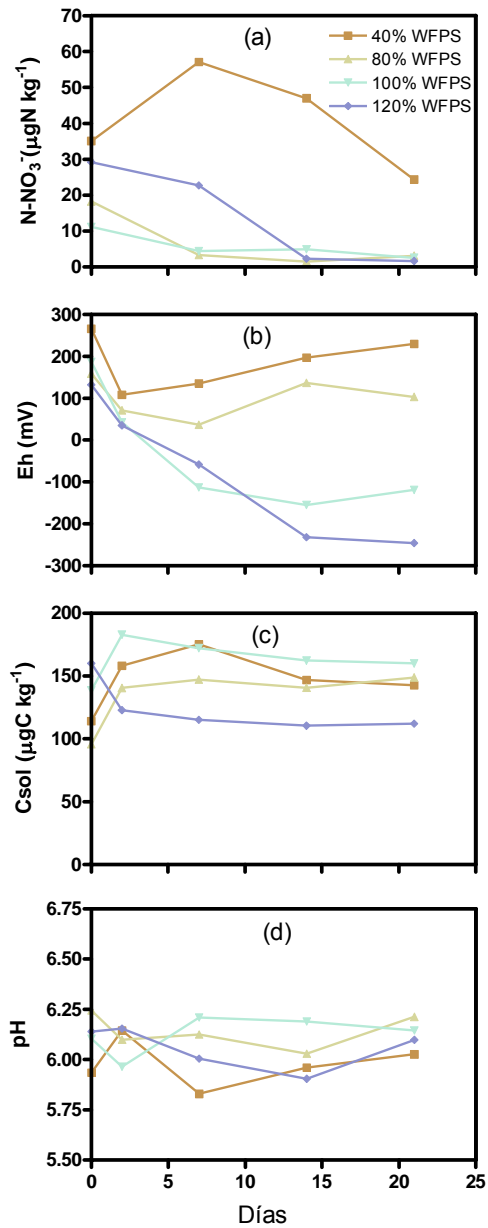


Figura 2.4. Evolución de los contenidos de $N-NO_3^-$ (a), potencial rédox Eh (b), contenidos de C soluble en K_2SO_4 (c) y valores de pH (d) durante la incubación para los cuatro tratamientos de humedad.

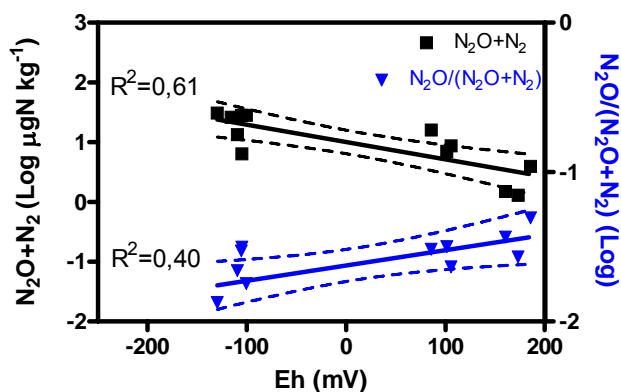


Figura 2.5. Relación entre las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 por denitrificación y la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ promedio, log-transformadas, y el Eh del suelo. Las líneas punteadas representan los intervalos de confianza de 95%.

2.4. Discusión

Las emisiones gaseosas por denitrificación presentaron alta variabilidad, lo que es común en estudios bajo condiciones de laboratorio como a campo (Estavillo *et al.*, 1994; Dambreville *et al.*, 2006). Las emisiones totales de N_2O+N_2 presentadas en este trabajo ($2,26-28,47 \mu\text{g N kg}^{-1}$ de suelo día^{-1}) están en el mismo rango de aquellos informados por Sainz el Rozas *et al.* (2001), quienes encontraron pérdidas por denitrificación de $14,64 \mu\text{g N kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ en cilindros intactos de suelo tomados de un suelo Argiudol típico de la Pampa Ondulada. Weier *et al.* (1993) encontraron emisiones por denitrificación tan bajas como $2,9 \mu\text{g N kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ desde cilindros de suelo rearmados, tomados de un suelo Argiudol típico a valores de humedad de 75% WFPS, pero estas emisiones alcanzaron valores de hasta $251 \mu\text{g N kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ a 90% WFPS.

Las emisiones de N_2O+N_2 por denitrificación disminuyeron con el tiempo, probablemente por deficiencia de los NO_3^- ; los niveles de N-NO_3^- en las situaciones de 80, 100 y 120% WFPS en los días 14 y 21 de la incubación bajaron hasta $1,66-3,13 \text{ mg}^{-1} \text{ kg}^{-1}$. Van Kessel *et al.* (1993) encontraron que concentraciones de N-NO_3^- menores a 10 mg kg^{-1} no fueron limitantes del proceso de denitrificación, pero que podrían serlo cuando las condiciones son muy favorables para la reducción de los mismos, mientras que Sainz Rozas *et al.* (2001 y 2004) citaron concentraciones umbrales de $18 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ y de $10,2 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$, respectivamente, en suelos argiudoles típicos de la región pampeana como limitantes para la denitrificación. La relación lineal negativa entre las emisiones de denitrificación y los niveles de N-NO_3^- se explicaría por el hecho de que la regresión se realizó entre las emisiones acumuladas y los contenidos medios de N-NO_3^- durante la incubación, por lo que el consumo de N-NO_3^- por los organismos denitrificadores, ligó altos niveles de denitrificación con situaciones de agotamiento de N-NO_3^- . Cuando se analizó la relación entre las emisiones diarias de N_2O+N_2 y los contenidos de N-NO_3^- en cada día la relación fue positiva cuando se excluyó el tratamiento de 40% WFPS, tratamiento en el cual coincidieron altos niveles de N-NO_3^- y bajas emisiones de N_2O+N_2 por denitrificación, dado que en este caso la limitación de la reacción estuvo probablemente dada por el status rédox del sistema suelo.

Las situaciones de alto contenido de humedad presentaron las mayores emisiones diarias y acumuladas de N por denitrificación, relacionadas a disminuciones

en los valores de potencial rédox, Eh. El valor de Eh al cual el O₂ molecular es reducido a H₂O, que indica el comienzo de las condiciones anaeróbicas, varía ampliamente, pero en soluciones de suelo este valor oscila entre 200 y 400 mV (Turner y Patrick, 1965). Sin embargo, en el primer día del experimento el Eh presentó valores relativamente altos (Fig. 2.4b), relacionados a condiciones oxidativas, y las mayores emisiones de N₂O+N₂ denitrificación. Esta contradicción puede depender del hecho que el N-NO₃⁻ se reduce a N-NO₂⁻ bajo valores de Eh tan altos como 350 mV (Smith *et al.*, 1983). Además, la determinación de Eh da un valor medio del sistema suelo, y la existencia de valores de Eh altos no excluye la presencia en estas muestras no disturbadas de “hot spots”, micrositos de alta actividad biológica dónde las pérdidas por denitrificación son muy elevadas (Parkin, 1987), debido a un potencial de reducción mayor que el resto de la matriz del suelo.

Las emisiones de N₂O+N₂ por denitrificación diarias (Fig. 2.1a) y acumuladas (Fig. 2.2a) se incrementaron con aumentos en la humedad, coincidiendo con otros autores, quienes encontraron que las tasas de denitrificación aumentan abruptamente si la WFPS excede el 60-80% (Shelton *et al.*, 2000; Olde Venterink *et al.*, 2002). En suelos Argiudoles típicos (Rodríguez y Giambiagi, 1995) y vérticos (Palma *et al.*, 1997) de la Región Pampeana, se hallaron tasas de denitrificación mayores en sistemas de siembra directa con respecto a labranza convencional, por mayores niveles de humedad en el primer caso, aunque en ningún caso estos llegaron a saturación. En complejos de suelos Paleudoles y Argiudoles de la Región Pampeana, Sainz Rozas *et al.* (2004) hallaron que el principal control de la presencia de plantas de maíz fue a través de la absorción intensa de agua, incluso en condiciones de fertilización con dosis tan altas como 210 kg N ha⁻¹. Las emisiones de N₂ estuvieron muy relacionadas a las emisiones totales por denitrificación, como puede verse en su evolución durante el período de incubación (Fig. 2.1b), y de la misma manera fueron afectadas por los niveles de humedad establecidos, coincidiendo con otros trabajos (Mathieu *et al.*, 2006).

Los emisiones de N₂O presentaron promedios diarios de 0,53, 5,84, 2,58 y 1,18 µg N kg⁻¹ de suelo día⁻¹ para los tratamientos de 40, 80, 100 y 120% WFPS, respectivamente. Carran *et al.* (1995) encontraron emisiones de N₂O de 6 a 9,05 µg N kg⁻¹ día⁻¹ en cilindros intactos de suelos franco limosos con contenidos de humedad de 70% WFPS, suelos que tenían por lo menos el doble de contenido de C y N que aquellos en el suelo del presente trabajo.

Las emisiones de N₂O presentaron un alto pico inicial luego del agregado del agua correspondiente a cada tratamiento, que se diferenciaron significativamente de las del resto de los días de la incubación. Se ha observado que la transición entre condiciones óxicas y anóxicas incrementa la formación de este intermediario indeseado (Otte *et al.*, 1996) debido una rápida actividad de los organismos denitrificadores (Webb *et al.*, 2004) en forma conjunta con importantes diferencias en la regulación de las enzimas que forman parte de la secuencia denitrificadora (Zumft, 1997). Está comprobado que la síntesis de la enzima óxido nitroso-reductasa por los organismos denitrificadores está retrasada en el tiempo con respecto a la síntesis de las enzimas nitrato y nitrito reductasa (Firestone y Tiedje, 1979; Dendooven y Anderson, 1995). Otra explicación posible es que el rehumedecimiento del suelo seco ocasiono un pulso de respiración, contribuyendo a la creación de sitios anaeróbicos. Jungkunst (2004) reportaron que grandes picos en la emisión de este gas se correlacionaban con caídas en el Eh en suelos bien drenados, y con aumentos en los valores de Eh de suelos pobremente drenados. Varios autores han reportado una gran producción inicial de N₂O que típicamente sigue al humedecimiento de un suelo seco (Davidson, 1992; Webb *et al.*, 2004) que puede llegar a ser de un valor de 1000 veces mayor que las emisiones anteriores o posteriores a dicha elevadísima producción

inicial, y que parecen derivar de procesos de denitrificación (Davidson, 1992). La observación de un flujo de CO₂ que sigue al humedecimiento (Groffman y Tiedje, 1988) apoya la idea de que el pico de emisiones de N₂O se debe a la actividad de organismos heterótrofos.

El importante aumento en las emisiones de N₂O en las condiciones de 80 y 100% WFPS en la última semana de incubación puede ser atribuido a una disminución en la capacidad de reducción del sistema suelo, debido a que el suelo saturado, 100% WFPS, o casi saturado, 80% WFPS, mantuvo contacto directo con la atmósfera, permitiendo cierto intercambio de O₂ con el suelo, que afecta en mayor medida a la actividad de la enzima óxido nitroso reductasa que al resto de las enzimas de la secuencia denitrificatoria (Zumft, 1997), disminuyendo las posibilidades de reducción del N₂O a N₂. De hecho, aunque no se observó una relación significativa entre las emisiones de N₂O y el valor de Eh, en los valores medidos de Eh se observa un sistema suelo más reductor en las condiciones de anegamiento (Fig. 2.4b). Dado que Armstrong (1967) encontró que pequeños incrementos en la concentración de O₂ generaban grandes aumentos en los valores de Eh, especialmente a bajos contenidos de O₂ del suelo, se puede concluir que el mayor Eh medio bajo los contenidos de humedad de 80 y 100% WFPS con respecto a aquel bajo 120% WFPS se debió a una mayor entrada de oxígeno al sistema.

Las emisiones de N₂O fueron influenciadas por el nivel de humedad, siendo la condición de 80% WFPS la que presentó las mayores emisiones de este gas. Varios autores coinciden en valores cercanos al de 80% WFPS como los de mayor potencial de emisión de N₂O (McSwiney *et al.*, 2002; Dobbie y Smith, 2003a; Khalil y Baggs, 2005). Las condiciones de humedad de 80 y 100% WFPS presentaron valores promedio de Eh de 108 y -63 mv, lo que coincide con estudios de laboratorio donde las máximas emisiones de N₂O se dan a valores de Eh de alrededor de 0 mv (Kralova *et al.*, 1992). Los suelos anegados, 120% WFPS, que tuvieron menores emisiones de N₂O que los suelos bajo condiciones de 80 y 100% WFPS, presentaron valores de Eh significativamente inferiores al resto de los tratamientos de humedad, coincidiendo con Jungkunst (2004). Dalal *et al.* (2003) propusieron que la relación general entre las emisiones de N₂O y el WFPS presenta la forma de una función cuadrática, con el máximo bajo condiciones de humedad de 80-90% WFPS, lo que coincide con lo hallado en el presente trabajo donde las emisiones acumuladas presentan una forma aproximadamente cuadrática con la humedad (Fig. 2.2b). Este tipo de relación también fue hallada por del Prado *et al.* (2006), quienes estimaron un máximo de emisiones con niveles de humedad del 75% WFPS. Por el contrario, otros autores hallaron una relación lineal (Dobbie y Smith, 2001; Liu *et al.*, 2006) y exponencial (Dobbie y Smith, 2003a), con valores máximos de WFPS entre 90 y 100%.

En el presente trabajo la presencia de una capa de agua superficial disminuyó las emisiones totales de N₂O con respecto a las situaciones de 80 y 100% WFPS, posiblemente a través de un mayor potencial de reducción de este óxido nitrogenado. En un trabajo clásico, Armstrong (1967) concluyó que mientras existe cierta provisión constante de oxígeno, una capa de suelo oxidante puede ser mantenida en la presencia de muy bajos niveles de oxígeno, condición que probablemente ocurrió en las condiciones de 80 y 100% WFPS; ha sido probado que la provisión de O₂ a sistemas con bajos niveles del mismo redujo fuertemente y en forma inmediata la producción de N₂ por organismos denitrificadores típicos como *Alcaligenes faecalis* y varias especies de *Pseudomonas*, con un simultáneo incremento en la producción de N₂O (Otte *et al.*, 1996; Cavigelli y Robertson, 2001). En un trabajo reciente Xu *et al.* (2004) hallaron emisiones de N₂O de entre 6 y 7,5 veces menores en suelos continuamente inundados con respecto a suelos insaturados, atribuyendo este comportamiento a fuertes condiciones anaeróbicas en los suelos anegados que promovieron la reducción del N₂O a N₂. La capa superficial también dificulta

seriamente la difusión ascendente de los gases nitrogenados (Yan *et al.*, 2000), lo que podría contribuir a una disminución en el escape de N_2O y aumentar la probabilidad de su reducción a N_2 , concepto apoyado por la mayor emisión de gas N_2 en la situación de anegamiento con respecto a las situaciones de 80 y 100% WFPS (Fig. 2.1b).

Se ha propuesto que la emisión de N_2O está afectada en mayor medida por la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ de la denitrificación que por la magnitud total de dicho proceso (Bandibas *et al.*, 1994). Sin embargo, en el presente trabajo la variabilidad en las emisiones acumuladas de N_2O se explicó significativamente con las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 por denitrificación; la asociación entre las emisiones acumuladas de N_2O y la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ no fue tan clara, coincidiendo con el modelo de Firestone y Davidson (1989) en el cual se sugiere que la tasa de denitrificación es un factor más importante para determinar las emisiones de N_2O que la proporción de N_2O en los productos finales o que la difusión de los gases hacia la atmósfera. Tasas de denitrificación muy altas o muy bajas, como bajo los contenidos de humedad de 120% WFPS y 40% WFPS, parecen ser determinantes en las emisiones de N_2O más allá de los productos finales de este proceso. Sin embargo, la evolución de las emisiones de N_2O sobre el final de la incubación sugiere que la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ puede aumentar su importancia sobre estas emisiones en períodos de tiempo mayores a una semana, especialmente bajo los contenidos intermedios de humedad de 80 y 100% WFPS. Granli y Bøckman (1994) propusieron que aunque aumentos en la humedad disminuyen la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ de la denitrificación, el efecto general es un incremento en las emisiones de N_2O debido a una mayor denitrificación total; los resultados del presente trabajo coinciden fuertemente con estos autores en los suelos no saturados entre los contenidos de humedad de 40 y 80% WFPS. Por el contrario, aumentos del contenido de humedad entre 80 y 120% WFPS llevaron a disminuciones de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ que contrarrestaron las mayores emisiones totales por denitrificación, resultando en menores emisiones de N_2O y mayores de N_2 .

Las emisiones de N_2O bajo el nivel de humedad de 40% WFPS fueron notablemente bajas, cercanas al límite de detección luego del primer día de incubación, emisiones que fueron probablemente generadas por procesos de nitrificación, señalado como el principal proceso responsable de las emisiones de N_2O desde suelos bien aireados, por condiciones más favorables para los organismos nitrificadores que para los denitrificadores heterotróficos típicos (McTaggart *et al.*, 1997; Khalil y Baggs, 2005). Es claro que los organismos nitrificadores reducen óxidos de N bajo contenidos de O_2 mayores que los denitrificadores típicos (Sutka *et al.*, 2006). Aunque no fueron medidas en este trabajo, es probable que las emisiones de óxido nítrico, NO, contribuyan en forma importante a las emisiones de gases nitrogenados bajo contenidos de humedad de 40% WFPS, fundamentalmente como resultado de procesos de nitrificación (Skiba *et al.*, 1993). Las bajas emisiones de N_2O bajo el nivel de humedad de 40% WFPS contribuyen a apoyar la idea de que el principal proceso formador de este gas en los suelos es la denitrificación. Dobbie y Smith (2001) concluyeron que valores elevados de emisiones de N_2O se relacionan definitivamente con procesos de denitrificación. Clemens y Huschka (2001) hallaron que agregados de material carbonado estimularon las emisiones de N_2O en suelos con contenidos de humedad entre 35 y 71% WFPS, lo que hace pensar que estas emisiones estuvieron dominadas por la actividad de organismos heterótrofos como los denitrificadores típicos. En estudios relacionados a los procesos generadores de N_2O a través del uso de ^{15}N se ha encontrado que la denitrificación es el principal proceso formador de N_2O desde suelos con WFPS variable entre 65 y 85% (Stevens y Laughlin, 2001; Bergsma *et al.*, 2002).

La tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ aumentó con el tiempo luego de una pequeña caída inicial los primeros dos días de la incubación para las condiciones de 80 y 100%

WFPS. Weier *et al* (1993) encontraron en general una caída de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ con el paso del tiempo para contenidos de agua entre 60 y 90% WFPS de suelos fertilizados con 50 y 100 kg N ha⁻¹, aunque dicho trabajo se realizó en un período de incubación corto, de cinco días solamente; a las mismas conclusiones llegaron Holtan-Hartwig *et al.* (2000), pero la duración de la incubación en este ensayo fue de tan solo setenta horas. Estos resultados coincidirían con la pequeña caída inicial de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ observada, y que se corresponde con los tiempos necesarios para la formación de la enzima óxido nitroso-reductasa (Firestone y Tiedje, 1979; Dendooven y Anderson, 1995). La evolución de las emisiones de N_2O , así como la de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ pueden ser satisfactoriamente explicadas por los tiempos requeridos para la síntesis de novo de las enzimas hasta el séptimo día de incubación; luego de este tiempo, estas emisiones parecen explicarse mejor por los factores que afecten la actividad de las enzimas formadas, tales como la aireación o los niveles de $N-NO_3^-$ en los distintos tratamientos de humedad, más que en la dinámica de la formación de las diferentes enzimas de la cadena denitrificatoria.

El comportamiento de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ en el tiempo sintetiza la evolución de las emisiones de N_2O+N_2 por denitrificación y de las emisiones de N_2O . La alta producción inicial de N_2O en los tratamientos de 80 y 100% WFPS estuvo generada por una alta denitrificación inicial, por lo que esto no se refleja en una alta tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ inicial. Esto indicaría que en situaciones donde el 80 o 100% de los poros estuvieron ocupados por agua, las altas condiciones reductoras durante los primeros días del humedecimiento permitieron completar la reacción denitrificadora, reduciendo no sólo los NO_3^- sino también gran parte del N_2O antes de que este sea emitido desde el suelo. Luego del séptimo día de incubación, en condiciones de humedad de 80 y 100% WFPS las emisiones de N_2O+N_2 disminuyeron bruscamente, mientras que las emisiones de N_2O aumentaron, indicando un cambio en la funcionalidad de las distintas enzimas participantes del proceso de denitrificación y asociando situaciones de bajos niveles de denitrificación con altas tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$. Smith y Arah (1992) también concluyeron que la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ disminuye cuando las emisiones de N_2O+N_2 aumentan. Puede concluirse entonces que las mayores tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$ se dieron cuando las magnitudes del proceso denitrificatorio fueron moderadas, y el suelo no alcanzó condiciones reductoras suficientes para reducir el N_2O formado.

La tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ bajo el tratamiento de humedad de 40% WFPS fue mayor al resto de los tratamientos; sin embargo debe considerarse que el acetileno inhibe la nitrificación autotrófica (Klemetdsson *et al.*, 1988), por lo que en el caso de suelos bien aireados las emisiones de N_2O+N_2 podrían estar subestimadas y en consecuencia la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ sobreestimada. La baja tasa de emisión relativa $N_2O/(N_2O+N_2)$ en el tratamiento de 120% WFPS se debe probablemente a que las fuertes condiciones anaeróbicas creadas por la presencia de una capa de agua superficial, promovieron la reducción de N_2O a N_2 , como fue sugerido por Xu *et al.* (2004). Esto se confirma en el presente trabajo en los muy bajos niveles de Eh, de alta reducción, encontrados en las situaciones de anegamiento en el presente trabajo, y en la clara relación lineal positiva entre la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ y los valores de Eh (Fig. 2.5). Weier *et al.* (1993) encontraron las menores tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$ con los mayores niveles de humedad, aunque los mayores valores de humedad edáficos que se usaron no llegaron a los niveles de saturación (90% WFPS). Elmi *et al.* (2003) encontraron en suelos entisólicos de Canadá valores promedio de $N_2O/(N_2O+N_2)$ de 0,65 en el año 1999, donde los valores de WFPS fueron en general menores a 30%, mientras que en el año 2000, donde los valores de WFPS superaron el 50%, esta tasa tuvo un valor promedio de 0,43.

Las pérdidas por denitrificación y las emisiones de N_2O se relacionaron escasamente con otras variables edáficas como el C orgánico total, el C orgánico

soluble y el pH, de la misma manera que lo hallado por otros autores (del Prado *et al.* (2006); Mathieu *et al.*, 2006). La tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$, como las emisiones totales por denitrificación o solamente de N_2O , no fueron satisfactoriamente explicadas por ningún modelo de regresión múltiple. Se ha probado que el análisis de la respuesta de las emisiones de gases nitrogenados a variables únicas es de mayor utilidad que el uso de técnicas de regresión lineal múltiple. Usando regresión lineal múltiple, Mathieu *et al.* (2006) pudieron explicar únicamente el 22% de la varianza de las emisiones de N_2O , coincidiendo con otros autores (Clayton *et al.*, 1997; Shepherd *et al.*, 1991). La razón para la pobre explicación de los modelos de regresión para las emisiones gaseosas de N desde el suelo parece ser que cualquiera de las variables que controlan el proceso puede volverse limitante en diferentes momentos. Correlaciones muy débiles de la denitrificación con variables de campo probablemente se relacionen a la combinación compleja de temperatura, estructura del suelo, concentración de $N-NO_3^-$, aireación y contenido de humedad, cada factor variando espacial y temporalmente y teniendo efectos independientes en la denitrificación (Liang y Mackenzie, 1997). La incapacidad de poder medir propiedades edáficas como concentraciones de nutrientes o potencial redox en los micrositos contribuye a la poca explicación hallada de la variabilidad de las tasas de denitrificación (Grundmann *et al.*, 1988). Otro factor que no permite hallar correlaciones claras es el hecho que algunos organismos denitrificadores bajo condiciones anaeróbicas absorben los NO_3^- en exceso y difieren en el tiempo su reducción a N_2O o N_2 (Ellis *et al.*, 1996). El entrampado de gas en el agua o dentro de los agregados, la adsorción del N_2O sobre los coloides o la imposibilidad de medir los productos gaseosos en suelos húmedos puede complicar aún más el intento de hallar correlaciones claras (Qian *et al.*, 1997).

2.5. Conclusiones

El régimen hídrico influyó considerablemente en las emisiones de N gaseoso, aumentando las emisiones por denitrificación con aumentos en el tenor hídrico hasta la presencia de agua superficial, confirmando la primera hipótesis propuesta. Las emisiones de N_2O fueron máximas con contenidos de humedad de 80% WFPS, donde las condiciones no fueron lo suficientemente reductoras como para llevar a cabo la transformación del N_2O a N_2 . La presencia de una capa de agua superficial no disminuyó significativamente las emisiones acumuladas de N_2O , solamente lo hizo con las emisiones diarias el último día de incubación, confirmando parcialmente la segunda hipótesis propuesta.

Los resultados mas importantes y novedosos del capítulo se vincularon a la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ de las emisiones. La presencia de una capa de agua superficial disminuyó significativamente la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$, que nunca había sido medida bajo esas condiciones, confirmando la segunda hipótesis propuesta. Esta disminución en la tasa se relacionó fuertemente a menores valores de Eh, que nunca había sido medido en forma conjunta con dicha tasa.

La tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$, inversamente a las emisiones de N_2O+N_2 , disminuyó con incrementos en la humedad, por lo que situaciones de altas emisiones de N_2O+N_2 se asociaron a bajas tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$. El balance entre ambos componentes resultó, ante aumentos de la humedad, en mayores emisiones de N_2O en condiciones de no saturación hídrica, y en menores emisiones de N_2O entre contenidos de humedad de 80 y 120% WFPS.

Las emisiones de gases nitrogenados por denitrificación brindaron una adecuada explicación de la variabilidad en las emisiones de N_2O , especialmente con contenidos de humedad de 40 y 120% WFPS, mientras que la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ pareció influir en mayor medida en estas emisiones después de la primer semana de incubación, y especialmente en los contenidos de humedad intermedios, 80 y 100%

WFPS. Tasas de denitrificación muy altas o muy bajas, como en los suelos con los tratamientos de humedad de 120 y 40% WFPS, respectivamente, parecen ser determinantes en las emisiones de N_2O más allá de los productos finales de este proceso.

3. Capítulo 3. Manejo de la fertilización nitrogenada y emisiones de gases nitrogenados

3.1. Antecedentes, objetivos e hipótesis específicos del capítulo 3: Emisiones de gases nitrogenados y manejo de la fertilización nitrogenada

3.1.1. Antecedentes Específicos

3.1.1.1. Fertilización nitrogenada y agricultura

El uso de fertilizantes para la producción agrícola en la Argentina ha aumentado severamente en los últimos años, llegando el consumo del 2004-2005 a 2.570.000 tn (Gudelj *et al.*, 2006). La eficiencia de uso del N y las pérdidas de N de los suelos están íntimamente ligadas (Dalal *et al.*, 2003). La baja eficiencia de la fertilización nitrogenada en sistemas agrícolas es primariamente causada por las altas pérdidas de N en formas gaseosas (Mosier *et al.*, 1996). La denitrificación es considerado el proceso más relevante luego de la aplicación de fertilizante a suelos húmedos (Dittert *et al.*, 2005; del Prado *et al.*, 2006), lo que parece lógico en situaciones donde no existen movimientos de agua descendentes importantes. Los suelos fertilizados son contribuyentes substanciales de las emisiones de N₂O a la atmósfera y son la única fuente atmosférica biogénica de este gas que puede ser rápidamente manipulada (Skiba *et al.*, 1993).

3.1.1.2. Disponibilidad de N-NO₃⁻ y producción de N₂ y N₂O

La mayor parte de los NO₃⁻ en el suelo son altamente susceptibles de lixiviarse o reducirse si no son absorbidos rápidamente por los vegetales (Simek y Cooper, 2001). La importancia crítica de las concentraciones de NO₃⁻ como control de la denitrificación está bien documentada (Weier *et al.*, 1993). Tasas relativamente altas de denitrificación han sido asociadas con contenidos de N-NO₃⁻ superiores a 5 mg kg⁻¹ en suelos de la Pampa Ondulada (Rodríguez, 1997). Sainz Rozas *et al.* (2001 y 2004) citaron concentraciones umbrales de 18 mg N-NO₃⁻ kg⁻¹ y de 10,2 mg N-NO₃⁻ kg⁻¹, respectivamente, en suelos argiudoles típicos en cultivos de maíz de la región pampeana como limitantes para la denitrificación. Dobbie y Smith (2003a) hallaron que flujos de N₂O importantes sólo ocurrían con WFPS mayores a 65% y con concentraciones de NO₃⁻ mayores a 5 mg N-NO₃⁻ kg⁻¹, resaltando la importancia de valores "umbral" de los controles de estas emisiones.

La generación de NO₃⁻ y NO₂⁻, los sustratos de la reacción de denitrificación, presenta una importancia particular en las pérdidas de N gaseoso. Aquellos hábitats constantemente anaeróbicos limitan la denitrificación a causa de que la nitrificación se ve bloqueada por lo que no se generan NO₃⁻ (Reddy y Patrick, 1984; Aulakh *et al.*, 2000), que son el sustrato de la denitrificación y el producto de la nitrificación. Además, la nitrificación es uno de los procesos que consume O₂ del suelo, lo que podría contribuir a generar condiciones favorables para la denitrificación (Vermoesen *et al.*, 1996), aunque la importancia de este efecto no ha sido considerada en la bibliografía. Ambos procesos se relacionan también debido a que algunos organismos nitrificadores pueden generar N₂O bajo determinadas condiciones de aireación durante la oxidación del NH₄⁺ (Poth y Focht, 1985). El entendimiento de las interacciones de los procesos oxidativos y reductivos a nivel micrositio es fundamental para entender los mecanismos de producción y emisión de N₂O desde los suelos (Azam *et al.*, 2002).

Es probable que bajas concentraciones de NO₃⁻ estimulen la reducción del N₂O a N₂ (Gaskell *et al.*, 1981). A medida que aumenta el porcentaje de NO₃⁻ que se pierden por denitrificación, o sea a medida que el suelo se va quedando sin NO₃⁻, la relación N₂O/(N₂O+N₂) disminuye, y el N₂ pasa a ser el principal gas producido (Weier *et al.*, 1993; Stevens y Laughlin, 1998). Schlegel (1992) explica este fenómeno concluyendo que los NO₃⁻ son preferidos con respecto al N₂O como aceptor de electrones. Blackmer y Bremner (1978; 1979) concluyeron que bajas concentraciones de NO₃⁻ pueden retardar la reducción de N₂O a N₂, mientras que altas concentraciones inhibirían casi completamente este proceso, y que el efecto inhibitorio de los NO₃⁻ en la

reducción del N_2O se acentúa marcadamente con disminuciones en el pH, coincidiendo con otros autores (Stevens y Laughlin, 1998). Este efecto de la concentración de NO_3^- puede ser moderado por el aumento en las condiciones reductoras del medio, como observó Weier *et al.* (1993) tras el agregado al suelo de glucosa, fuente inmediata de electrones para las bacterias.

3.1.1.3. Fertilización nitrogenada y emisiones de N_2 y N_2O

Las elevadas fertilizaciones llevan a altas emisiones por denitrificación y existen numerosos trabajos que apoyan esta afirmación (Vermoesen *et al.*, 1996; Bergstrom *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002, Estavillo *et al.*, 2002). Palma *et al.* (1997) observaron que las pérdidas por denitrificación en suelos de la región pampeana aumentaban con la aplicación de fertilizante nitrogenado. Los autores encontraron además una elevada correlación entre la producción de N_2 y N_2O y del sustrato $N-NO_3^-$; en los suelos fertilizados encontraron una mayor biomasa denitrificadora, debido a una mayor concentración de NO_3^- causada por los fertilizantes.

Las emisiones de N_2O están también fuertemente relacionadas a los niveles de fertilización nitrogenada (Dittert *et al.*, 2005; Malla *et al.*, 2005; del Prado *et al.*, 2006; Chu *et al.*, 2007) y se considera que la adición de fertilizantes nitrogenados es el principal control en las emisiones de N_2O en suelos agrícolas (Meng *et al.*, 2005). Tanto la nitrificación como la denitrificación son estimuladas directamente cuando se aplican fertilizantes nitrogenados (Yan *et al.*, 2000, Hong *et al.*, 2002). Generalmente, se observa que las emisiones de N_2O son mayores durante los primeros días post-fertilización y luego disminuyen con el tiempo pasado luego de la fertilización acercándose a los valores “background” (Malla *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Drury *et al.* (2006).

Las emisiones de N_2O son controladas básicamente por una compleja interacción entre los niveles de N mineral del suelo y los contenidos de humedad y de C disponible, que modulan los procesos generadores de N_2O , la denitrificación y la nitrificación (Bandibas *et al.*, 1994). En general los efectos de la fertilización son mayores en suelos húmedos y más débiles en suelos secos. Niveles de humedad en profundidad mayores determinaron mayores emisiones de N_2O cuando el fertilizante fue aplicado en profundidad en suelos molisoles de Canadá (Drury *et al.*, 2006) y de Japón (Chu *et al.*, 2007). A su vez, Weitz *et al.* (2001) hallaron sólo pobres relaciones entre las emisiones de N_2O y los valores de WFPS en suelos no fertilizados, mientras que en suelos fertilizados esta relación fue intensa.

Con respecto a la influencia de los distintos tipos de fertilizantes sobre las emisiones de N_2O , Mosier *et al.* (1996) sugirieron que las cantidades de N_2O producidas son más afectadas por las propiedades del suelo y su manejo que por el tipo de fertilizante. Con el objetivo de medir las emisiones relativas de N_2O de aplicaciones de distintos tipos de fertilizantes nitrogenados (sulfato de amonio, nitrato de calcio y urea), Bergstrom *et al.* (2001) no encontraron diferencias significativas en las tasas de emisión de este gas generadas por el uso de fertilizantes distintos; dichas emisiones fueron más afectadas por los patrones temporales de contenido de agua y temperatura edáfica. En un trabajo con suelos franco arcillosos de Escocia, Dobbie y Smith (2003b) reportaron que los efectos de diferentes tipos de fertilizante nitrogenado sobre las emisiones de N_2O no eran consistentes durante el año; sin embargo, concluyeron que en condiciones húmedas el uso de fertilizantes en base a NH_4^+ puede reducir las emisiones de N_2O .

La aplicación de fertilizantes nitrogenados también puede llevar a cambios en la química de suelos, los cuales se manifiestan fundamentalmente a través de la reacción del suelo (Simek y Cooper, 2001; Meng *et al.*, 2005). Los compuestos Sulfato, Cloruro y Nitrato de Amonio causan un inmediato incremento en la acidez

después de la aplicación debido al efecto salino en los coloides del suelo (Khonje *et al.*, 1989). En adición, es bien conocido el efecto acidificante de la reacción de nitrificación del NH_4^+ , liberando al medio dos H^+ por cada molécula de NH_4^+ oxidada. Bergstrom *et al.* (2001) sugieren que debe analizarse la importancia de los cambios en el pH del suelo derivados de la fertilización nitrogenada sobre las emisiones de N_2O .

Existen muy pocos antecedentes acerca de la influencia de los fertilizantes sobre la relación de emisiones $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$. Los pocos estudios sobre el tema concluyen que la aplicación de NO_3^- disminuye las posibilidades de reducción del N_2O a N_2 (Bandibas *et al.*, 1994) y aumentan la tasa $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ (Weier *et al.*, 1993). En un estudio en suelos franco arenos-arcillosos de España, Estavillo *et al.* (2002) hallaron que la aplicación del fertilizante Nitrato de amonio calcáreo aumentó la relación $\text{N}_2\text{O} / (\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ de 0.34 a 0.52, siendo el N_2 el componente principal de los gases emitidos en suelos no fertilizados. Por el contrario, Ellis *et al.* (1998) concluyeron que el gas N_2 representó una porción importante de los productos finales de la denitrificación luego de la aplicación de 60 kg N de Nitrato de Amonio por hectárea, aunque no se pudieron comparar las emisiones de ambos gases debido a diferentes escalas de tiempo de las mediciones.

La búsqueda de las mejores prácticas de fertilización es imprescindible para minimizar las emisiones agrícolas de N_2O (Liu *et al.*, 2006). A escala de campo, la inhibición directa de las reacciones de reducción de los NO_3^- no es factible, y la única opción posible para reducir las pérdidas gaseosas es limitar aumentos excesivos en las cantidades de NO_3^- presentes (Simek y Cooper, 2001). Se ha observado que aplicaciones fraccionadas en dos momentos en sistemas irrigados de producción de algodón, llevaron a mayores rendimientos y eficiencia de absorción del N (Snyder, 2006) probablemente debido a menores emisiones gaseosas en dichas condiciones de elevados niveles conjuntos de agua y N mineral. La aplicación fraccionada de fertilizante nitrogenado con mayor frecuencia y con menores tasas podría reducir valores elevados o picos en la concentración de NO_3^- edáfico (Dalal *et al.*, 2003) y por lo tanto aumentar los niveles de conversión de N_2O a N_2 en condiciones de campo. Sin embargo, en condiciones de anaerobiosis, este efecto carecería de importancia debido a las fuertes condiciones reductoras que promoverían una reducción intensa del N_2O . Por otro lado, si el fertilizante contiene NH_4^+ en su composición, la baja nitrificación en condiciones anaeróbicas también conduciría a bajos niveles de NO_3^- edáficos.

3.1.2. Objetivo específico

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la naturaleza química y el fraccionamiento de la aplicación de fertilizantes nitrogenados bajo diferentes contenidos de humedad sobre las emisiones de N_2O , N_2 y la tasa $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$.

3.1.3. Hipótesis específicas

- I) La aplicación fraccionada de fertilizante nitrogenado disminuirá los niveles medios de N-NO_3^- y limitará las disminuciones de valores de pH que típicamente ocurren luego de la fertilización nitrogenada, y de esta manera disminuirán las emisiones de N_2O y la tasa $\text{N}_2\text{O} / (\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$
- ii) La forma de aplicación y la naturaleza del fertilizante nitrogenado no afectarán los productos finales de las emisiones de gases nitrogenados en la presencia de agua sobrenadante, dada la fuerte estimulación de la reducción del N_2O bajo las fuertes condiciones reductoras en esa situación.

3.2. Metodología específica

3.2.1. Muestreo y acondicionamiento del suelo

El suelo es un Hapludol típico del establecimiento El Sosiego, del Partido de 25 de Mayo de la Provincia de Buenos Aires (S 35° 22' 38,9'', O 60° 03' 48,5''), de textura franco arenosa, con 750 g kg^{-1} , 100 g kg^{-1} y 150 g kg^{-1} de arena, limo y arcilla respectivamente, y cuyas principales características se presentan en la Tabla 3.1. Al

momento del muestreo, el día 7 de Abril de 2004, el suelo se encontraba en período de barbecho, con rastrojos de maíz cosechado la primera semana de Marzo, sin presencia importante de malezas verdes.

TABLA 3.1: Características generales del suelo.

N-NO ₃ ⁻ (mg kg ⁻¹)	Corg (%)	Dens ap(g cm ⁻³)	HE (%)	WFPS(%) a HE	P ext. (mg kg ⁻¹)
19,79	0,86	1.102	17%	32%	14,9

3.2.2. Tratamientos e incubación del suelo

El diseño del experimento es completamente aleatorizado con arreglo factorial, con los factores fertilización y humedad, con tres repeticiones. La combinación de los tratamientos dio como resultado un factorial de 5 (niveles de fertilización) x 3 (regímenes de humedad) = 15 tratamientos.

Niveles de fertilización

F0. Sin fertilización

CU. Fertilización en una cantidad similar a lo incorporado en cultivos de alto rendimiento. Esta cantidad se estima en 80 kg de N por hectárea en forma de Urea. Esta cantidad se aplica por única vez al inicio del experimento.

FU. Fertilización con Urea en una cantidad similar al nivel del punto anterior, pero fraccionada en cantidades de 16 kg de N/ha, a aplicar al inicio del experimento, a 2 días, a los 5 días, a los 10 días y a los 20 días.

CN. Fertilización con 80 kg de N por hectárea en forma de Nitrato de Potasio, KNO₃. Esta cantidad se aplica por única vez al inicio del experimento.

FN. Fertilización con KNO₃ en una cantidad similar al nivel del punto anterior, pero fraccionada en cantidades de 16 kg de N/ha, a aplicar al inicio del experimento, a 2 días, a los 5 días, a los 10 días y a los 20 días.

Regímenes de humedad

H32 suelo con el 32% del WFPS

H100 Suelo con el 100 % del espacio poroso ocupado por agua (saturado)

H120 Suelo saturado con 2 cm de agua superficial (anegado)

La forma de obtener los contenidos de humedad objetivos, como la forma de mantenerlos en esos niveles, es similar al capítulo anterior. El contenido de agua de 32% WFPS corresponde a un valor cercano a capacidad de campo; la capacidad de campo es a menudo usada como límite entre ambientes predominantemente aeróbicos o anaeróbicos (Linn y Doran, 1984). Los cilindros asignados a situaciones de anegamiento fueron encastrados herméticamente en su parte superior por otra pieza cilíndrica de PVC de 5 cm de largo y un diámetro interno algo superior al cilindro base, con el objeto de permitir el exceso de agua superficial de 2 cm de altura. Se agregó agua destilada a los cilindros de suelo, cuidando de minimizar la alteración del suelo y el entrapado de gas, hasta llegar al nivel de humedad asignado. El agregado de agua fue llevado a cabo al menos 2 horas antes de comenzar con la acumulación de gas en el espacio interno de la cámara, para minimizar posibles pulsos gaseosos.

La dosis de N se inyectó diluido en las cantidades previstas en soluciones acuosas de 1 g ml⁻¹ y 0.25 g ml⁻¹ de Urea y KNO₃, respectivamente, a 1 cm de profundidad. Estas cantidades de solución fueron lo suficientemente pequeñas para no alterar el WFPS propuesto para cada tratamiento de humedad. Las pérdidas por volatilización de N-NH₃ son negligibles cuando la urea se aplica en forma líquida, en condiciones de humedad del suelo media-altas, y valores de pH no alcalinos (Fenn y Hossner, 1985), por lo que se considera que las pérdidas de N por esta vía son cercanas a cero en este trabajo.

El experimento se realizó en cuartos de crecimiento, donde la temperatura osciló entre 18 y 22 °C. Se realizaron tres mediciones por tratamiento de pérdidas de nitrógeno por denitrificación y emisiones de óxido nitroso al día 1, a los 6 días, 9 días,

14 días y 21 días del experimento. Los frascos con los cilindros permanecieron expuestos a la atmósfera entre mediciones y su humedad fue corregida regularmente para subsanar las pérdidas por evaporación.

3.2.3. Pretratamientos y determinaciones químicas

Las muestras de suelo adicionales fueron sometidas a las siguientes determinaciones básicas según las metodologías descritas en el Capítulo 1:

- pH en agua en relación suelo:agua 1:2,5 (Thomas, 1996)
- Carbono orgánico total (Nelson y Sommers, 1996)
- Carbono orgánico soluble en K_2SO_4 0,5M (Dambreville *et al.*, 2006). La urea puede interferir en la determinación de C soluble, dado que el C de la urea es tomado como C soluble del suelo (Mulvaney *et al.*, 1997)
- N- NO_3^- (Carole and Scarigelli 1971).
- N- NH_4^+ soluble+intercambiable (Richter, 1980).

3.2.4. Cálculos y análisis estadísticos

Se realizaron diagnósticos de influencia (Myers, 1986), y luego se evaluó nuevamente el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas para las variables estudiadas. Se realizaron con el procedimiento PROC REG del programa SAS análisis de regresión simple entre las variables respuesta, emisiones totales (N_2O+N_2) por denitrificación, emisiones de N_2O y tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$, y las distintas variables químicas edáficas medidas. También se realizó un análisis de regresión múltiple con el procedimiento PROC REG, con el objetivo de encontrar a las variables edáficas que expliquen en mayor medida la variabilidad de las emisiones de N_2O y las pérdidas por denitrificación. Los diagnósticos de multicolinealidad fueron hechos previamente a los distintos análisis de regresión, y luego se eligió el modelo más adecuado dentro de todos los modelos existentes posibles con las variables explicatorias, de acuerdo a los criterios de C_p de Mallows (Mallows, 1973), CME y coeficiente de determinación R^2 ajustado por el número de parámetros (MacNeil, 1983). Debido a que las mediciones de las emisiones gaseosas fueron realizadas en las mismas macetas a lo largo de la incubación, el modelo estadístico elegido fue el de medidas repetidas; sin embargo debido a que los datos no cumplían las condiciones de esfericidad, de Huynh-Feldt y de Greenhouse-Geisser (Huynh y Feldt, 1970), estas variables fueron analizadas con análisis de varianza multivariado (MANOVA). Dado que en todos los casos existió interacción entre los tratamientos y el tiempo de incubación en las emisiones gaseosas de N, se realizaron análisis de varianza convencionales fecha por fecha y se separaron las medias según Duncan; de la misma manera fueron analizados los niveles de N- NO_3^- . Las emisiones acumuladas y tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$ promedio fueron evaluadas con análisis de varianza convencionales, a través del procedimiento PROC GLM del paquete estadístico SAS, siendo la separación de medias según Duncan realizada cuando el estadístico-F entre tratamientos fue significativo.

3.3. Resultados

3.3.1. Nitratos y pH del suelo

Los contenidos de N- NO_3^- tendieron a aumentar durante el experimento cuando la aplicación de fertilizantes a base tanto de Urea como de N- NO_3^- fue en forma fraccionada (Tabla 3.2). Bajo condiciones cercanas a capacidad de campo, cuando se aplicaron dosis iniciales completas de ambos tipos de fertilizantes, los niveles de N- NO_3^- presentaron valores altos y mas o menos constantes; en condiciones de 100 y 120% WFPS, con fertilización inicial completa a base de Urea los NO_3^- sufrieron un incremento inicial hasta aproximadamente el sexto día y luego se mantuvieron mas o menos constantes, mientras que la fertilización inicial con una sola dosis de KNO_3 condujo a disminuciones constantes en los contenidos de N- NO_3^- (Tabla 3.2). Los

contenidos promedios de N-NO_3^- bajo contenidos de humedad del suelo de 32 y 100% WFPS fueron significativamente mayores cuando se aplicó KNO_3 en una sola dosis inicial ($p < 0,0001$), mientras que en condiciones de anegamiento los contenidos de N-NO_3^- cuando se aplicó Urea en una sola dosis inicial fueron significativamente mayores ($p < 0,0001$) al resto de los tratamientos de fertilización (Tabla 3.2). La fertilización con una dosis inicial completa de KNO_3 presentó niveles de N-NO_3^- significativamente mayores ($p < 0,0001$) a aquellos con una fertilización inicial única con Urea bajo condiciones de 32 y 100% WFPS, inversamente a lo ocurrido bajo condiciones de 120% WFPS. Comparando ambas formas de aplicación del mismo fertilizante, con excepción de la aplicación de Urea en condiciones de 100% WFPS, la aplicación de Urea o KNO_3 en forma fraccionada disminuyó los niveles medios de N-NO_3^- con respecto a las correspondientes aplicaciones en una sola dosis inicial ($p < 0,0001$). Los contenidos de N-NO_3^- de suelos sin fertilizar fueron bajos y prácticamente constantes (4,88 – 27,78), y significativamente menores ($p < 0,0001$) a los suelos fertilizados. Los diferentes niveles de humedad generaron efectos significativos ($p < 0,0001$) sobre los valores medios de N-NO_3^- , siendo estos mayores con WFPS de 32% (Tabla 3.2).

Los valores de pH del suelo variaron en un rango entre 5,2 y 6,06. Esta variable fue influenciada por el factor fertilización ($p = 0,01$), siendo los niveles de pH cuando se aplicó Urea, CU y FU, significativamente menores a aquellos donde se aplicó KNO_3 en forma fraccionada, FN, o sin fertilizar, F0. Los valores máximos de pH se dieron siempre en suelos no fertilizados.

3.3.2. Emisiones gaseosas de N

Las emisiones por denitrificación de $\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2$ diarias fueron muy bajas bajo el tratamiento de humedad de 32% WFPS (Fig. 3.1 a y b), mientras que fueron elevadas en las situaciones de elevados contenidos de humedad (Fig. 3.1 c-f). En los tratamientos con aplicación de KNO_3 , las emisiones aumentaron con el tiempo y luego disminuyeron en condiciones de 100 y 120% WFPS (Fig. 3.1 d y f); las máximas emisiones para este tipo de fertilizante se dieron a los 9 días para contenidos de humedad de 100% WFPS y a los 14 días para contenidos de 120% WFPS. Las emisiones de N_2O y N_2 cuando se aplicó Urea en forma fraccionada sobre suelos saturados de humedad, 100% WFPS, también crecieron hasta el noveno día y luego tendieron a bajar (Fig. 3.1 c); la aplicación de Urea en una sola vez al inicio del experimento sobre suelos con 100% WFPS, así como ambas formas de aplicación de Urea sobre suelos anegados, 120% WFPS, resultaron en emisiones de $\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2$ decrecientes con el tiempo (Fig. 3.1 c y e).

El efecto de los tratamientos sobre las emisiones por denitrificación varió fuertemente con el tiempo, con interacciones significativas entre el tiempo y de humedad ($p = 0,0009$) y entre el tiempo y la aplicación de fertilizante nitrogenado ($p = 0,046$). Al primer día, las emisiones por denitrificación fueron afectadas solamente por los tratamientos de humedad, aumentando en forma significativa con aumentos en la humedad ($p < 0,0001$), como ocurrió en forma general en todo el experimento (Fig. 3.1 a-f). Al sexto y noveno día, las emisiones fueron significativamente influenciadas por los regímenes de humedad ($p < 0,0001$) y tratamientos de fertilización ($p < 0,0001$), con una fuerte interacción entre ambos factores ($p < 0,0001$). En condiciones de anegamiento los suelos donde fueron aplicados fertilizantes a base de NO_3^- las emisiones de $\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2$ fueron estadísticamente mayores al resto de los tratamientos de fertilización para ambos días ($p = 0,0003$ y $p = 0,003$, respectivamente). En los dos últimos días de medición, los efectos de los tratamientos de humedad y fertilización fueron significativos e independientes (interacción $p = 0,17$ y $p = 0,07$ respectivamente). Al día 14, el tratamiento con una sola aplicación inicial de KNO_3 , CN, fue superior al resto, y el tratamiento sin fertilizar estadísticamente inferior al resto ($p = 0,003$). Al día 21 las emisiones de $\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2$ bajo los tratamientos a base de aplicaciones con Urea,

CU y FU, fueron significativamente menores a aquellos a base de NO_3^- , CN y FN, y no difirieron estadísticamente de las emisiones desde los suelos sin fertilizar ($p=0,001$).

Las emisiones de $\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2$ acumuladas a lo largo del experimento variaron fuertemente entre 0,51 y 892,11 $\mu\text{g N kg}^{-1} \text{d}^{-1}$, y fueron estadísticamente influenciadas por los niveles de humedad ($p<0,0001$) y de fertilización ($p<0,0001$) con efectos independientes entre sí (interacción $p=0,34$). Las emisiones acumuladas por denitrificación aumentaron significativamente con aumentos en la humedad y fueron estadísticamente mayores cuando se aplicaron fertilizantes a base de NO_3^- (Fig. 3.4). El porcentaje del fertilizante perdido por denitrificación varió desde 0,42% para situaciones de humedad cercanas a capacidad de campo, hasta el 21% para situaciones con anegamiento continuo, en ambos casos con fertilización inicial única con KNO_3^- .

Las emisiones de N_2O fueron muy bajas y prácticamente constantes con contenidos de humedad de 32% WFPS (Fig. 3.2 a y b); bajo estos niveles de humedad los valores mayores de emisiones de N_2O se dieron durante la primer semana del experimento, en el tratamiento de una sola dosis inicial con Urea, con valores promedio de 1,53 $\mu\text{g N kg}^{-1}$ de suelo diarios. Para las condiciones de alta humedad, 100 y 120% WFPS, los suelos fertilizados con Urea presentaron valores de emisiones de N_2O bajos, similares a los suelos sin fertilizar (Fig 3.2 c-f). Para estas condiciones de alta humedad los suelos fertilizados con KNO_3 presentaron valores elevados de emisiones diarias de N_2O , oscilando entre 17,14 y 375,8 $\mu\text{g N kg}^{-1}$, aunque las formas de aplicación del N generaron patrones diferenciales en el tiempo; las emisiones bajo los tratamientos con una sola aplicación completa de 80 kg N- KNO_3 presentaron una tendencia ascendente con el tiempo hasta el noveno día de incubación, donde las emisiones empezaron a descender, mientras que cuando la fertilización con KNO_3 fue fraccionada en el tiempo las emisiones de N_2O presentaron valores menores que con la única dosis durante casi todo el experimento y mas o menos constantes, con una leve tendencia ascendente.

El efecto de los tratamientos sobre las emisiones diarias de N_2O varió fuertemente con el tiempo, con interacciones significativas entre los efectos del tiempo y los tratamientos de humedad ($p=0,006$) y entre el tiempo y la aplicación de fertilizante nitrogenado ($p=0,004$). Las emisiones diarias de N_2O con aplicación inicial única de Urea, en suelos con niveles de humedad de 32% WFPS, fueron estadísticamente mayores ($p=0,03$) a aquellas con aplicaciones de N-Urea repartidas sólo el primer día del experimento; en el resto de los días los diferentes tratamientos de fertilización no difirieron entre sí ($p>0,05$). Bajo contenidos de humedad de 100 y 120% WFPS, las emisiones de N_2O de suelos fertilizados con KNO_3 fueron en general estadísticamente superiores a los suelos fertilizados con Urea o no fertilizados ($p<0,05$). La fertilización inicial con una dosis completa de KNO_3 , FN, presentó emisiones diarias de N_2O significativamente mayores a la fertilización fraccionada de KNO_3 sólo al noveno día bajo contenidos de humedad de 100% WFPS ($p=0,005$) y de 120% WFPS ($p<0,0001$).

Los diferentes tratamientos de humedad influenciaron las emisiones diarias de N_2O ; en general estas emisiones bajo las condiciones de saturación y anegamiento fueron estadísticamente similares y mayores a aquellas a capacidad de campo, aunque en los días 9 y 14 de la incubación la humedad no tuvo efectos significativos ($p>0,05$) sobre las emisiones de N_2O desde suelos no fertilizados.

Las emisiones acumuladas de N_2O a lo largo del experimento oscilaron entre 0,25 y 215,96 $\mu\text{g N kg}^{-1} \text{d}^{-1}$, y fueron estadísticamente influenciadas por los niveles de humedad ($p<0,0001$) y de fertilización ($p<0,0001$) con efectos dependientes entre sí (interacción $p=0,0002$). En la mayoría de los casos las emisiones acumuladas de N_2O bajo las condiciones de saturación y anegamiento fueron estadísticamente similares y mayores a aquellas a capacidad de campo; sin embargo, cuando se aplicó KNO_3 en

una sola dosis inicial, las emisiones fueron significativamente mayores con contenidos de humedad del 100% ($p < 0,0001$). Las emisiones acumuladas de este gas no fueron afectadas por los diferentes tratamientos de fertilización en condiciones de 32% WFPS ($p = 0,49$, Fig. 3.4a). En condiciones de 100% WFPS las emisiones acumuladas de N_2O con la aplicación de una dosis única inicial de KNO_3 fueron estadísticamente superiores a las emisiones de suelos fertilizados en forma fraccionada con KNO_3 ($p < 0,0001$) y al resto de los tratamientos de fertilización, siendo las emisiones de los tratamientos que incluían la aplicación de Urea o aquellos no fertilizados significativamente menores que los tratamientos que incluían aplicaciones de KNO_3 (Fig. 3.4b). En condiciones de anegamiento, 120% WFPS, las emisiones desde los dos tratamientos que incluían la aplicación de KNO_3 , CN y FN, fueron estadísticamente similares y mayores al resto de los tratamientos de fertilización ($p < 0,0001$, Fig. 3.4c). Las emisiones acumuladas de N_2O desde suelos fertilizados representaron pérdidas del N del fertilizante entre 0,04% para suelos tratados con 80 $kg\ ha^{-1}$ de N-Urea en forma fraccionada y humedad de 32% WFPS hasta el 25% para suelos tratados con una dosis única inicial de 80 $kg\ ha^{-1}$ de N- KNO_3 y humedad de 100% WFPS.

Las emisiones acumuladas de N_2O presentaron una estrecha relación positiva con las emisiones acumuladas de $N_2O + N_2$ por denitrificación ($r^2 = 0,85$; Fig. 3.5a), con una pendiente muy cercana a 1:1, independientemente de los tratamientos de fertilización. La relación entre estas variables fue diferente ($p < 0,0001$) para los tratamientos de humedad: fue positiva y significativa en las condiciones de 100 y 120% WFPS, mientras que bajo contenidos de humedad de 32% WFPS las emisiones acumuladas de N_2O no se asociaron con las emisiones acumuladas de $N_2O + N_2$ por denitrificación ($p = 0,81$; Fig. 3.5b). Esta relación también fue significativa ($p < 0,0007$) cuando se analizaron las emisiones diarias en cada día de medición, siendo las pendientes para todos los días estadísticamente similares ($p = 0,15$).

La tasa $N_2O/(N_2O + N_2)$ de las emisiones diarias presentaron una alta variabilidad, entre tratamientos y a lo largo del tiempo (Fig. 3.3) oscilando entre 0,042 y 1,92. Esta tasa fue generalmente menor con contenidos de humedad de 120% WFPS (Fig. 3.3 a). Sólo en el primer día de incubación hubo diferencias significativas entre las tasas $N_2O/(N_2O + N_2)$ de las emisiones diarias correspondientes a los distintos tratamientos de humedad, siendo en este caso la tasa bajo contenidos de humedad de 100% WFPS mayor a aquella bajo 32 o 120% WFPS ($p = 0,003$; Fig. 3.3a). Las tasas $N_2O/(N_2O + N_2)$ de las emisiones acumuladas también fueron influenciadas significativamente por los niveles de humedad ($p = 0,015$), siendo estas significativamente menores bajo contenidos de humedad de 120% WFPS. No existió efecto significativo de los tratamientos de fertilización sobre la tasa $N_2O/(N_2O + N_2)$ de las emisiones diarias ($p > 0,05$; Fig. 3.3b) o de las emisiones acumuladas ($p = 0,47$), aunque se advirtió una tendencia al aumento de la tasa con la aplicación de fertilizante nitrogenado (Fig. 3.6).

3.3.3. Relación entre las emisiones gaseosas y las variables edáficas medidas

El pH del suelo se relacionó significativamente y en forma positiva, aunque con bajos grados de ajuste, con las emisiones totales de $N_2O + N_2$ por denitrificación ($p = 0,02$, $r^2 = 0,1$; Fig. 3.7c) y con las emisiones de N_2O ($p = 0,03$, $r^2 = 0,1$; Fig. 3.7f) y en forma negativa con la tasa $N_2O/(N_2O + N_2)$ de las emisiones ($p = 0,04$, $r^2 = 0,08$) (Fig. 3.7i). En suelos donde se aplicó una sola dosis inicial de fertilizante a base de NO_3^- , el pH se relacionó más intensamente con las emisiones totales por denitrificación ($p = 0,004$, $r^2 = 0,7$) y con las emisiones de N_2O ($p = 0,002$, $r^2 = 0,75$) que para la totalidad de los tratamientos. Las emisiones acumuladas de N_2O y la tasa $N_2O/(N_2O + N_2)$ siguieron una forma cuadrática cuando se la relacionó con los niveles de humedad correspondientes (Fig. 3.9) estimándose las emisiones de N_2O y tasas $N_2O/(N_2O + N_2)$ máximas a contenidos de humedad de alrededor de 100 y 75% WFPS, respectivamente.

Ni las emisiones totales (N_2O+N_2) y de N_2O ni la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ de las emisiones se relacionaron a los niveles de $N-NO_3^-$, $N-NH_4^+$ o a los contenidos de C soluble del suelo cuando se analizó el set completo de datos. Sin embargo, cuando sólo se analizaron las situaciones de altos contenidos de humedad, los contenidos de $N-NO_3^-$ se asociaron fuertemente a las emisiones totales de N_2O+N_2 por desnitrificación ($p=0,04$, $r^2=0,28$) y con las emisiones de N_2O ($p=0,01$, $r^2=0,56$) (Fig. 3.8 a y b).

Algunos modelos de regresión múltiple fueron significativos en la asociación de las variables edáficas medidas y las emisiones de gases nitrogenados; sin embargo, debido a que la explicación de la variabilidad de las variables respuesta fue igual o menor a aquellas obtenidas en regresiones simples, los resultados no se presentan en este trabajo.

Tabla 3.2. Contenidos de $N-NO_3^-$ ($mgN\ kg^{-1}$) para los distintos tratamientos de humedad y de fertilización durante el experimento y promedios ponderados por la cantidad de días entre mediciones. Letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p<0.05$) entre tratamientos de humedad y letras minúsculas indican diferencias significativas ($p<0.05$) entre tratamientos de fertilización. CN es una aplicación única de KNO_3 , FN es una aplicación fraccionada de KNO_3 , CU es una aplicación única de urea, FU es una aplicación fraccionada de urea, F0 es no fertilizado.

WFPS	Fertilización	Día 1	Día 6	Día 9	Día 14	Día 21	Promedio
32	CN	88.49aA	96.27aA	128.53aA	91.68aA	108.39bA	102.49aA
	FN	21.87cA	55.59bA	49.92bcB	98.81aA	133.70aA	75.29bcA
	CU	58.72bA	84.61aA	114.49aA	69.84aA	49.91cB	76.85bA
	FU	14.09cA	55.14bA	57.80bA	99.27aA	66.05cA	61.12cA
	F0	18.52cA	17.45cA	27.78cA	25.59bA	21.10dA	22.85dA
100	CN	81.42aA	70.53aB	66.13bB	51.10aB	48.34bB	68.97aB
	FN	18.53cA	34.52bB	104.49aA	51.54aB	78.52aB	51.65bB
	CU	31.68bA	63.27aB	51.84bcC	56.88aB	45.04bB	52.80bB
	FU	16.93cA	35.47bB	37.23cAB	65.64aB	82.68aA	50.82bAB
	F0	9.90cA	6.24cB	11.11dB	9.41bB	21.82cA	11.35cA
120	CN	68.54aA	63.88aB	59.06bB	55.12aB	45.16bB	57.89bB
	FN	21.53cA	34.52bB	38.76cB	55.76aB	51.59abB	43.72cB
	CU	40.24bA	82.38aB	76.20aB	66.19aB	82.36aA	71.02aA
	FU	23.39cA	23.73bB	24.47cB	55.81aB	57.84abA	41.23cB
	F0	4.88cA	6.24cB	5.52dB	7.34bB	10.07cB	6.93dB

3.3.4. Figuras

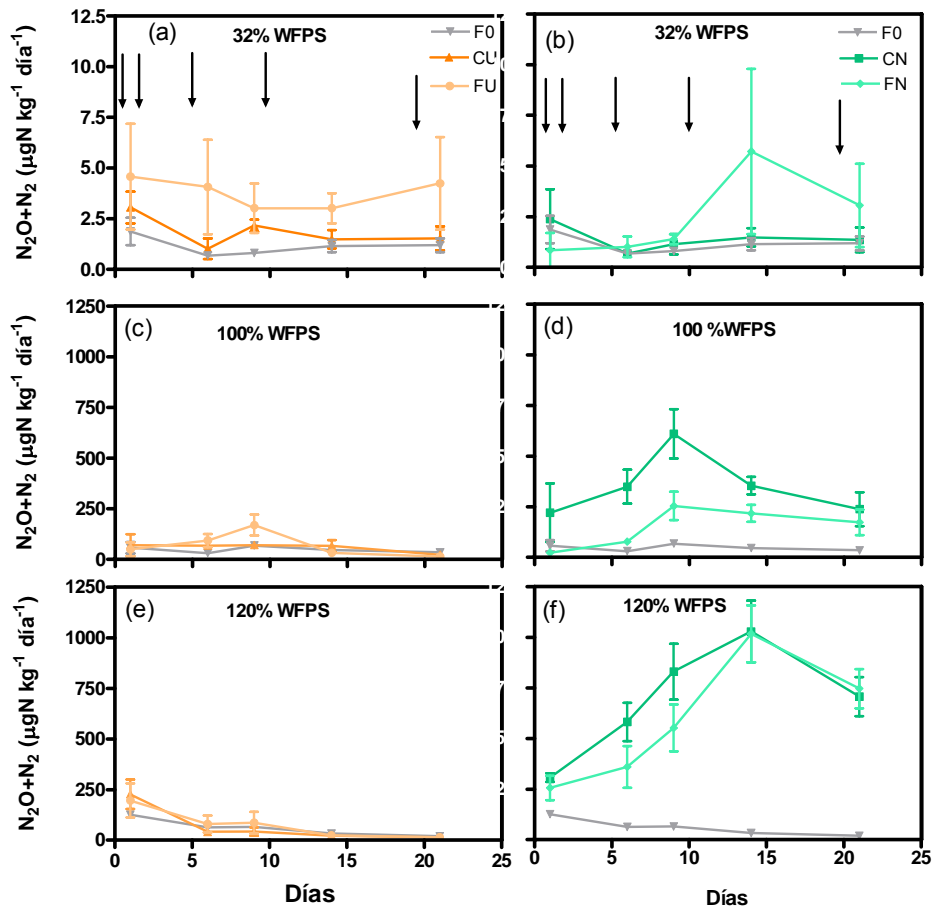


Figura 3.1. Tasas de denitrificación total a través del experimento para los tratamientos de fertilización, en las situaciones de 32% WFPS (a y b), 100% WFPS (c y d) y 120% WFPS (e y f). El tratamiento sin fertilización (F0) se incluye en todos los casos como referencia. Los puntos corresponden a la media de tres repeticiones con las barras representando el error Standard de la media. CN es una aplicación única de KNO_3 , FN es una aplicación fraccionada de KNO_3 , CU es una aplicación única de urea, FU es una aplicación fraccionada de urea, F0 es no fertilizado. Las flechas indican la aplicación del fertilizante en los casos de aplicación fraccionada, FN y FU.

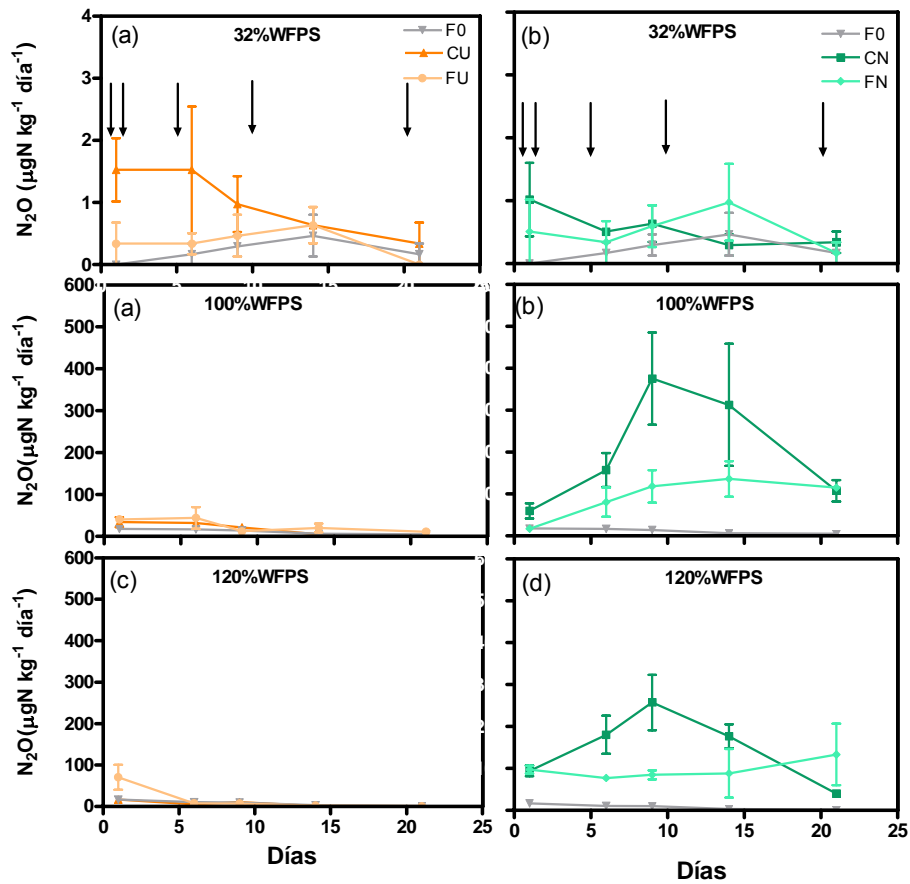


Figura 3.2. Emisiones de N_2O diarias a través del experimento para los tratamientos de fertilización, en las situaciones de 32% WFPS (a y b), 100% WFPS (c y d) y 120% WFPS (e y f). El tratamiento sin fertilización (F0) se incluye en todos los casos como referencia. Los puntos corresponden a la media de tres repeticiones con las barras representando el error Standard de la media. CN es una aplicación única de KNO_3 , FN es una aplicación fraccionada de KNO_3 , CU es una aplicación única de urea, FU es una aplicación fraccionada de urea, F0 es no fertilizado. Las flechas indican la aplicación del fertilizante en los casos de aplicación fraccionada, FN y FU.

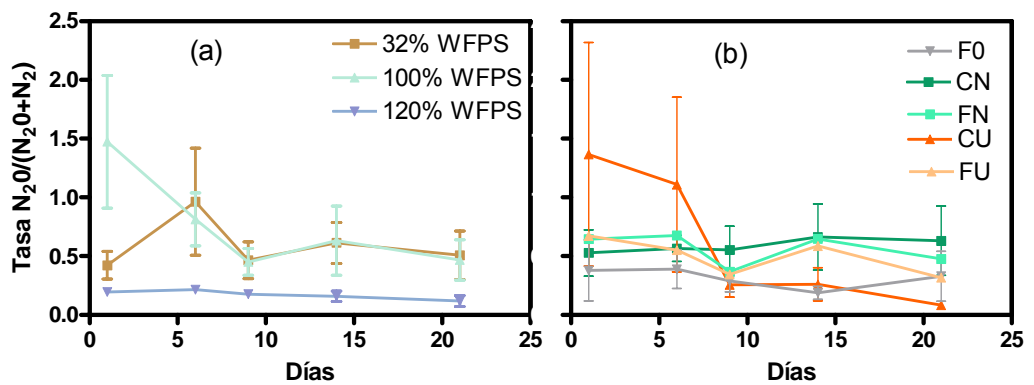


Figura 3.3. Tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$ a través del experimento para los diferentes tratamientos de humedad (a) y de fertilización (b). El tratamiento sin fertilización (F0) se incluye en todos los casos como referencia. Los puntos corresponden a la media de tres repeticiones con las barras representando el error Standard de la media. CN es una aplicación única de KNO_3 , FN es una aplicación fraccionada de KNO_3 , CU es una aplicación única de urea, FU es una aplicación fraccionada de urea, F0 es no fertilizado.

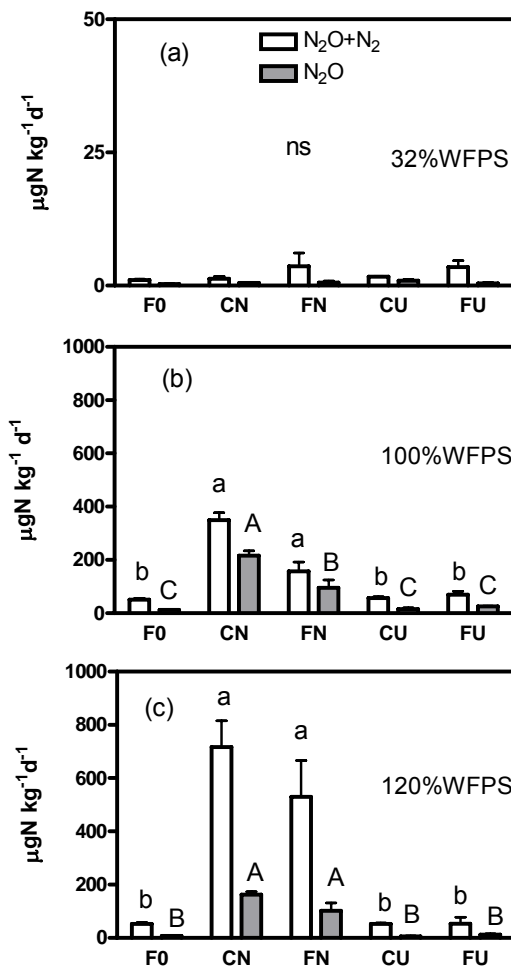


Figura 3.4. Emisiones acumuladas de N_2O+N_2 y de N_2O para los distintos tratamientos de fertilización, en suelos con contenidos de humedad de 32% WFPS (a), 100% WFPS (b) y 120% WFPS (c). Las barras corresponden a la media de tres repeticiones con las barras pequeñas representando el error Standard de la media. CN es una aplicación única de KNO_3 , FN es una aplicación fraccionada de KNO_3 , CU es una aplicación única de urea, FU es una aplicación fraccionada de urea, F0 es no fertilizado. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas en las emisiones de N_2O+N_2 entre los tratamientos de fertilización ($p < 0,05$) para cada contenido de humedad. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en las emisiones de N_2O entre los tratamientos de fertilización ($p < 0,05$) para cada contenido de humedad.

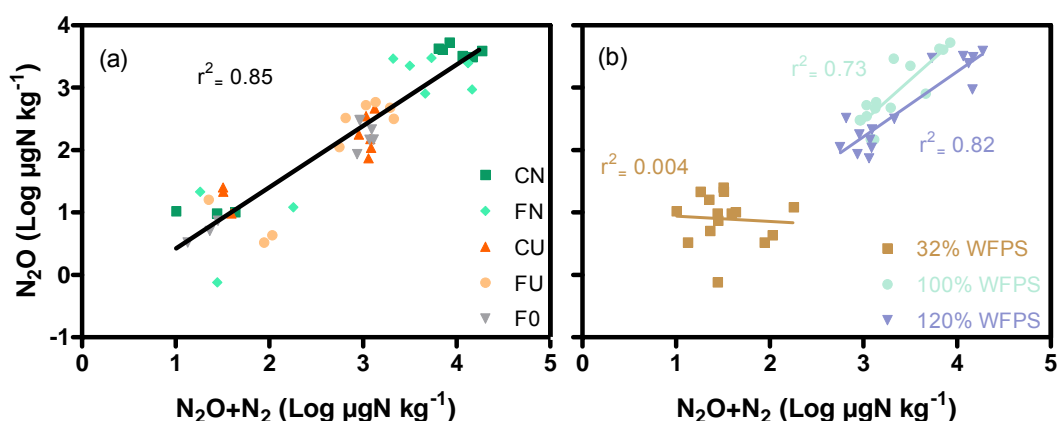


Figura 3.5. Relación entre las emisiones de N_2O y totales por denitrificación de N_2O+N_2 acumuladas, para los tratamientos de fertilización (a) y para cada tratamiento de humedad (b). CN es una aplicación única de KNO_3 , FN es una aplicación fraccionada de KNO_3 , CU es una aplicación única de urea, FU es una aplicación fraccionada de urea, F0 es no fertilizado.

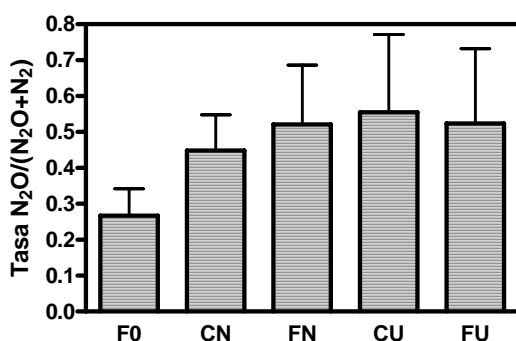


Figura 3.6. Tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ de las emisiones acumuladas desde suelos bajo diferentes tratamientos de fertilización nitrogenada. Las barras corresponden a la media de tres repeticiones con las barras pequeñas representando el error Standard de la media. CN es una aplicación única de KNO_3 , FN es una aplicación fraccionada de KNO_3 , CU es una aplicación única de urea, FU es una aplicación fraccionada de urea, F0 es no fertilizado.

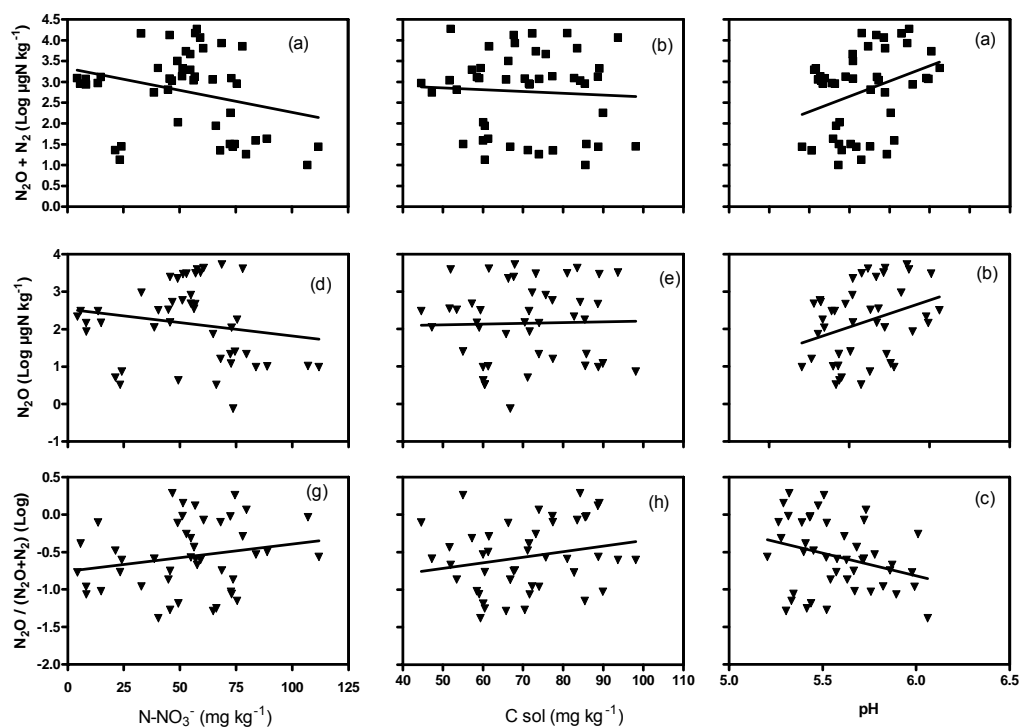


Figura 3.7. Relación entre las emisiones de N_2O+N_2 por desnitrificación (a,b y c), de N_2O (d,e y f) y de la tasa $N_2O / (N_2O+N_2)$ (g,h e i) y los contenidos de $N-NO_3^-$ (a, d y g), de C soluble (b, e y h) y el pH del suelo (c,g e i)

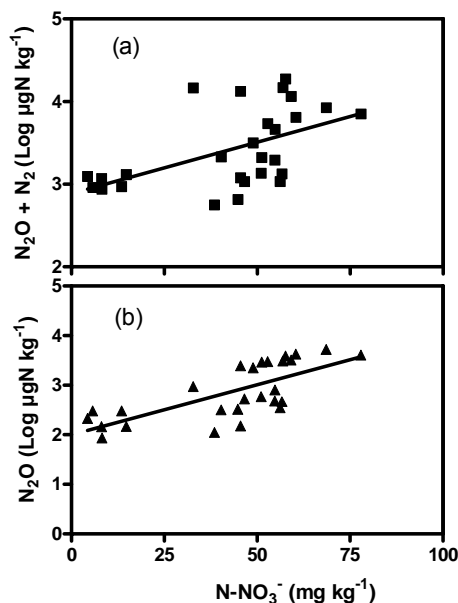


Figura 3.8. Relación entre las emisiones de N_2O+N_2 por desnitrificación (a) y de N_2O (b) y los contenidos de $N-NO_3^-$ sólo para las situaciones de 100 y 120% WFPS.

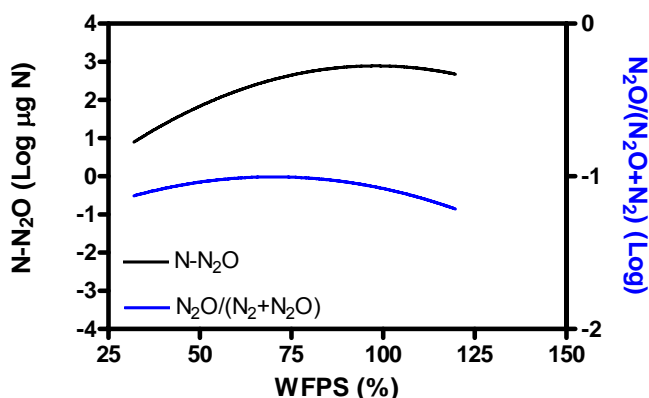


Figura 3.9. Relación entre las emisiones acumuladas de N₂O (línea llena) y la tasa N₂O/(N₂O+N₂) de las emisiones (línea punteada), log-transformadas, y los niveles de humedad del suelo, expresados por su WFPS.

3.4. Discusión

La evolución en el tiempo presentada por los niveles de N-NO₃⁻ en aplicaciones fraccionadas fue siempre ascendente (Tabla 3.2). La naturaleza química del fertilizante y su interacción con la humedad influyeron en mayor medida en los niveles de N-NO₃⁻ en los casos de una aplicación inicial única del fertilizante. En condiciones de 32 y 100% WFPS, los niveles medios de N-NO₃⁻ fueron mayores cuando la aplicación inicial única correspondió a un fertilizante a base de N-NO₃⁻, mientras que bajo contenidos de humedad de 120% WFPS, las elevadas emisiones de gases nitrogenados por desnitrificación determinaron probablemente que los contenidos de N-NO₃⁻ en suelos fertilizados con una dosis única de KNO₃ sean inferiores a los contenidos de ese anión en suelos tratados con una dosis inicial de Urea. De hecho, las emisiones de N₂O+N₂ diarias en suelos con 120% WFPS fertilizados con Urea fueron decididamente inferiores a aquellas fertilizadas con una aplicación única de KNO₃ (Fig. 3.4c).

Los valores medios de pH disminuyeron con la aplicación de fertilizante nitrogenado, especialmente cuando el fertilizante fue Urea, probablemente por el efecto acidificante de la oxidación del N-NH₄⁺; la reacción alcalina inicial de la hidrólisis de la Urea es seguida por una reacción predominantemente ácida (Mulvaney *et al.*, 1997). El efecto en la acidez después de la aplicación de KNO₃ es probablemente debido al efecto salino en los coloides del suelo (Khonje *et al.*, 1989). La aplicación fraccionada de fertilizante, de KNO₃ o de Urea, no difirió en los niveles medios de pH con respecto a la aplicación única del mismo fertilizante, lo que sugiere que los bajos contenidos de coloides de este suelo regularon muy suavemente cambios en la acidez del suelo, y aún pequeñas dosis de fertilizante superaron la capacidad reguladora del mismo en el tiempo de incubación considerado.

Las emisiones de N₂O+N₂ diarias y acumuladas fueron elevadas, como era de esperar, en las situaciones de altos contenidos de humedad, oscilando las primeras entre 13,93 y 1028,95 µg N kg⁻¹ día⁻¹ (Fig 3.1 c-f). Estos valores están en el rango de los hallados por Bergstrom *et al.* (2001) quienes hallaron emisiones de N₂O+N₂ diarias entre 0 y 720 µg N kg⁻¹, en cilindros de suelo con contenidos de humedad entre 40 y 80% WFPS, y fertilizados con 100 kg N ha⁻¹ de Urea, Nitrato de Calcio o Sulfato de Amonio. Estos valores también son cercanos a aquellos hallados por Weier *et al.* (1993) en cilindros de suelo rearmados, con valores de emisiones de N₂O+N₂ de entre 5,78 y 1044 µg N kg⁻¹ día⁻¹, en suelos con contenidos de humedad entre 60 y 90% WFPS y fertilizados con 50 y 100 kg N-KNO₃ ha⁻¹. Las tasas de desnitrificación fueron

mayores en condiciones de anegamiento que en suelos saturados de agua pero no anegados, independientemente del tratamiento de fertilización aplicado, posiblemente porque los niveles de NO_3^- no estarían limitando las emisiones en ningún caso. Por el contrario, Aulakh *et al* (2000) encontraron una fuerte interacción entre tratamientos de fertilización y humedad sobre las emisiones de $\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2$; estos autores hallaron que suelos anegados presentaron mayores pérdidas por denitrificación que suelos casi saturados cuando fueron fertilizados con $100 \text{ mg de N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$, mientras que estas pérdidas fueron mayores en los suelos casi saturados cuando fueron aplicados $100 \text{ mg de N-NH}_4^+ \text{ kg}^{-1}$. El mayor contenido de agua en condiciones de 100% WFPS, con respecto a los contenidos de 90% WFPS aplicados por Aulakh *et al* (2000), regulando el proceso de nitrificación, puede ser la explicación a esta ausencia de diferencias en emisiones entre diferentes tipos de fertilizantes en nuestro trabajo. Este fuerte control de la humedad puede verse en los altos porcentajes de N del fertilizante perdidos por denitrificación, con valores de hasta 21% para situaciones con anegamiento continuo, en un período de tiempo de 21 días. Por ejemplo, en condiciones de campo, se ha encontrado en ciclos de cultivo de maíz pérdidas de N del fertilizante de 0,03 a 7% (Liang and MacKenzie, 1997; Sainz Rozas *et al.*, 2001).

El efecto de la interacción entre los tratamientos de humedad y los tratamientos de fertilización sobre las emisiones de $\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2$ varió con el tiempo de incubación. En el primer día, las emisiones de $\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2$ no fueron afectadas por los tratamientos de fertilización; estas emisiones estuvieron limitadas muy probablemente por los niveles de O_2 presentes, aún con elevados contenidos de humedad, dado que el poco O_2 disuelto en la solución del suelo puede tardar 48 horas en agotarse luego de iniciada una situación de anegamiento (Smith, 1990). Tampoco puede descartarse algún efecto de inmovilización inicial del N-NO_3^- . Las emisiones de $\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2$ por denitrificación diarias con aplicación fraccionada de fertilizante nitrogenado presentaron una evolución similar en el tiempo a aquellas con aplicación de una dosis única inicial del mismo tipo de fertilizante; el tipo químico de fertilizante pareció influir nuevamente en mayor medida en la evolución de las emisiones por denitrificación. De hecho, las emisiones diarias con fertilizaciones a base de KNO_3 fueron mayores que las aplicaciones con Urea durante casi todo el experimento. Aún más, las emisiones acumuladas de $\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2$ por denitrificación, independientemente del nivel de humedad, también fueron mayores con aplicaciones de KNO_3 , no existiendo diferencias entre las formas de fertilización para ambos tipos de fertilizante. De la misma manera, Aulakh *et al* (2000) encontraron que con aplicaciones de N-NH_4^+ las pérdidas por denitrificación en suelos casi saturados y anegados fueron entre un 7 y 32% menores que con la aplicación de N-NO_3^- .

Las emisiones de N_2O presentaron una muy importante variabilidad temporal y en cada día de medición (Fig. 3.2) como fue encontrado por otros autores en estudios relacionados al efecto de la fertilización (Mc Taggart y Tsuruta, 2003; Drury *et al.*, 2006; del Prado *et al.*, 2006). De la misma manera que las emisiones de $\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2$, las emisiones de N_2O diarias y acumuladas fueron bajas con contenidos de humedad cercanos a capacidad de campo, 32% WFPS, con excepción de un pequeño pico inicial desde suelos fertilizados con una dosis única inicial de Urea, probablemente generado por el proceso de denitrificación por organismos nitrificadores (Wrage *et al*, 2001), contribuyendo a los antecedentes que sostienen de que la denitrificación es el principal proceso generador de N_2O en los suelos (Elmi *et al.*, 2003). McTaggart y Tsuruta (2003) concluyeron que en condiciones que favorecen la nitrificación, las emisiones pueden ser reducidas con el uso de fertilizantes a base de NO_3^- . Sin embargo, los contenidos de humedad de 32% WFPS limitaron las emisiones de N_2O en este trabajo debido a una excesiva aireación, que condujo a la ausencia de diferencias significativas en estas emisiones entre los diferentes tipos de fertilizante nitrogenado. Este importante control de la humedad del suelo sobre las emisiones

gaseosas de N puede también afirmarse por la relación entre estas emisiones y los niveles de N-NO_3^- , que fue sólo adecuada cuando se consideraron únicamente los datos correspondientes a los suelos bajo contenidos de humedad de 100 y 120% WFPS (Fig. 3.8), y no cuando se tomó en consideración el set completo de datos.

Las emisiones diarias y acumuladas de N_2O fueron elevadas y en general similares en condiciones de 100 y 120% WFPS, oscilando las primeras entre 0,57 y 375,83 $\mu\text{g N kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (Fig 3.2 c-f). Estos valores son significativamente inferiores a aquellos hallados por Bergstrom *et al* (2001) de entre 0 y 4800 $\mu\text{g N kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ en cilindros de suelo con contenidos de humedad entre 40 y 80% WFPS, y fertilizados con 100 kg N ha^{-1} de Urea, Nitrato de Amonio Calcáreo (CAN) o Sulfato de Amonio, y muy superiores a aquellos mostrados por Tenuta y Beauchamp (2000), con valores de 0-51 $\mu\text{g N kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ en suelos fertilizados con 150 kg N ha^{-1} de Urea en diferentes tamaños, y con contenidos de humedad de 65% WFPS. Estas grandes diferencias resaltan la importancia de las condiciones particulares de cada suelo y del diseño general de cada experimento. La consistencia en los bajos valores de emisiones de $\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2$ como de las emisiones de N_2O en suelos no fertilizados y altos contenidos de humedad seguramente se debe a limitación por los niveles de N-NO_3^- , dado que las emisiones acumuladas por denitrificación y de N_2O se relacionaron intensamente a los niveles medios de N-NO_3^- sólo cuando se consideraron los suelos con contenidos de humedad de 100 y 120% WFPS. Dobbie y Smith (2003b) también reportaron que el factor esencial que controlaba las emisiones en suelos de pasturas con WFPS que variaban entre 60 y 95% era la concentración de N-NO_3^- . En adición, la salinidad de los suelos también afecta más a la enzima óxido nitroso-reductasa que a la nitrato reductasa (Menyailo *et al.*, 1997) aunque la conductividad eléctrica de los suelos fertilizados no difirió en forma significativa de aquellos no fertilizados (datos no mostrados), por lo que este control parece ser de menor jerarquía en este marco.

El comportamiento de las emisiones diarias de N_2O a través del tiempo fue diferente entre los distintos tipos químicos de fertilizante, coincidiendo con los resultados de del Prado *et al.* (2006). El aumento en las emisiones diarias de N_2O en condiciones de saturación y anegamiento con una aplicación única de KNO_3 hasta el noveno día (Fig. 3.1d y f) debería estar relacionado al aumento en las condiciones reductoras del suelo, donde el O_2 va desapareciendo y se va consumiendo el N-NO_3^- que es el segundo aceptor de electrones mas fuerte en el suelo; el O_2 desaparece del suelo luego de aproximadamente 48 horas de anaerobiosis (Smith, 1990). Este retraso en las emisiones luego del agregado de NO_3^- también fue observado por otros autores (Weier *et al.*, 1993; del Prado *et al.*, 2006). Este cambio progresivo en el status rédox de los suelos bajo altos contenidos de humedad también puede explicar los picos iniciales de emisiones de N_2O cuando se aplicó Urea a suelos con altos contenidos de humedad, producto de organismos nitrificadores que generan este gas con contenidos de O_2 mayores que los microorganismos denitrificadores heterótrofos típicos (Granli y Bøckman, 1994).

La presencia conjunta de elevados niveles medios de N-NO_3^- y contenidos elevados de humedad pero sin una capa de agua superficial condujo a que las emisiones acumuladas de N_2O fueran mayores a las situaciones con una capa de agua superficial cuando se aplicó KNO_3 en una dosis única inicial. La presencia de una capa de agua superficial limita seriamente la posibilidad de difusión de O_2 desde la atmósfera hacia el suelo (Reddy *et al.*, 1980), por lo que es probable que en su ausencia cierto intercambio gaseoso suelo-atmósfera haya limitado la actividad de la actividad denitrificadora en general y específicamente la actividad de la enzima óxido-nitroso reductasa (Knowles, 1982), que en adición es inhibida por elevados niveles de N-NO_3^- (Blackmer y Bremner, 1978). En cambio, cuando el fertilizante a base de NO_3^- fue aplicado en forma fraccionada, las emisiones de N_2O en 100 y 120% WFPS fueron

similares, lo que puede ser debido a los menores niveles de NO_3^- en este caso, ejerciendo un efecto inhibitorio menor en la actividad de la enzima óxido nitroso-reductasa.

Las emisiones de N_2O fueron en general ampliamente mayores cuando se aplicó KNO_3 con respecto a aplicaciones de Urea, en suelos con altos contenidos de humedad, coincidiendo con lo encontrado por Skiba *et al.*, (1993), quienes midieron mayores emisiones de N_2O con aplicaciones de KNO_3 con respecto a suelos fertilizados con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Por el contrario, del Prado *et al.* (2006) hallaron emisiones mayores con aplicaciones de fertilizantes a base de NH_4^+ que respecto aplicaciones de KNO_3 , en un rango de WFPS de 30 a 96%, aunque las diferencias no fueron significativas, y McTaggart y Tsuruta (2003) encontraron que con valores de WFPS de entre 40 y 85%, las emisiones fueron mayores en suelos fertilizados con Sulfato de Amonio con respecto a aquellos fertilizados con Nitrato de Calcio concluyendo que a estos valores el suelo permanecía predominantemente aeróbico. Estas diferencias pueden estar basadas en los altos niveles de humedad evaluados, 100 y 120% WFPS, con respecto a los aplicados en otros trabajos, aunque las comparaciones entre estudios son difíciles debido a que el comportamiento de diferentes fertilizantes depende del tipo de suelo como de las condiciones ambientales, así como de la interacción con prácticas de manejo como el tipo de labranza (Venterea *et al.*, 2005.) Otros autores no encontraron un efecto significativo del tipo de fertilizante nitrogenado (Azam *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002; Dobbie y Smith, 2003b). Las bajas emisiones diarias $\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2$ y de N_2O con aplicaciones de Urea en condiciones de alta humedad no se deberían a los niveles medios de N-NO_3^- , dado que cuando se aplicó Urea estos fueron elevados y similares (100% WFPS) o mayores (120% WFPS) a los hallados en suelos fertilizados con dosis únicas o fraccionadas de KNO_3 .

La aplicación fraccionada de KNO_3 condujo a disminuciones en las emisiones de N_2O con respecto a la aplicación única inicial del mismo fertilizante sólo cuando el suelo se encontró saturado sin una capa de agua superficial. Por el contrario, cualquier forma de aplicación de Urea en condiciones de alta humedad llevó a emisiones bajas y similares a suelos no fertilizados. Aplicaciones fraccionadas de 160 kg N ha^{-1} de Urea a suelos con cultivos de caña de azúcar con WFPS de 80 y 100% resultó en menores emisiones iniciales de N_2O comparadas con la aplicación completa de Urea al comienzo del experimento, aunque las emisiones totales en una temporada fueron similares entre tratamientos (Weier, 1999); el autor concluyó que la persistencia de los NO_3^- en el suelo durante el período de crecimiento presentó oportunidades para las emisiones de N_2O cuando las condiciones a campo se tornaron favorables, aunque la absorción vegetal de agua y NO_3^- complicó la comprensión de la respuesta de las emisiones del suelo a este tipo de fertilización. También se ha observado que las emisiones diarias de suelos fertilizados con Urea de liberación controlada, con un efecto en teoría similar a la aplicación fraccionada, son en general mayores a aquellos fertilizados con Urea recubierta luego de un breve período inicial donde las emisiones son menores, debido a una provisión continua de N (Akiyama *et al.*, 2000, Dobbie y Smith, 2003b). A pesar de que este efecto no se observó en nuestro experimento, no se descarta que pueda ocurrir en períodos de incubación más largos.

La tasa $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ fue afectada por los niveles de humedad, siendo en general en condiciones de 100% WFPS mayor que con 32 o 100% WFPS. Los menores valores de la tasa $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ bajo contenidos de humedad de 32% WFPS con respecto a aquellas bajo 100% WFPS es difícil de explicar, dadas las condiciones de mayor oxidación y a que la reducción a N_2 es el único destino biológico del N_2O . En condiciones de anegamiento, es probable que la presencia de una capa de agua superficial durante un largo tiempo haya limitado seriamente la renovación del O_2 edáfico, promoviendo el consumo de aceptores de electrones secundarios como el N_2O , que suele ser consumido luego de que los niveles de N-NO_3^- del suelo

disminuyen (Firestone y Tiedje, 1979). Esta promoción del consumo de N_2O con los aumentos en los contenidos de humedad puede explicar porque las máximas emisiones de N_2O se dan a contenidos de humedad mayores a aquellos correspondientes a las máximas tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$, como puede verse en la forma de la relación entre estas emisiones y la humedad (Figura 3.9); aumentos en los contenidos de humedad desde 75% a 100% WFPS aumentaron las emisiones de N_2O+N_2 en mayor medida que lo que redujeron la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$, mientras que por encima de 100% WFPS es probable que la reducción en la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ haya sido el efecto principal generado por aumentos de los tenores hídricos. El efecto de la humedad también puede ser explicado al menos en parte a través de los cambios en el pH dentro de los suelos con altos contenidos de humedad, dado que el anegamiento condujo a valores de pH significativamente más altos que en situaciones de saturación del suelo sin agua superficial, lo que puede haber limitado el efecto inhibitorio de la acidez sobre la reducción del N_2O a N_2 (Blackmer y Bremner, 1979).

La tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ aumentó con la aplicación de fertilizantes nitrogenados, desde 0,2 en suelos control a un promedio general de 0,5 para los suelos fertilizados. Tras el agregado de Urea a suelos franco arenosos calcáreos, Hong *et al.* (2002) registraron valores de $N_2O/(N_2O+N_2)$ de 0,7-0,8, mientras que los suelos control presentaron valores de 0,28. La tendencia al aumento de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ con el agregado de fertilizantes puede deberse al efecto de mayores niveles de $N-NO_3^-$ aportados por estos, aunque la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ no se asoció con los contenidos medios de $N-NO_3^-$, por lo que se concluye que el principal efecto fue a través de la acidez aportada por los fertilizantes nitrogenados, inhibiendo la actividad óxido nitroso-reductasa. De hecho, aún con muy bajos coeficientes de determinación ($r^2= 0,08-0,1$) la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ se relacionó en forma negativa y significativa con el pH del suelo, mientras que las emisiones de N_2O y totales de N_2O+N_2 por denitrificación se relacionaron en forma significativa y directa con esta variable edáfica, coincidiendo con Mulvaney *et al.* (1997). Estos efectos de la reacción del suelo podrían explicar las bajas emisiones de N_2O en condiciones de alta humedad y fertilizados con Urea, fertilizante que generó los menores valores de pH; las bajas emisiones de N_2O+N_2 en condiciones de alta humedad y fertilizados con Urea indicarían que las bajas emisiones de N_2O parecen estar explicadas por limitaciones en la denitrificación total por la acidez más que en la citada inhibición de la reducción del N_2O a N_2 . Clayton *et al.* (1997) encontraron que los bajos valores de pH de suelos de pastizales fertilizados con Sulfato de Amonio determinaron las menores emisiones de N_2O con respecto a suelos fertilizados con Urea o CAN.

Ningún modelo de regresión múltiple permitió explicar la variabilidad de las emisiones de N_2O+N_2 por denitrificación o de N_2O , ni de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ de las emisiones en mayor medida que los modelos de regresión con una sola variable explicativa, lo que también fue observado y discutido en el capítulo 2.

3.5. Conclusiones

Las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 por denitrificación, independientemente del nivel de humedad, fueron máximas con aplicaciones de KNO_3 . El porcentaje del fertilizante perdido por denitrificación llegó hasta el 21% para situaciones con anegamiento continuo con fertilización inicial única con KNO_3 , implicando importantes pérdidas de N del suelo en condiciones de alta humedad que pueden afectar seriamente la eficiencia de la fertilización nitrogenada cuando fertilizantes a base de NO_3^- son aplicados. El trabajo demuestra por primera vez que las tasas de denitrificación no fueron influenciadas por el fraccionamiento de la aplicación de N, en suelos con contenidos de humedad contrastantes.

Con bajos contenidos de humedad, 32% WFPS, no hubo efectos significativos de la aplicación de fertilizante nitrogenado sobre las emisiones de N_2O , lo que permite concluir que cuando la aireación no es limitada, el tipo de fertilizante es un efecto

menor, incluso no detectable, en las emisiones de gases nitrogenados del suelo en estudio.

Las emisiones de N_2O fueron ampliamente mayores cuando se aplicó KNO_3 con respecto a aplicaciones de Urea demostrando la fuerte influencia del tipo de fertilizante nitrogenado en suelos con altos contenidos de humedad. Por el contrario, la aplicación de Urea en condiciones de alta humedad llevó a emisiones de N_2O bajas y similares a suelos no fertilizados. Por otro lado, la influencia del fraccionamiento sobre las emisiones de N_2O fue poco relevante; la aplicación fraccionada de KNO_3 condujo a disminuciones en las emisiones de N_2O con respecto a la aplicación única inicial del mismo fertilizante sólo cuando el suelo se encontró saturado sin una capa de agua superficial, confirmando parcialmente la primera hipótesis propuesta.

Ni la naturaleza química ni el fraccionamiento de la fertilización nitrogenada generó efectos significativos sobre la tasa $N_2O / (N_2O + N_2)$ bajo ningún contenido de humedad, confirmando la segunda hipótesis propuesta. Sin embargo, la tasa $N_2O / (N_2O + N_2)$ tendió a aumentar con la aplicación de fertilizantes nitrogenados, desde 0,2 en suelos control a un promedio general de 0,5 para los suelos fertilizados. Tal aumento en la tasa se debe posiblemente a la acidez aportada por los fertilizantes nitrogenados, al inhibir la actividad óxido nitroso-reductasa. De hecho, el pH del suelo se relacionó en forma significativa y negativa con la tasa $N_2O / (N_2O + N_2)$ y en forma directa con las emisiones de N_2O y de $N_2O + N_2$ por denitrificación.

La relación entre los tres niveles de WFPS y las emisiones de N_2O ajustó adecuadamente a una función cuadrática con máximos de emisiones estimados con contenidos de humedad de alrededor de 100% WFPS. Aumentos en los contenidos de humedad desde 75% a 100% WFPS incrementaron las emisiones de $N_2O + N_2$ en mayor medida que lo que redujeron la tasa $N_2O / (N_2O + N_2)$, desembocando en aumentos de las emisiones de N_2O . Por encima de 100% WFPS la reducción en la tasa $N_2O / (N_2O + N_2)$ fue el efecto principal generado por aumentos de los tenores hídricos, resultando en emisiones de N_2O decrecientes.

4. Capítulo 4. Manejo de residuos y emisiones de gases nitrogenados

4.1. Antecedentes, objetivos e hipótesis específicos del capítulo 4: Emisiones de gases nitrogenados y manejo de los residuos de cultivos

4.1.1. Antecedentes específicos

4.1.1.1. Disponibilidad de C y denitrificación

La disponibilidad de C parece limitar a la denitrificación en muchos suelos agrícolas (Curtin *et al.*, 1994). Se considera que, en condiciones de campo, la denitrificación estaría limitada por la cantidad de C susceptible de ser mineralizada en condiciones anaeróbicas (Bijay Singh *et al.*, 1988; Khalil *et al.*, 2001; Sainz Rozas *et al.*, 2001), dado que la mayoría de los organismos denitrificadores son quimioheterótrofos (Zumft, 1997). Tiedje *et al.* (1982) sugirió que el C orgánico es más importante que el O₂ en lo que respecta a la estimulación del crecimiento de los organismos denitrificadores. Varios estudios han reportado que incrementos en el contenido de C del sistema aumentan la capacidad de denitrificación y la densidad de la población denitrificadora del suelo, con hincapié en el C orgánico soluble, C de rápida disponibilidad (Bijay Singh *et al.*, 1988; Bremner, 1997; Khalil *et al.*, 2001). El C orgánico disuelto en la solución del suelo, o C soluble, es el principal dador de electrones durante la denitrificación (Li *et al.*, 1992a). En suelos agrícolas de la Región Pampeana, Sainz Rozas *et al.* (2001) indicaron que en condiciones de campo la disponibilidad de C fácilmente respirable fue el factor limitante más importante en el control del proceso denitrificatorio, aún en suelos con bajo nivel de N-NO₃.

Es común que ocurran aumentos en las emisiones por denitrificación tras el agregado de residuos vegetales al suelo. Los residuos que se incorporan al suelo proveen C orgánico soluble que estimula los procesos de denitrificación (Liu *et al.*, 2006). Varios autores hallaron que la intensidad de la denitrificación esta relacionada positivamente a la distribución de los residuos vegetales en el perfil (Parry *et al.*, 1999; Aulakh *et al.*, 1991a). Mahmood *et al.* (1998) confirmaron que el efecto estimulante de los residuos de un cultivo a las tasas de denitrificación no se debía exclusivamente a la provisión de N, dadas las mayores emisiones por denitrificación ante el agregado de 200 kg N-abono que 200 kg N-urea, a pesar de los mayores niveles de N-NO₃⁻ medios en el último caso. Los NO₃⁻ formados alrededor de los residuos por nitrificación del N-NH₄⁺, que difunde desde el material orgánico agregado, pueden fácilmente volver hacia estos sitios de alta reducción, donde son denitrificados (Flessa y Beese, 1995).

4.1.1.2. Disponibilidad de C y emisiones de N₂O y tasa N₂O/(N₂O+N₂)

La adición de C fácilmente oxidable aumenta en general las emisiones de N₂O, aún bajo condiciones aparentemente aeróbicas (Azam *et al.*, 2002; Khalil *et al.*, 2002; Stehfest y Bouwman, 2006), siempre que los niveles de N-NO₃⁻ no sean limitantes (Dittert *et al.*, 2005). Las emisiones de N₂O generalmente aumentan luego de la incorporación de residuos vegetales, dependiendo la magnitud de las emisiones de la cantidad y calidad de residuos incorporados (Millar y Baggs, 2004). Millar y Baggs (2005) hallaron que las altas cantidades de C y N solubles de residuos de pastos tropicales estimularon en gran medida las emisiones de N₂O. Las emisiones de N₂O provocadas por el agregado de materiales orgánicos parecen deberse a procesos de denitrificación, dado que generalmente estos materiales incrementan la cantidad de sitios con aireación restringida (Meng *et al.*, 2005). En un suelo argiudol de la Región Pampeana, Ciampitti *et al.* (2005), reportaron que el efecto de la fertilización sobre las emisiones de N₂O se hizo más notable con la presencia de plantas de soja, por un mayor aporte de C durante la descomposición de los residuos luego de la cosecha. Simek (1999) encontró en suelos no fertilizados con N que el agregado de glucosa disminuía cuantitativamente las emisiones de N₂O; este autor también encontró que

cuando se agregaba al suelo N-NO_3^- , una pequeña adición de C-glucosa estimulaba las emisiones de N_2O , pero estas emisiones disminuían ante el agregado de mayores cantidades de C-glucosa. Estos resultados expresan el delicado balance entre las disponibilidades relativas de compuestos de C y N, o de dadores y aceptores de electrones, en las emisiones de N_2O .

Con respecto a la tasa $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ de las emisiones de gases nitrogenados, la disponibilidad de C puede modificar este valor. La hipótesis usual es que la disponibilidad de C orgánico afecta la disponibilidad relativa de agentes oxidantes vs reductores, y controla los productos finales de la denitrificación (Mathieu *et al.*, 2006), aunque el efecto de un cambio en la composición microbiana tras el agregado de materiales orgánicos no puede ser descartado (Wolsing y Priemé, 2004). En un trabajo clásico, Yoshinari *et al.* (1977) mostraron que el agregado de glucosa estimulaba la reducción de N_2O en varias concentraciones. Dittert *et al.* (2005) mostraron que el agregado de fuentes carbonadas fácilmente descomponibles promovió en mayor medida la generación de N_2 que la producción de N_2O , aunque no relacionaron estas emisiones entre sí. En estudios realizados con especies vegetales tropicales, suelos abonados con plantas ricas en compuestos carbonados solubles presentaron menores emisiones de N_2O que cuando fueron abonados con residuos pobres en sustancias solubles (Millar y Baggs, 2005), lo que fue atribuido a un mayor potencial de reducción del N_2O formado.

La incorporación de residuos al suelo, además de proveer C disponible, provee N que puede ser convertido a N-NO_3^- , hecho que también puede influir en la reducción del N_2O a N_2 , y por lo tanto en la tasa $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ de las emisiones. Se ha observado en suelos casi saturados que agregados de elevados niveles de C (360 kg C-glucosa. ha^{-1}) disminuyeron la relación de producción de $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ (Weier *et al.*, 1993), debido a una mayor necesidad de aceptores de electrones; sin embargo, el agregado conjunto de 360 kg C. ha^{-1} y 100 kg N. ha^{-1} condujo a altas tasas $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ lo que permite suponer, al menos en ciertas circunstancias, que el efecto inhibitor de los N-NO_3^- sobre la actividad de la enzima óxido nitroso-reductasa (Blackmer y Bremner, 1978) es el efecto dominante en la composición de las emisiones gaseosas por denitrificación. Por el contrario, Dambreville *et al.* (2006) encontraron una menor relación $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ con el agregado de abonos de origen animal que con el agregado de fertilizante mineral, a pesar de la mayor cantidad de N total incorporado en el primer caso; estos resultados sugieren que el efecto negativo de la presencia de N mineral sobre la reducción del N_2O a N_2 también puede a su vez ser contrareestado por el agregado de dadores de electrones como material orgánico fresco.

4.1.1.3. Descomposición de los residuos de un cultivo y emisiones de N_2 y N_2O

La mayoría de los estudios publicados con respecto a las emisiones de N_2O no son continuos y se basan en la estación de crecimiento de los cultivos. Mientras que el período de crecimiento está caracterizado predominantemente por la fertilización nitrogenada y un intenso crecimiento vegetal, el período de barbecho está principalmente influenciado por la mineralización de los residuos incorporados. Como fue mencionado, la única medida factible para reducir las pérdidas gaseosas por denitrificación es limitar la adición de NO_3^- o su formación en los suelos. La secuencia mineralización-inmovilización constituye una protección para el N del suelo en épocas de mayor peligro de denitrificación (Rodríguez, 1997), dado que en los primeros momentos de la descomposición de residuos con elevadas relaciones C/N la inmovilización del N ocurre a velocidades más altas que lo que es provisto por el sustrato (Ambus y Jensen, 1997). Shelton *et al.* (2000) encontraron bajos niveles de denitrificación 3 días después de la incorporación del cultivo de *Vicia villosa*, usado como abono verde, posiblemente debido a una descomposición y mineralización

limitada, niveles que se vieron aumentados notablemente a los 17 y 31 días de comenzada la incubación. Se ha reportado que la adición de paja de cereales, de alta relación C:N a cilindros intactos de suelo redujo las emisiones por denitrificación debido a una fuerte inmovilización del N mineral durante la primer semana (Hadi *et al.*, 2000) o el primer mes (Aulakh *et al.*, 1984b) de descomposición. Se ha sugerido la incorporación al suelo de residuos de alta relación C:N para regular las cantidades de N mineral en los suelos, y por lo tanto el sustrato para las reacciones que desembocan en emisiones de N₂O (Dalal *et al.*, 2003).

Sin embargo, se ha propuesto que el efecto de la humedad es más importante que el efecto de agregado de residuos sobre las emisiones de N₂O y sobre la tasa N₂O/(N₂O y N₂) (Meng *et al.*, 2005). Los ciclos de humedecimiento secado ocurren naturalmente en suelos agrícolas cuando son irrigados o por el agua de lluvia, especialmente en suelos de drenaje deficiente, y ofrecen un problema interesante pero sumamente dificultoso de identificar los principales controles y organismos responsables de las emisiones de N₂O (Davidson, 1992). Como ejemplo, las emisiones de N₂O en una temporada fueron modeladas en el modelo DNDC como una secuencia de períodos secos y húmedos (Li *et al.*, 1992a). Es conocido que la mineralización del N aumenta tras el drenaje de suelos anegados y subsecuente aireación (Updegraff *et al.*, 1995); sin embargo, Wang *et al.* (2001) hallaron mayor inmovilización de N en condiciones aeróbicas que bajo anegamiento en suelos con altas tasas de inmovilización (>20 mg N kg⁻¹), lo que puede indicar que los períodos de anaerobiosis pueden ser una fuente importante de N-NH₄⁺ que puede ser nitrificado en condiciones aeróbicas. McKenney *et al.* (1993) encontraron que el agregado de residuos de leguminosas incrementó las emisiones de N por denitrificación sólo cuando existió una incubación aeróbica de 5 días previo a la incubación anaeróbica.

Ha sido observado que las variaciones temporales en la evolución del N₂O durante ciclos de humedecimiento secado es muy diferente a aquellas durante anegamiento o con suelo bien aireado en forma continua (Cai *et al.*, 2001), resultando en que las emisiones de N₂O fueron estimuladas por los ciclos de humedecimiento-secado (Yan *et al.*, 2000). Altas tasas de denitrificación y emisiones de N₂O fueron observadas en condiciones repetidas de ciclos de humedecimiento-secado (Davidsson y Leonardson, 1998; Olde Venterink *et al.*, 2002) debido probablemente a la reducción en anaerobiosis de los NO₃⁻ acumulados en los períodos aeróbicos. Sin embargo, Flessa y Beese (1995) encontraron las máximas emisiones de N₂O tras el agregado al suelo de residuos de remolacha azucarera en los momentos de secado del suelo, entre períodos de anegamiento temporario, coincidiendo con Otte *et al.* (1996) y Cai *et al.* (1997) quienes encontraron las máximas emisiones de N₂O en suelos irrigados cuando el agua superficial era drenada, posibilitando una rápida difusión del N₂O formado.

La historia de humedad del suelo puede ser particularmente importante debido a que si las enzimas de la denitrificación son inducidas diferencialmente en respuesta al humedecimiento, esto puede afectar tanto la magnitud total de la denitrificación como la tasa N₂O/(N₂O+N₂) de dicho proceso (Dendooven y Anderson, 1995; Dendooven *et al.*, 1996; Bergsma *et al.*, 2002). La diferencia en la persistencia de las distintas enzimas reductasas de la cadena denitrificadora bajo condiciones aeróbicas puede llevar a diferencias en la tasa N₂O/(N₂O+N₂) de las emisiones bajo condiciones anaeróbicas en ciclos de humedecimiento-secado (Dendooven y Anderson, 1995), contribuyendo a la variabilidad espacial y temporal de dicha tasa. Una rápida formación de N₂O luego del humedecimiento de un suelo seco puede deberse a que la enzima nitrato-reductasa es inhibida reversiblemente por el oxígeno, mientras que la actividad de la óxido nitroso-reductasa parece serlo en forma irreversible (Otte *et al.*, 1996). Bergsma *et al.* (2002) hallaron que una preincubación anaeróbica de cilindros de suelo por 48 horas no afectaba las tasas de denitrificación pero disminuía la

proporción de N_2O en los productos finales de 0,9 a 0,36 durante una incubación anaeróbica de 24 horas sólo en un suelo cultivado seco al aire; estos resultados sugieren que la enzima óxido-nitroso reductasa no persistió cuando el suelo fue secado al aire, pero fue exitosamente reestablecida tras 2 días de anaerobiosis, mientras que las enzimas nitrato y nitrito-reductasas fueron menos influidas por la aireación. La medición conjunta de N_2O+N_2 y de N_2O , y la estimación de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$, en ciclos de saturación-secado es difícil de encontrar en la literatura científica.

La producción con genotipos modernos de alto rendimiento induce al uso de fertilizantes en forma continua y masiva, fundamentalmente de N y fósforo (P) por lo que en estos sistemas se generan elevados ingresos de C durante la incorporación del rastrojo y se promueve intensamente la actividad de organismos nitrificadores y denitrificadores (Conti *et al.*, 1997). La abundancia de dadores de electrones resultantes podría promover el consumo elevado de O_2 y por lo tanto la generación de un ambiente marginalmente aeróbico, lo que podría afectar las emisiones de N_2O y de N_2 . En adición, fenómenos de saturación hídrica del suelo pueden influenciar tanto las condiciones de óxido reducción como la intensidad de los procesos de descomposición-mineralización, afectando las emisiones absolutas de N_2O como la composición de los productos finales de la denitrificación desde suelos con residuos en estados iniciales de descomposición. El conocimiento actual del tema carece de información acerca de las emisiones de N_2O y de la emisión relativa de $N_2O/(N_2O+N_2)$ durante la descomposición de residuos del cultivo de soja, bajo distintas condiciones de humedad.

4.1.2. Objetivo específico

El objetivo de este capítulo es analizar el efecto de la descomposición de residuos de soja sobre las emisiones de N_2O y tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ bajo diferentes contenidos y dinámicas de la humedad del suelo.

4.1.3. Hipótesis específicas

- I) La presencia de residuos aumentará las emisiones de N_2O bajo condiciones de aireación no restringida, debido al aumento de las emisiones de N_2O+N_2 por denitrificación
- II) Dicho aumento se incrementará con cantidades crecientes de residuos, por un mayor aporte de N y C respirable, aunque la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ disminuirá por la formación de un ambiente mas reductor.
- III) Ciclos de saturación-secado del suelo elevarán las emisiones de N_2O promedio durante la descomposición de un cultivo de soja con respecto a condiciones continuas de anegamiento.

4.2. Metodología específica

4.2.1. Muestreo y acondicionamiento del suelo

El suelo es un Hapludol típico del establecimiento El Rincón ($35^{\circ} 05' 17''$ S $61^{\circ} 31' 53''$ O), de textura areno-franca, con 800 g kg^{-1} , $137,5 \text{ g kg}^{-1}$ y $62,5 \text{ g kg}^{-1}$ de arena, limo y arcilla respectivamente, y cuyas características al momento de la extracción se presentan en la Tabla 4.1. Al momento del muestreo, el día 11 de Mayo de 2006, el suelo se encontraba en período de barbecho, con rastrojos de un cultivo de soja cosechado la tercera semana de Marzo, sin presencia importante de malezas verdes.

TABLA 4.1: Características generales del suelo.

N-NO₃⁻ (mg kg⁻¹)	Corg (%)	Nt (%)	Dens. ap. (g cm⁻³)	HE (%)	WFPS(%) a HE	P ext. (mg kg⁻¹)
13,81	0,88	0,12	1,18	14,5	30,41	13,1

4.2.2. Tratamientos e incubación del suelo

Los cilindros extraídos se separaron para la realización de 2 experimentos.

4.2.2.1. Experimento 1

El primer experimento consistió en la aplicación de tres diferentes cantidades de residuos bajo dos situaciones de humedad contrastantes. La incubación de los cilindros se llevó a cabo por 11 días.

El diseño del experimento fue completamente aleatorizado con arreglo factorial, con los factores residuos y humedad, con tres repeticiones. La combinación de los tratamientos dio como resultado un factorial de 3 (niveles de residuos) x 2 (regímenes de humedad) = 6 tratamientos.

Niveles de residuos

R0. Sin agregado de residuos

R1. Agregado de residuos en una cantidad similar a lo incorporado en un cultivo de rendimiento medio. Esta cantidad se estima en 2600 kg de residuos, resultado de un rendimiento de 2600 kg de residuos y un índice de cosecha del 50%. Esta cantidad se aplica por única vez y se semi-incorpora al inicio del experimento.

R2. Agregado de residuos en una cantidad similar al doble de lo incorporado en un cultivo de rendimiento medio. Esta cantidad se estima en 5200 kg de residuos. Esta cantidad se aplica por única vez y se semi-incorpora al inicio del experimento.

El residuo de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] consistió principalmente de restos de tallos, hojas y vainas, con contenidos de 52,55 g C y 1,69 g N por cada 100 g de residuo (Relación C:N = 31). Estos residuos fueron cortados a tamaños menores de 5 mm, debido a que bajo este tamaño son más susceptibles al ataque microbiano por un mejor contacto suelo-residuo (Angers y Recous, 1997).

Niveles de humedad

50% WFPS suelo con el 50% del espacio poroso ocupado por agua

100% WFPS Suelo con el 100 % de WFPS (saturado)

El agregado de agua y residuos fue llevado a cabo el día 1, por lo menos 2 horas antes del inicio de la acumulación de gases para minimizar posibles pulsos gaseosos generados por el llenado de los poros con agua.

Se realizaron tres mediciones por tratamiento de emisiones de N al día 1, a los 4 días, 7 días y 11 días de la incubación. Los frascos con los cilindros permanecieron expuestos a la atmósfera entre mediciones y su humedad fue corregida regularmente para subsanar las pérdidas por evaporación.

4.2.2.2. Experimento 2

El segundo experimento consistió en la incubación de suelos con y sin la presencia de residuos bajo diferentes condiciones de humedad y dentro de ciclos de saturación-secado de diferente longitud. En este experimento se incorporó sólo una cantidad de residuos equivalente a lo dejado por un cultivo de soja con un rendimiento medio, para evitar procesos intensos de inmovilización, que fueron observados en el experimento 1 (Ver resultados). La incubación de los cilindros se llevó a cabo por 83 días.

El diseño del experimento fue completamente aleatorizado con arreglo factorial, con los factores residuos y humedad, con tres repeticiones. La combinación de los tratamientos dio como resultado un factorial de 2 (niveles de residuos) x 4 (regímenes de humedad) = 8 tratamientos.

Niveles de residuos

R0. Sin agregado de residuos

R1. Agregado de residuos en una cantidad similar a lo incorporado en un cultivo de rendimiento medio. Esta cantidad se estima en 2600 kg de residuos, resultado de un rendimiento de 2600 kg de residuos y un índice de cosecha del 50%. Esta cantidad se aplica por única vez y se semi-incorpora al inicio del experimento. El residuo de soja y su tratamiento son los mismos que los utilizados en el experimento 1.

Niveles de humedad

CC Suelo con el 30% del espacio poroso ocupado por agua (WFPS)

SAT Suelo con el 100 % de WFPS (saturado)

CC-SAT10 Suelo con ciclos de saturación-secado de 10 días-10 días

CC-SAT20 Suelo con ciclos de saturación-secado de 20 días-20 días

El agregado de agua fue llevado a cabo por lo menos 2 horas antes del muestreo de gases para minimizar posibles pulsos gaseosos generados por el llenado de los poros con agua.

Se realizaron tres mediciones por tratamiento de emisiones gaseosas de N al día 1, a los 6 días, 13 días, 28 días, 35 días, 56 días, 76 días y 83 días de la incubación. Los frascos con los cilindros permanecieron expuestos a la atmósfera entre mediciones y su humedad fue corregida regularmente para subsanar las pérdidas por evaporación.

4.2.3. Pretratamientos y determinaciones químicas

Las muestras de suelo adicionales fueron sometidas a las siguientes determinaciones básicas según las metodologías descritas en el Capítulo 1:

- pH en agua en relación suelo:agua 1:2,5 (Thomas, 1996)
- N-NO₃⁻ (Carole and Scarigelli 1971).
- Carbono oxidable total (Cox) (Nelson y Sommers, 1996)
- Carbono orgánico soluble en K₂SO₄ 0,5M (Dambreville *et al.*, 2006).
- Carbono orgánico particulado (COP) (Cambardella y Elliott, 1992).
- Respiración en laboratorio (Jenkinson y Powlson, 1976).
- Potencial Redox (Eh) con electrodo específico (Patrick *et al.*, 1996)

4.2.4. Cálculos y análisis estadísticos

Se realizaron diagnósticos de influencia (Myers, 1986), y luego se evaluó nuevamente el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas para las variables estudiadas. Se realizaron con el procedimiento PROC REG del programa SAS análisis de regresión simple entre las variables respuesta (pérdidas por denitrificación y emisiones de óxido nitroso) y las distintas variables químicas edáficas medidas. También se realizó un análisis de regresión múltiple con el procedimiento PROC REG, con el objetivo de encontrar a las variables edáficas que expliquen en mayor medida la variabilidad de las emisiones de N₂O y las emisiones totales por denitrificación. Los diagnósticos de multicolinealidad fueron hechos previamente a los distintos análisis de regresión, y luego se eligió el modelo más

adecuado dentro de todos los modelos existentes posibles con las variables explicatorias, de acuerdo al Cp de Mallows (Mallows, 1973), CME y coeficiente de determinación R^2 ajustado por el número de parámetros (MacNeil, 1983).

Debido a que las mediciones de las emisiones y la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ fueron realizadas en las mismas macetas a lo largo de la incubación, el modelo estadístico elegido fue el de medidas repetidas; sin embargo debido a que los datos no cumplían las condiciones de esfericidad, de Huynh-Feldt y de Greenhouse-Geisser (Huynh y Feldt, 1970), estas variables fueron analizadas con análisis de varianza multivariado, MANOVA. Dado que en todos los casos existió interacción entre los tratamientos y el tiempo de incubación, se realizaron análisis de varianza convencionales fecha por fecha y se separaron las medias según Duncan; de la misma manera fueron analizados los niveles de $N-NO_3^-$, pH, Eh y distintas fracciones del C del suelo. Las emisiones acumuladas y tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$ promedio fueron evaluadas con análisis de varianza convencionales a través del procedimiento PROC GLM del paquete estadístico SAS, siendo la separación de medias según Duncan realizada cuando el estadístico-F entre tratamientos fue significativo.

4.3. Resultados

4.3.1. Experimento 1

4.3.1.1. Potencial rédox y contenidos de $N-NO_3^-$ del suelo

Los valores de potencial rédox, Eh, disminuyeron levemente de un valor promedio de 202,5 mV al inicio de la incubación a 129,1 mV al día 11 (Fig. 4.1a) bajo contenidos de humedad del 50% WFPS. Bajo ese contenido de humedad, los valores de Eh fueron significativamente superiores ($p=0,05$) en los suelos sin aplicación de residuos a partir del cuarto día de incubación, sin diferencias significativas entre los tratamientos que incluían la aplicación de residuos de soja. Bajo contenidos de humedad de 100% WFPS, los valores de potencial rédox (Eh) disminuyeron de un valor promedio de 71,2 mV al inicio de la incubación a -52,7 mV al día 11 (Fig. 4.1b), siendo el suelo sin aplicación de residuos el que presentó la mayor disminución absoluta de Eh, de 178mV entre el primer y último día de incubación. Los valores de Eh en los suelos donde no se agregaron residuos fueron mayores al resto de tratamientos de residuos durante toda la incubación ($p=0,005$) bajo contenidos de humedad del 100% WFPS. Los suelos que fueron tratados con 2600 kg ha^{-1} de residuos presentaron bajo este contenido de humedad valores de Eh superiores a aquellos que fueron tratados con 5200 kg ha^{-1} de residuos en los días 7 y 11 de la incubación ($p=0,03$ y $p=0,006$, respectivamente).

La concentración de $N-NO_3^-$ tendió a aumentar bajo contenidos de humedad del 50% WFPS, independientemente del tratamiento de residuos (Fig. 4.1c). Bajo contenidos de humedad del 100% WFPS los contenidos de $N-NO_3^-$ disminuyeron con el tiempo (Fig. 4.1d), siendo durante toda la incubación mayores sin la aplicación de residuos ($p=0,03$) que con la aplicación de 2600 y 5200 kg de residuos de soja por hectárea de suelo.

4.3.1.2. Emisiones gaseosas de N

Las emisiones diarias de N_2O bajo los dos tratamientos de humedad impuestos presentaron valores en general bajos con pocos puntos con emisiones muy altas, lo que derivó en un comportamiento errático y una variabilidad extrema (Fig. 4.2 a y b), con coeficientes de variación que oscilaron entre 235 y 424%, evitando cualquier posibilidad de detectar diferencias significativas entre tratamientos. Las emisiones acumuladas de N_2O también presentaron gran variabilidad, oscilando entre 0 y $248,21 \mu\text{gN kg}^{-1}$ de suelo. Las emisiones acumuladas de N_2O presentaron un coeficiente de variación del 166%, que limitó seriamente la sensibilidad de la separación de medias

de los tratamientos, no detectándose diferencias significativas entre los tratamientos de humedad ($p=0,59$) o de residuos ($p=0,83$) (Fig. 4.3a). El coeficiente de variación de las emisiones acumuladas de N_2O bajo contenidos de humedad del 50% WFPS fue de 230%, mayor al correspondiente a dichas emisiones con contenidos de humedad del 100% WFPS, que fue de 156%, mientras que el agregado de residuos condujo a disminuciones en los coeficientes de variación de hasta un 79,5%.

Las emisiones diarias de N_2O+N_2 presentaron una fuerte variabilidad temporal (Fig. 4.2 c y d), con coeficientes de variación que oscilaron entre 92 y 400%. Las emisiones diarias de N_2O+N_2 en el primer día de medición fueron afectadas sólo por los niveles de residuos, siendo estas emisiones en los dos tratamientos con residuos similares y significativamente menores que en suelos no abonados ($p=0,03$). Al cuarto día de incubación, las emisiones de N_2O+N_2 fueron afectadas por los niveles de humedad ($p=0,001$), siendo mayores bajo condiciones de 100% WFPS, y por los tratamientos de residuos ($p=0,04$), sin interacción entre los tratamientos; en este día el agregado de 5200 kg residuos ha^{-1} condujo a disminuciones en estas emisiones con respecto al agregado de 2600 kg ha^{-1} . En los días 7 y 11 de la incubación se registraron fuertes interacciones entre los tratamientos de humedad y de residuos ($p=0,0004$ y $0,007$, respectivamente) sobre las emisiones diarias de N_2O+N_2 . En estos dos días las emisiones diarias de N_2O+N_2 fueron mayores bajo el mayor nivel de humedad cuando no se aplicaron residuos ($p<0,0001$) y sin diferencias significativas entre los tratamientos de humedad cuando se aplicaron 5200 kg residuos ha^{-1} ($p=0,37$ y $0,11$, para ambos días); cuando se aplicó a los suelos una cantidad de 2600 kg residuos ha^{-1} , el aumento de humedad de 50 a 100% WFPS condujo a mayores emisiones de N_2O+N_2 ($p<0,0001$) al séptimo día de incubación, mientras que no existieron diferencias significativas entre estos tratamientos de humedad al día once de la incubación ($p=0,83$). Al séptimo día las emisiones diarias de N_2O+N_2 no fueron influenciadas por los tratamientos de residuos bajo contenidos de humedad de 50% WFPS ($p=0,42$), mientras que en suelos saturados de humedad el agregado de 5200 kg ha^{-1} de residuos redujo ostensiblemente las emisiones de N_2O+N_2 ($p<0,0001$).

Las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 también presentaron gran variabilidad, oscilando entre 0 y 52,9 $\mu gN\ kg^{-1}\ d^{-1}$ de suelo, que representaron entre el 0 y el 3,93% del N agregado con el residuo. El coeficiente de variación de las emisiones acumuladas de N_2O bajo contenidos de humedad del 50% WFPS fue de 95,2%, mayor al correspondiente a dichas emisiones con contenidos de humedad del 100% WFPS, que fue de 38%. Las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 presentaron una fuerte interacción entre los tratamientos de humedad y de residuos ($p=0,005$) (Fig. 4.3b). Con la aplicación de 0 y 2600 kg residuos ha^{-1} el tratamiento de humedad de 100% WFPS presentó emisiones acumuladas de N_2O+N_2 significativamente mayores al tratamiento de humedad de 50% WFPS ($p=0,05$ y $0,023$, respectivamente), mientras que cuando se agregaron al suelo 5200 kg residuos ha^{-1} , no existieron diferencias significativas entre tratamientos de humedad ($p=0,5$). Bajo condiciones de humedad de 50% WFPS no se detectaron diferencias significativas en las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 entre los tratamientos de residuos ($p=0,21$, Fig. 4.3b), mientras que en condiciones de saturación de humedad, las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 disminuyeron ante el agregado de cantidades crecientes de residuos de soja ($p=0,017$, Fig. 4.3b).

A diferencia de lo hallado en los capítulos anteriores, no se encontró una asociación significativa entre las emisiones acumuladas de N_2O y emisiones acumuladas de N_2O+N_2 ($p=0,51$), ni en el set completo de datos, ni analizándolos en cada nivel de los tratamientos, probablemente por la alta variabilidad en las emisiones de N_2O .

4.3.1.3. Relación entre las emisiones gaseosas y otras variables edáficas

Debido a su elevada variabilidad, las emisiones gaseosas de N_2O y de N_2O+N_2 no se asociaron a ninguna de las variables edáficas medidas.

4.3.2. Experimento 2

4.3.2.1. Potencial rédox, pH, $N-NO_3^-$ y fracciones de C

Los valores de Eh disminuyeron durante la incubación cuando el suelo permaneció saturado con agua en forma continua, especialmente cuando se agregaron al suelo 2600 kg ha^{-1} de residuos de soja (Fig. 4.4 a y b), mientras que bajo capacidad de campo continua los valores se mantuvieron más o menos constantes. Bajo condiciones alternadas de secado-humedecimiento, los valores de Eh siguieron una tendencia fluctuante (Fig. 4.4 a y b), incrementándose el rango de valores a medida que aumentó la duración de los ciclos de humedecimiento-secado. Los valores medios de Eh fueron afectados por los tratamientos de humedad, siendo bajo saturación de humedad continua estadísticamente menores al resto de los tratamientos ($p=0,0001$). Los valores de Eh fueron también significativamente afectados por los tratamientos de residuos ($p<0,0001$), siendo menores cuando al suelo se le aplicaron residuos de soja, sin interacción con los tratamientos de humedad ($p=0,21$). Los valores medios de pH fueron significativamente afectados por los tratamientos de humedad ($p<0,0001$) y de residuos ($p=0,006$), sin interacción entre tratamientos ($p=0,06$). El agregado de residuos aumentó el pH medio del suelo en los cilindros de 6,16 a 6,47. La saturación continua de humedad llevó a los máximos valores de pH (6,26), mientras que ciclos de humedecimiento y secado llevaron a valores de pH intermedios, entre 6,18 y 6,29, y significativamente menores a aquellos bajo saturación continua. Los valores de Eh y pH se relacionaron inversamente en forma intensa ($p<0,0001$; $r^2=0,6$).

Los contenidos de $N-NO_3^-$ aumentaron levemente durante la incubación cuando el suelo se mantuvo a capacidad de campo en forma constante, CC, mientras que disminuyeron en forma importante cuando el suelo se mantuvo constantemente saturado de agua (Fig. 4.4 c y d). Bajo condiciones alternadas de humedecimiento-secado los contenidos de $N-NO_3^-$ presentaron una tendencia fluctuante, tendiendo a disminuir con el tiempo. Los valores medios de $N-NO_3^-$ fueron afectados significativamente por los tratamientos de residuos y humedad, con una fuerte interacción entre tratamientos ($p=0,02$). En ausencia de residuos de soja, ciclos alternados de humedecimiento-secado de 20 días presentaron niveles medios de $N-NO_3^-$ de $46,25 \text{ mgN kg}^{-1}$, estadísticamente menores ($p=0,0007$) que en condiciones de capacidad de campo continuas ($60,15 \text{ mgN kg}^{-1}$), mientras que ciclos de 10 días, con un contenido medio de $52,37 \text{ mgN kg}^{-1}$, no disminuyeron significativamente los niveles de $N-NO_3^-$ con respecto a suelos bajo capacidad de campo continua. En presencia de residuos de soja, ciclos de 10 días, con un contenido medio de $31,28 \text{ mgN kg}^{-1}$, disminuyeron significativamente los niveles de $N-NO_3^-$ con respecto a suelos bajo capacidad de campo continua ($p=0,0003$) con un valor medio de $65,46 \text{ mgN kg}^{-1}$, mientras que ciclos de 20 días ($50,65 \text{ mgN kg}^{-1}$) no lo hicieron. En cualquier caso los contenidos medios de $N-NO_3^-$ bajo saturación continua fueron significativamente menores al resto de los tratamientos de humedad, mientras que la aplicación de residuos disminuyó significativamente estos contenidos ($p=0,002$). El contenido de $N-NO_3^-$ se relacionó significativa y positivamente con el Eh del suelo ($p<0,0001$; $r^2=0,55$) y en forma inversa con el valor de pH del suelo ($p<0,0001$; $r^2=0,67$).

Las distintas fracciones de C se comportaron en forma diferente en cuanto a su evolución en el tiempo. El contenido de C orgánico total, Corg, y de C asociado al mineral o no particulado, Cmin, se mantuvieron más o menos constantes, mientras que los contenidos de C orgánico particulado, COP, disminuyeron durante la incubación, independientemente del tratamiento de residuos o humedad (Fig. 4.4 e y f). Los valores de Corg y Cmin no fueron afectados en este experimento por los

tratamientos de humedad o residuos ($p > 0,05$; Fig. 4.5b y c). Los valores medios de COP fueron sólo afectados por los tratamientos de residuos ($p = 0,004$), siendo mayores en suelos con agregados de residuos de soja (Fig. 4.5a). El contenido de COP se relacionó en forma significativa e inversa con los valores de Eh del suelo ($p = 0,039$; $r^2 = 0,18$) y muy intensamente en forma positiva con el contenido de C org ($p < 0,0001$; $r^2 = 0,84$). El contenido de C soluble en agua, Csol, mantuvo una evolución errática (datos no mostrados), sin ser influenciado en forma significativa por los distintos tratamientos impuestos ($p > 0,05$).

4.3.2.2. Emisiones gaseosas de N

Las emisiones diarias de N_2O oscilaron en promedio desde 0 a $35,32 \mu gN kg^{-1} h^{-1}$ (Fig. 4.6a y b), con un coeficiente de variación entre 79,22 y 180,35%. Las emisiones diarias de N_2O presentaron un pico al inicio de la incubación, luego del agregado de agua correspondiente a cada tratamiento de humedad, que fue mayor en suelos abonados con $2600 kg ha^{-1}$ de residuos de soja (Fig. 4.6a y b). En dichas figuras puede observarse las bajas emisiones de N_2O luego del mencionado pico inicial bajo un contenido de humedad próximo a capacidad de campo o saturado en forma continua, efecto acentuado cuando el suelo fue abonado con residuos de soja. También puede observarse la respuesta creciente de estas emisiones al fenómeno de resaturación del suelo, especialmente en aquellos suelos sometidos a ciclos de 20 días de saturación-secado. Los suelos sometidos a ciclos de saturación-secado presentaron en general las mayores emisiones diarias de N_2O , (Fig. 4.6a y b), aunque los tratamientos de humedad generaron diferencias estadísticas en las emisiones de N_2O sólo en los días 28, 35 y 76 luego del inicio de la incubación. Al día 28 los tratamientos que incluían ciclos de saturación-secado de 10 y 20 días, CC-SAT 10 y 20, presentaron emisiones de N_2O similares y significativamente mayores a aquellas desde suelos a capacidad de campo o saturados continuamente ($p = 0,0008$). En los días 35 y 76 de la incubación, las emisiones de N_2O fueron significativamente máximas en suelos bajo ciclos alternados de saturación-secado de 20 días ($p < 0,0001$), aunque estas emisiones bajo ciclos de 10 días presentaron también mayores valores que en condiciones continuas de una determinada humedad.

Analizando todas las emisiones diarias en forma conjunta con técnicas de Análisis de Varianza Multivariado (MANOVA) se detectó un efecto global significativo de los tratamientos de humedad sobre las emisiones diarias de N_2O ($p = 0,016$), mientras que los efectos globales de los tratamientos de residuos y de la interacción tratamientos de humedad-residuos sobre estas emisiones no fueron significativos ($p = 0,33$ y $0,27$, respectivamente). Las emisiones acumuladas de N_2O también fueron afectadas en forma significativa por los tratamientos de humedad ($p < 0,0001$), sin interacción detectable con los tratamientos de residuos ($p = 0,18$). Las emisiones acumuladas de N_2O fueron similares y máximas bajo ciclos de saturación-secado de 10 y 20 días de duración, y mínimas y similares en condiciones continuas de humedad (Fig. 4.7a). El agregado de residuos de soja disminuyó significativamente las emisiones acumuladas de N_2O ($p = 0,006$; Fig. 4.7a). El coeficiente de variación de las emisiones acumuladas de N_2O fue de 67,5, 36,5, 28,6 y 99,9%, para los contenidos de humedad de capacidad de campo, ciclos de saturación-secado de 10 días, ciclos de 20 días y saturación continua, respectivamente.

Las emisiones diarias de $N_2O + N_2$ oscilaron en promedio desde 0 a $54,62 \mu gN kg^{-1} h^{-1}$ (Fig. 4.6c y d), con un coeficiente de variación entre 83,45 y 267,1%. Luego de un pequeño pico inicial, las emisiones diarias de $N_2O + N_2$ disminuyeron con el tiempo en suelos con contenidos de humedad constantes (Fig. 4.6c y d). Las emisiones de $N_2O + N_2$ aumentaron tras la saturación con agua en suelos abonados con residuos de soja y sometidos a ciclos de saturación-secado de 10 y 20 días de duración, mientras que en suelos no abonados, estas emisiones respondieron fuertemente a la re-

saturación sólo bajo ciclos de 20 días de duración (Fig. 4.6c y d). Los tratamientos de humedad generaron diferencias estadísticas ($p < 0,05$) en las emisiones de N_2O+N_2 a partir del día 13 de la incubación (Fig. 4.6a y b). Al día 13, las emisiones de N_2O+N_2 fueron máximas bajo condiciones de saturación en suelos no abonados con residuos ($p=0,038$), mientras que en suelos abonados con residuos de soja, estas emisiones bajo ciclos de saturación-secado de 10 días de duración fueron significativamente mayores al resto de los tratamientos de humedad ($p=0,001$). A partir del día 13, las emisiones de N_2O+N_2 bajo ciclos de saturación-secado de 10 y 20 días de duración fueron en general similares y significativamente mayores al resto de los tratamientos de humedad ($p < 0,001$).

Analizando todas las emisiones diarias en forma conjunta con Análisis de Varianza Multivariado se detectó un efecto global significativo de los tratamientos de humedad sobre las emisiones diarias de N_2O+N_2 ($p=0,018$), mientras que los efectos globales de los tratamientos de residuos y de la interacción tratamientos de humedad-residuos sobre estas emisiones no fueron significativos ($p=0,45$ y $0,29$, respectivamente). Las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 también fueron afectadas en forma significativa por los tratamientos de humedad ($p < 0,0001$), detectándose una interacción significativa con los tratamientos de residuos ($p=0,038$). En ausencia de residuos de soja, las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 fueron máximas y similares bajo ciclos de saturación-secado de 10 y 20 días de duración y en condiciones de saturación continua ($p=0,006$; Fig. 4.7b). Cuando los suelos fueron abonados con residuos de soja, las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 bajo condiciones de humedad alternadas fueron significativamente mayores a aquellas desde suelos con contenidos de humedad constantes ($p=0,004$; Fig. 4.7b). El agregado de residuos de soja aumentó las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 bajo ciclos de humedad alternadas ($p < 0,01$) mientras que no modificó significativamente estas emisiones en condiciones de humedad constantes ($p=0,69$; Fig. 4.7b).

Las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 se relacionaron en forma significativa con las emisiones acumuladas de N_2O ($p < 0,0001$; Fig. 4.10), con pendientes similares entre los tratamientos de humedad ($p=0,27$) o de residuos ($p=0,47$).

La tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ de las emisiones de gases nitrogenados presentaron valores bajos que fueron generalmente menores a la unidad (Fig. 4.6e y f), con excepción del tratamiento con ciclos de saturación-secado de 10 días en suelos sin la presencia de residuos de soja (Fig. 4.6e). La tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ presentó una alta variabilidad, con coeficientes de variación entre 95,1 y 195,6%. Debido a los numerosos valores nulos, ceros, de las emisiones de N_2O+N_2 bajo condiciones de humedad de capacidad de campo constantes (Fig. 4.6c y d), esta tasa no pudo ser calculada en numerosas situaciones bajo ese contenido de humedad, y sus datos no son incluidos dentro del análisis de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ de las emisiones. No se detectaron influencias de los tratamientos de humedad o residuos ($p > 0,05$) sobre esta tasa en los días 1,6, 13, 56, 76 y 83 de la incubación. La tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ fue afectada por los tratamientos de humedad el día 28 de la incubación ($p=0,001$), sin interacción con los tratamientos de residuos ($p=0,09$); en este día la tasa fue significativamente mayor bajo el tratamiento con ciclos de saturación-secado de 10 días, con respecto a aquellas bajo ciclos de saturación-secado de 20 días o de saturación de humedad continua (Fig. 4.6 e y f). La tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ fue disminuida significativamente por la presencia de residuos ese mismo día ($p=0,003$), independientemente del tratamiento de humedad. Al día 35 de la incubación, los tratamientos de humedad presentaron efectos diferentes según la presencia o no de residuos de soja: en ausencia de residuos la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ fue significativamente mayor bajo condiciones alternadas de humedad con períodos de 10 días de duración que el resto de los tratamientos de humedad ($p=0,006$), mientras que no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos de humedad en presencia de residuos

de soja ($p=0,11$). En ese día, la presencia de residuos disminuyó la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ sólo bajo ciclos de saturación-secado de 10 días ($p=0,007$).

Las tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$ promedio de todo el experimento fueron afectadas en forma significativa por los tratamientos de humedad ($p=0,022$), detectándose una interacción significativa con los tratamientos de residuos ($p=0,025$). En ausencia de residuos de soja, las tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$ promedio fueron mayores bajo el tratamiento con ciclos de saturación-secado de 10 días, con respecto a aquellas bajo ciclos de saturación-secado de 20 días o de saturación de humedad continua ($p=0,029$; Fig. 4.8), mientras que en presencia de residuos esas diferencias desaparecieron ($p=0,1$; Fig. 4.8). El agregado de residuos de soja modificó las tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$ promedio sólo bajo ciclos de saturación-secado de 10 días ($p=0,008$; Fig. 4.8).

4.3.2.3. Emisiones de CO_2

Las emisiones diarias de CO_2 oscilaron en promedio desde 1,58 a 29,82 $\mu gC\ g^{-1}\ h^{-1}$ (Fig. 4.9 a y b), con un coeficiente de variación entre 42,53 y 88,31%. Las emisiones de CO_2 desde suelos sin el agregado de residuos permanecieron bajas y aproximadamente constantes (Fig. 4.9a), mientras que con el agregado de residuos estas emisiones fueron inicialmente altas y tendieron a disminuir con el tiempo (Fig. 4.9b). Las emisiones diarias de CO_2 fueron afectadas por los tratamientos de humedad el primer día y sobre el final de la incubación. Al primer día, las emisiones de CO_2 bajo condiciones de saturación continua fueron menores al resto de los tratamientos de humedad ($p=0,029$). A partir del día 56, las emisiones diarias de CO_2 fueron en general significativamente mayores bajo ciclos de saturación-secado que bajo condiciones de humedad constantes ($p<0,05$). La presencia de residuos aumentó significativamente las emisiones diarias de CO_2 ($p<0,05$) en 6 de los 8 días donde se determinaron estas emisiones. Las emisiones acumuladas de CO_2 se relacionaron positiva y significativamente con las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 ($p=0,011$; Fig. 4.11b), con la misma pendiente para los diferentes tratamientos de humedad ($p=0,08$), pero no se asociaron estadísticamente con las emisiones de N_2O ($p=0,36$).

4.3.2.4. Relación entre las emisiones gaseosas y otras variables edáficas

Las emisiones acumuladas de N_2O se relacionaron en forma positiva y significativa con los valores medios de Eh ($p=0,038$; Fig. 4.11a), con la misma pendiente para los diferentes tratamientos de humedad ($p=0,94$). Ningún modelo de regresión múltiple mejoró la explicación de la variabilidad de las emisiones de N_2O o de N_2O+N_2 , con respecto a los modelos de regresión simple.

Cuando se evaluaron todos los datos en conjunto, la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ se relacionó ligeramente con los valores medios de Eh ($p=0,056$; $r^2=0,16$), mientras que cuando se excluyeron los datos del tratamiento de humedad de saturación constante, estas variables se relacionaron en forma más intensa ($p=0,025$, $r^2=0,3$). Como puede verse en la figura 4.12a, la forma más adecuada para la relación entre la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ y los valores de Eh fue de meseta-lineal. La tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ también se relacionó en forma significativa y positiva con los contenidos de $N-NO_3^-$ del suelo ($p=0,03$; Fig. 4.12b), y en forma inversa con los valores de pH del suelo ($p=0,007$; Fig. 4.12c). A través de técnicas de regresión múltiple, el modelo más adecuado para explicar la variabilidad de esta tasa incluyó a las variables Csol, COP y pH, que explicó un 53% de dicha variabilidad ($p=0,002$).

4.3.3. Figuras

4.3.3.1. Figuras Experimento 1

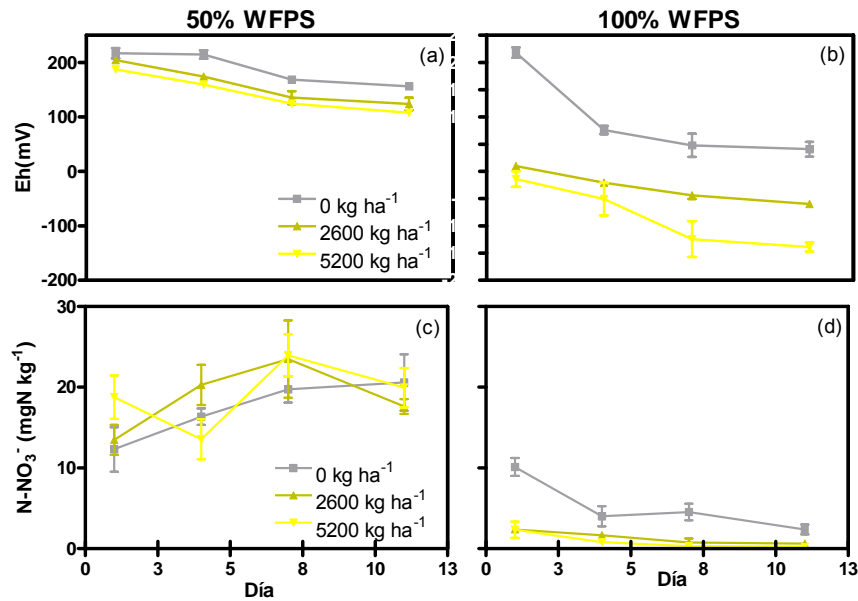


Figura 4.1. Evolución del potencial rédox (a y b) y del contenido de N-NO₃⁻ (c y d) a través del experimento para los tratamientos de aplicación de residuos, en las situaciones de 50% WFPS (a y c) y 100% WFPS (b y d). Los puntos corresponden a la media de tres repeticiones con las barras representando el error estándar de la media.

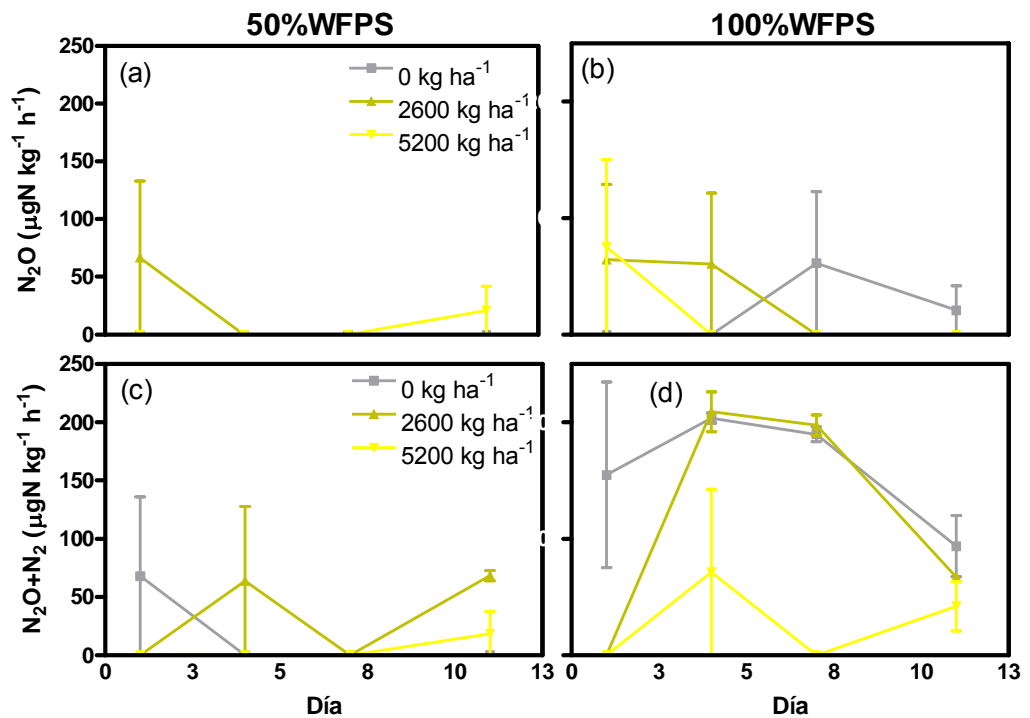


Figura 4.2. Evolución de las emisiones diarias de N₂O (a y b) y de las emisiones diarias de N₂O+N₂ (c y d) a través del experimento para los tratamientos de aplicación de

residuos, en las situaciones de 50% WFPS (a y c) y 100% WFPS (b y d). Los puntos corresponden a la media de tres repeticiones con las barras representando el error estándar de la media.

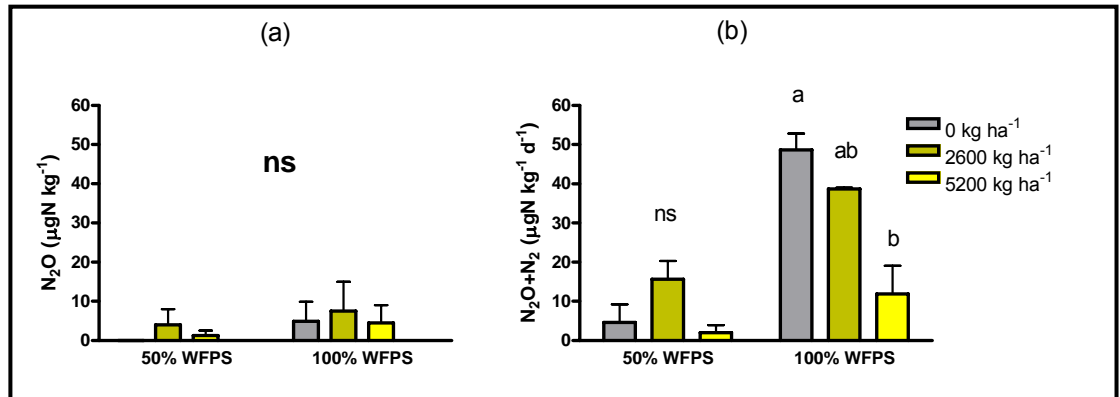


Figura 4.3. Emisiones acumuladas de N_2O (a) y de N_2O+N_2 (b) para los distintos tratamientos de aplicación de residuos, en suelos con contenidos de humedad de 50% WFPS y 100% WFPS. Las barras corresponden a la media de tres repeticiones con las barras pequeñas representando el error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de residuos, con $p < 0,05$.

4.3.3.2. Figuras Experimento 2

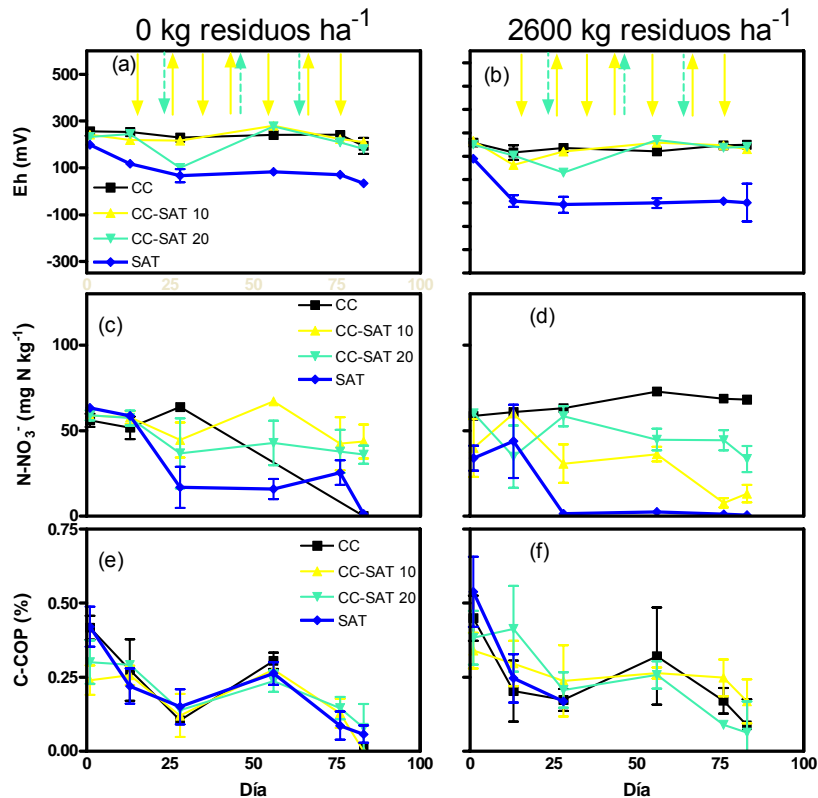


Figura 4.4. Evolución del del potencial rédox Eh (a y b) contenido de $N-NO_3^-$ (c y d) y C orgánico particulado a través del experimento para los tratamientos de humedad establecidos, sin agregado de residuos de soja (a, c y e) y con el agregado de 2600 kg

ha⁻¹ de residuos de soja (b, d y f). Los puntos corresponden a la media de tres repeticiones con las barras representando el error estándar de la media. Las flechas hacia abajo indican el momento de saturación de los cilindros de los tratamientos con condiciones alternadas de saturación-secado, mientras que las flechas hacia arriba indican inicio del secado de los cilindros; las flechas continuas amarillas corresponden al tratamiento de ciclos de 10 días, CC-SAT10, mientras que las flechas punteadas verdes corresponden al tratamiento de ciclos de 20 días, CC-SAT20.

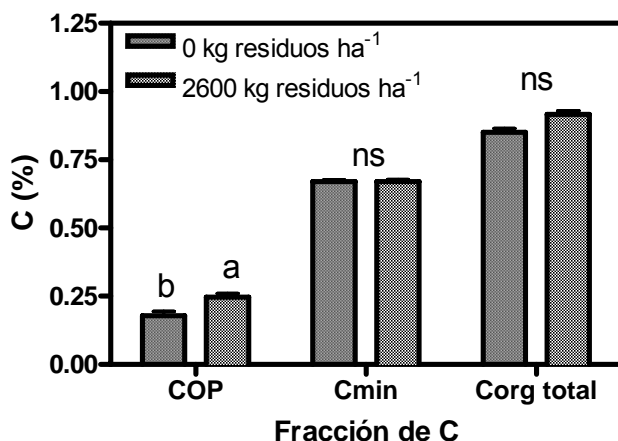


Figura 4.5. Valores promedio de C orgánico particulado COP (a), C asociado al mineral Cmin (b) y C orgánico total (c) en suelos bajo los tratamientos con y sin el agregado de residuos de soja. Las barras corresponden a la media de doce repeticiones con las barras pequeñas representando el error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas, con $p < 0,01$.

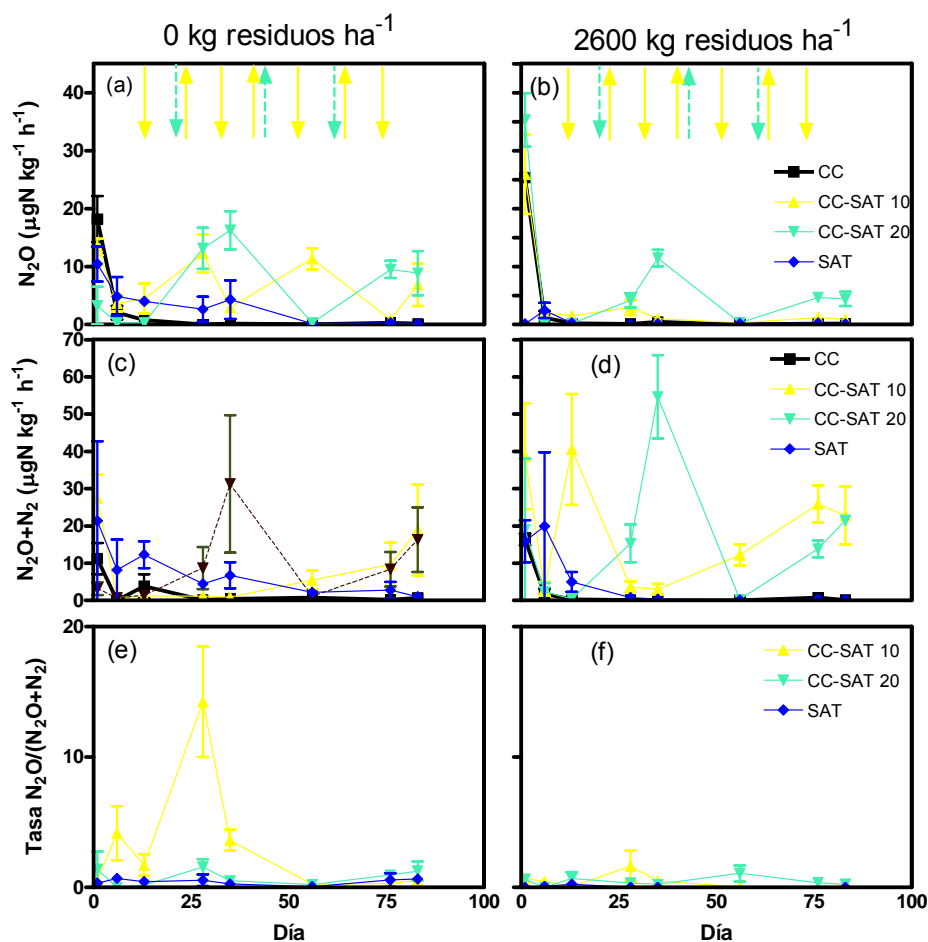


Figura 4.6. Evolución de las emisiones diarias de N₂O (a y b), de N₂O+N₂ (c y d) y de la tasa N₂O/(N₂O+N₂) (e y f) a través del experimento para los tratamientos de humedad establecidos, sin el agregado de residuos de soja (a, c y e) y con el agregado de 2600 kg ha⁻¹ de residuos de soja (b, d y f). Los puntos corresponden a la media de tres repeticiones con las barras representando el error estándar de la media. Las flechas hacia abajo indican el momento de saturación de los cilindros de los tratamientos con condiciones alternadas de saturación-secado, mientras que las flechas hacia arriba indican inicio del secado de los cilindros; las flechas continuas amarillas corresponden al tratamiento de ciclos de 10 días, CC-SAT10, mientras que las flechas punteadas verdes corresponden al tratamiento de ciclos de 20 días, CC-SAT20.

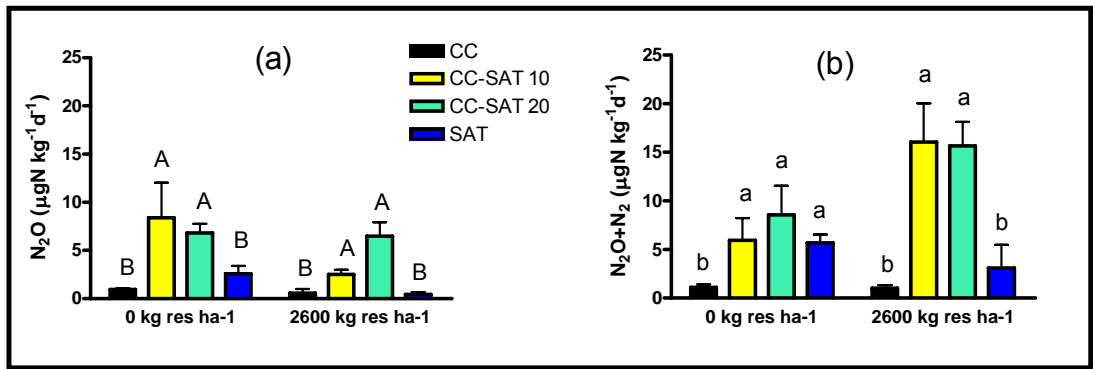


Figura 4.7. Emisiones acumuladas de N_2O (a) y de N_2O+N_2 (b) para los distintos tratamientos de humedad, en suelos sin el agregado de residuos de soja y con el agregado de 2600 kg ha⁻¹ de residuos de soja. Las barras corresponden a la media de tres repeticiones con las barras pequeñas representando el error estándar de la media. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de humedad, con $p < 0,0001$; letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de humedad, con $p < 0,01$.

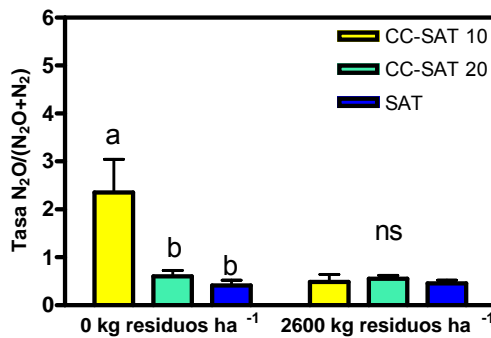


Figura 4.8. Tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ promedio para los tratamientos de humedad, en suelos sin el agregado de residuos de soja y con el agregado de 2600 kg ha⁻¹ de residuos de soja. Las barras corresponden a la media de tres repeticiones con las barras pequeñas representando el error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de humedad, con $p < 0,05$.

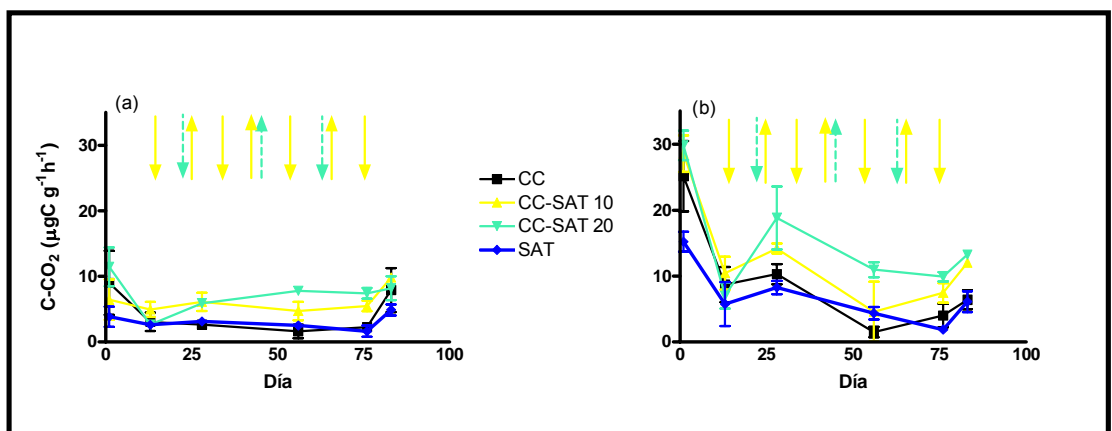


Figura 4.9. Evolución de las emisiones diarias de $C-CO_2$ a través del experimento para los tratamientos de humedad establecidos, sin el agregado de residuos de soja (a) y con

el agregado de 2600 kg ha⁻¹ de residuos de soja (b). Los puntos corresponden a la media de tres repeticiones con las barras representando el error estándar de la media. Las flechas hacia abajo indican el momento de saturación de los cilindros de los tratamientos con condiciones alternadas de saturación-secado, mientras que las flechas hacia arriba indican inicio del secado de los cilindros; las flechas continuas amarillas corresponden al tratamiento de ciclos de 10 días, CC-SAT10, mientras que las flechas punteadas verdes corresponden al tratamiento de ciclos de 20 días, CC-SAT20.

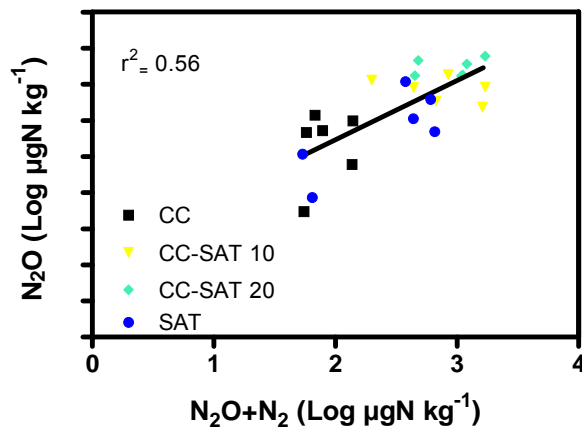


Figura 4.10. Relación entre las emisiones de N₂O y totales por denitrificación de N₂O+N₂ acumuladas, ambas log-transformadas, para los distintos tratamientos de humedad.

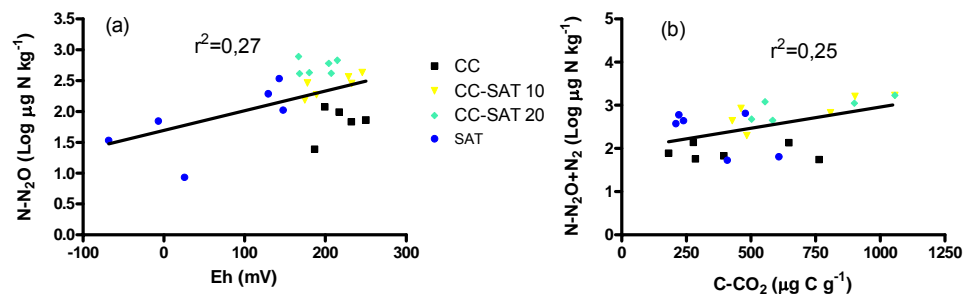


Figura 4.11. Relación entre las emisiones acumuladas de N₂O log-transformadas, y los valores medios de Eh (a) y entre las emisiones acumuladas de N₂O+N₂ log-transformadas y las emisiones acumuladas de CO₂ (b) para los distintos tratamientos de humedad.

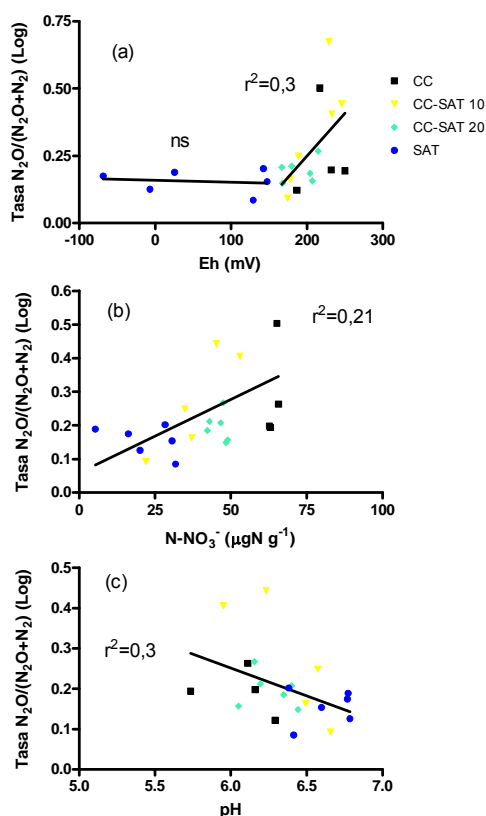


Figura 4.12. Relación entre los valores medios de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ log-transformados, y los valores medios de Eh (a) contenido de $N-NO_3^-$ (b) y los niveles de pH del suelo (c) para los distintos tratamientos de humedad.

4.4. Discusión

4.4.1. Experimento 1

La abundancia relativa de dadores y aceptores de electrones del suelo, medida a través de los valores de Eh, fue modificada por el agregado de residuos, lo que confirma que el material orgánico es la principal fuente de electrones en el suelo, debido a sus moléculas altamente reducidas. Este efecto fue particularmente marcado en el caso de suelos saturados donde a la alta demanda de O_2 causada por la presencia de residuos orgánicos, se suma la baja tasa de suministro del mismo dada su limitada difusión lo cual conduce a una menor disponibilidad de O_2 ; está comprobado que existe una relación intensa entre el valor de Eh y la disponibilidad de O_2 (Magonigal *et al.*, 1993). Aunque el reporte de tasas insignificantes de denitrificación en suelos abonados con leguminosas bajo condiciones de humedad menores a 60% WFPS (Aulakh *et al.*, 1991b; Shelton *et al.*, 1997) sugiere que el contenido de humedad del suelo es el principal control del balance consumo-renovación del O_2 edáfico, queda claro que la descomposición de residuos soporta la denitrificación aportando electrones o estimulando el consumo de O_2 por heterótrofos en los suelos inundados.

Cuando el suelo se encontró saturado, el contenido de $N-NO_3^-$ disminuyó en el tiempo, probablemente por procesos de denitrificación y de inmovilización. La disminución de los niveles medios de este anión con la incorporación de residuos conduce a afirmar que la inmovilización biológica del N para el aprovechamiento del C agregado pareció ser el principal mecanismo de secuestro de los $N-NO_3^-$ del suelo,

especialmente cuando se aplicaron 5200 kg residuos ha⁻¹, dadas las bajas emisiones de N₂O+N₂ por denitrificación en este último caso (Fig. 4.2c y d). El agregado de 2600 kg ha⁻¹, si bien no aumentó los niveles de N-NO₃⁻ con respecto a la aplicación de 5200 kg, tampoco disminuyó significativamente las emisiones de N₂O+N₂ por denitrificación, lo que indica que sus bajos contenidos de N-NO₃⁻ pueden deberse a procesos simultáneos de inmovilización-denitrificación.

Las emisiones de N₂O presentaron una gran variabilidad, con coeficientes de variación de hasta 424%, producto de un gran número de emisiones de baja magnitud con algunos pocos picos de emisiones resultantes probablemente de la actividad denitrificadora en los denominados "hot spots", sitios de alta actividad biológica (Parkin, 1987). Esta alta variabilidad general no permitió encontrar efectos significativos de los tratamientos impuestos sobre las emisiones diarias o acumuladas de N₂O, así como tampoco permitió detectar una asociación estrecha entre estas y las emisiones de N₂O+N₂ por denitrificación o con las emisiones de CO₂. Sin embargo, las emisiones de N₂O tras el agregado de cantidades medias de residuos, si bien tuvieron una distribución sumamente asimétrica, presentaron disminuciones en los coeficientes de variación de hasta un 79%, debido a la detección de un mayor número de emisiones de elevada magnitud. De hecho, las emisiones acumuladas fueron máximas, aunque no significativamente diferentes, tras el agregado de 2600 kg ha⁻¹ de residuos de soja. El aumento de los niveles de humedad de 50 a 100% WFPS también condujo a disminuciones en la variabilidad de las emisiones diarias y acumuladas de N₂O, por lo que puede concluirse que cualquier factor que aumente la magnitud de las emisiones de N₂O suele conducir a menores niveles de variabilidad de dichas emisiones. No obstante también puede pensarse que la situación de 100% WFPS presentó un ambiente más homogéneo en cuanto a las condiciones de anaerobiosis (Tiedje et al., 1984) conduciendo a una menor variabilidad en las emisiones gaseosas.

Las emisiones diarias y acumuladas de N₂O+N₂ aumentaron significativamente ante aumentos en la humedad del suelo, con excepción de suelos abonados con 5200 kg ha⁻¹ de residuos de soja; esta ausencia de diferencias estadísticas probablemente se deba a la inmovilización del N nativo. Bajo condiciones de humedad de 50% WFPS la aireación pasó a ser el principal factor controlador de las condiciones redox, limitando las tasas de denitrificación; de hecho los valores de Eh con contenidos de humedad de 50% WFPS fueron notablemente superiores a aquellos con 100% WFPS, independientemente de la aplicación de residuos (Fig. 4.1)

Bajo condiciones de saturación, el agregado de 5200 kg ha⁻¹ de residuos de soja al suelo disminuyó las emisiones diarias y acumuladas de N₂O+N₂, probablemente por una alta inmovilización del N mineral del suelo, como puede concluirse de los bajos niveles de N-NO₃⁻ (Fig. 4.1d) tras el agregado de tal cantidad de residuos. Condiciones de bajas concentraciones de N-NO₃⁻ y altos potenciales de reducción han sido relacionados a limitaciones de las tasas de denitrificación por escasa difusión de los N-NO₃⁻ (Tietema *et al.*, 2007). Se considera en general que el valor crítico de la relación C:N para la mineralización neta de un residuo es de alrededor de 20-25:1 (Flessa y Beese, 1995) mientras que el residuo de soja utilizado en el presente trabajo presentaba una relación C:N media de 31, lo que confirma la posibilidad de fenómenos de inmovilización microbiana del N mineral edáfico. La incorporación de una cantidad media o "comercial" de residuos permitió importantes pérdidas de N por denitrificación, pero no mayores a suelos no abonados. Sin embargo, la aplicación de una cantidad media de residuos podría haber limitado estas pérdidas en caso de niveles iniciales de N-NO₃⁻ menores.

4.4.2. Experimento 2

De la misma manera que en el experimento 1, la disponibilidad general de electrones estuvo dominada por las condiciones de humedad, debido a la reducida difusión del O_2 en agua, 10.000 veces menor que en el aire (Singh y Ghildyal, 1980). Los ciclos de saturación-secado desembocaron en niveles medios de Eh mayores a aquellos bajo saturación continua, lo que sugiere que existió cierta renovación del O_2 de la solución de suelo. Los ciclos de saturación-secado del suelo le imprimieron al estado de óxido-reducción del suelo una dinámica fluctuante, aumentando el rango de valores cubierto al aumentar la duración de cada período de saturación o secado del suelo, permitiendo un mayor consumo o renovación del O_2 , respectivamente. Similarmente, Cai *et al.* (2001) registraron importantes aumentos y disminuciones del Eh del suelo ante eventos de drenaje y re-anegamiento sucesivos.

Independientemente del tratamiento de humedad, el agregado de residuos disminuyó significativamente los valores de Eh hacia niveles menores, típicos de condiciones reductoras, confirmando la importancia de los residuos vegetales como principales dadores de electrones del suelo. Flessa y Beese (1995) hallaron que en suelos bien aireados, el Eh en la vecindad de residuos de remolacha bajó a valores de +95 mV, indicativos de condiciones reductoras. Dado que el Eh crítico de generación de N_2O oscila entre 200 mV (Letey *et al.*, 1981) y 350 mV (Smith *et al.*, 1983), los micrositios anaeróbicos cercanos a los residuos pueden constituir lugares que favorecen la formación y emisión de dicho gas.

El contenido de humedad también reguló fuertemente la evolución en el tiempo los niveles medios de $N-NO_3^-$. Es probable que las altas concentraciones de N mineral al inicio de la incubación sean producto del preacondicionamiento de las muestras más que por una rápida mineralización de los residuos agregados, lo que puede deducirse de la uniformidad de valores de $N-NO_3^-$ iniciales entre los diferentes tratamientos de residuos o humedad. Bajo condiciones de saturación, una limitada nitrificación en forma conjunta con una profunda actividad denitrificadora parecen ser los responsables de llevar a los niveles medios de $N-NO_3^-$ más bajos. La alternancia de ciclos de saturación-secado llevó a una tendencia declinante a lo largo del experimento y a niveles intermedios de $N-NO_3^-$, coincidiendo con Cai *et al.* (2001). La aplicación de 2600 kg ha^{-1} de residuos de soja disminuyó los niveles medios de $N-NO_3^-$, lo que puede ser atribuido a mayores tasas de denitrificación y/o una mayor inmovilización del N contenido en este anión en la biomasa microbiana.

Los valores del C soluble en agua no fueron tampoco modificados por el agregado de residuos. Li *et al.* (1992a) consideraron al C soluble más un indicador de la tasa diaria de descomposición de los residuos que un pool de C específico. Los valores de C soluble oscilaron entre 40,67 y 58,3 $\mu\text{g C g}^{-1}$, que representaron entre un 0,46 y un 0,71% del C orgánico total, y no parecieron limitar las emisiones de N_2O o de N_2O+N_2 . A pesar de que el rol crítico del C orgánico soluble como fuente de energía y nutrientes para la comunidad denitrificadora está ampliamente reconocido, el umbral por sobre el cual la denitrificación no está limitada está vagamente definido (Elmi *et al.*, 2003). Se han reportado valores de C soluble inferiores a 60 mg C kg^{-1} como limitantes para la denitrificación (van Kessel *et al.*, 1993; Burton y Beauchamp, 1985), mientras que Palma *et al.* (1997) encontraron en suelos de la Pampa Ondulada que valores de C soluble entre 15-30 mg C kg^{-1} no fueron limitantes para este proceso. También en suelos argiudoles de la Región Pampeana, Picone y Videla (1998) encontraron que contenidos de C orgánico soluble entre 21,18 y 55,11 $\mu\text{g C kg}^{-1}$ no fueron limitantes para el proceso de denitrificación, aún en suelos fertilizados con N. Como puede observarse el rango es amplio y está probablemente afectado por las condiciones de aireación y contenidos de $N-NO_3^-$ de los suelos, además de posibles desviaciones debido a las diferencias entre las técnicas de extracción utilizadas.

Las emisiones diarias de N_2O bajo contenidos de humedad constantes sufrieron una fuerte caída luego del pico inicial típico del agregado de agua a suelos con contenidos de humedad reducidos (Yan *et al.*, 2000; Webb *et al.*, 2004). Bajo condiciones de capacidad de campo continuas, la aireación limitó las tasas de denitrificación, principal proceso responsable de las emisiones de N_2O desde los suelos, como puede deducirse de los altos valores de Eh y $N-NO_3^-$ (Fig. 4.4a-d). En condiciones de saturación continua, la escasa formación de $N-NO_3^-$ probablemente limitó la formación y emisiones de este gas, dado que los organismos nitrificadores necesitan una activa provisión de O_2 para oxidar el $N-NH_3$ (Cai *et al.*, 2001). Los ciclos de saturación-secado del suelo condujeron generalmente a las mayores emisiones diarias y acumuladas de N_2O , que fueron generalmente similares entre los ciclos de diferente duración de los períodos de saturación-secado. Estas mayores emisiones bajo alternancia de períodos de saturación y secado del suelo pueden ser atribuidas a la formación de $N-NO_3^-$ por nitrificación durante los períodos de secado, donde pueden acumularse (Li *et al.*, 1992a), que luego fueron reducidos a N_2O durante los primeros días a partir de la resaturación; de hecho puede observarse en las figuras 4.6 a y b el efecto promotor de la resaturación en las emisiones de N_2O . Si bien es cierto que no se observan acumulaciones de NO_3^- en las Figs. 4.4 c y d, el hecho de que los contenidos medios de NO_3^- hayan sido mayores bajo condiciones alternadas que bajo saturación constante, cuando el consumo de NO_3^- por denitrificación fue mayor en el primer caso, nos permite afirmar que existieron activos procesos de nitrificación bajo condiciones alternadas de saturación-secado, renovando los contenidos de NO_3^- . También el rehumedecimiento de suelos secos puede estimular las emisiones de N_2O debido a un incremento en el C disponible que se observa en un flujo de CO_2 que esta relacionado al C de la biomasa microbiana o C potencialmente mineralizable (Aulakh *et al.*, 2000). Wrage *et al.* (2001) indican que la nitrificación acoplada a la denitrificación ocurre en suelos donde se den las condiciones favorables para ambos procesos en hábitats vecinos, siendo las interfases entre estos ambientes los sitios de mayores tasas de denitrificación (Reddy y Patrick, 1984; Tiedje *et al.*, 1984). En el presente ensayo el frente de la interfase espacial aerobiosis-anaerobiosis se ve afectado por los procesos de secado, que retrae en profundidad la capa anaeróbica y aumenta el espesor de la capa aeróbica, lo que puede influir en el balance entre la formación y el escape difusivo del N_2O a la atmósfera. Las altas pérdidas de N_2O+N_2 ante ciclos de saturación-secado sugieren que las emisiones de N_2O se deben en gran parte a procesos de denitrificación más intensos y en menor medida a mayores tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$.

La presencia de residuos de soja limitó las diferencias entre los tratamientos de humedad en las emisiones de N_2O pero exacerbó las diferencias en denitrificación total. Puede concluirse entonces que la presencia de residuos contribuyó a la reducción del N_2O a N_2 en los períodos de anaerobiosis; es conocido que además de proveer electrones para las bacterias que reducen los óxidos de N, la disponibilidad C orgánico estimula la formación de la enzima óxido nitroso reductasa (Letey *et al.*, 1981), acortando el período inicial de acumulación de N_2O .

El agregado de C ha mostrado aumentar las emisiones de N_2O en repetidas ocasiones (Flessa y Beese, 1995; Azam *et al.*, 2002; Khalil *et al.*, 2002). En una completa revisión, Dalal *et al.* (2003) concluyen que a pesar de que la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ disminuye con aumentos en los niveles de C disponible, la cantidad total de N_2O producida por denitrificación es aumentada por la adición de materiales orgánicos. Sin embargo, la presencia de residuos de soja en el presente trabajo disminuyó significativamente las emisiones acumuladas de N_2O con respecto a suelos sin residuos. El agregado de material orgánico puede limitar las emisiones de N_2O como resultado de un mayor potencial de reducción de dicho gas, y por lo tanto derivar en una menor tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$; Clayton *et al.* (1997) sugirieron que el aumento en

las tasas de respiración luego del agregado de residuos, con incrementos concomitantes en el tamaño de las zonas anaeróbicas presentes, es un factor que contribuye a la reducción del N_2O a N_2 . La incorporación de residuos también puede limitar las emisiones de N_2O a través de la inmovilización inicial del $N-NO_3^-$ del suelo, limitando la magnitud de las emisiones de N_2O+N_2 . Los menores valores de Eh y las mayores emisiones de N_2O+N_2 de suelos en presencia de residuos de soja apoyan la idea de que las emisiones de N_2O fueron limitadas principalmente por un mayor potencial de reducción del N_2O tras la incorporación de los residuos, aunque no puede ser descartada por completo la ocurrencia de procesos de inmovilización del N mineral.

Las emisiones de N_2O+N_2 presentaron una dinámica similar y fueron afectadas por los tratamientos impuestos en forma semejante a las emisiones de N_2O ; estas similitudes parecen lógicas si se considera la fuerte asociación positiva entre ambas variables (Fig. 4.10). La denitrificación es en general el proceso formador de N_2O más importante en los suelos (Carran *et al.*, 1995; Clemens y Huschka, 2001), y la presencia de residuos estimula el consumo de O_2 y por lo tanto la importancia de los procesos reductivos en el suelo (Stevens y Laughlin, 2001). Sin embargo, tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$ mayores a la unidad en suelos bajo ciclos de saturación-secado de 10 días sugieren que la nitrificación puede aportar significativamente a las emisiones de N_2O en determinadas condiciones.

Las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 en los 83 días de incubación oscilaron entre 7,55 y 778,2 $\mu gN\ kg^{-1}$ de suelo. Aulakh *et al.* (1991b) hallaron emisiones por denitrificación acumuladas en 30 días desde suelos de diferentes texturas abonados con residuos de la leguminosa *Vicia villosa* que oscilaron entre 1,6 y 3,3 $mg\ N\ kg^{-1}$ bajo contenidos de humedad de 60% WFPS, y entre 51,1 y 99,5 $mg\ N\ kg^{-1}$ bajo contenidos de humedad de 90% WFPS. La gran diferencia en estos valores puede deberse a que el residuo de *Vicia villosa* presentaba una relación C:N de 8:1 y, en adición, los suelos abonados con dicha leguminosa habían sido fertilizados con KNO_3 que aumentaron los niveles de $N-NO_3^-$ iniciales hasta valores de 101-164 $mgN\ kg^{-1}$.

Las emisiones diarias y acumuladas de N_2O+N_2 fueron en general mayores bajo ciclos de saturación-secado que bajo contenidos de humedad constantes, lo que puede explicarse, de la misma manera que para las emisiones de N_2O , por una activa nitrificación en períodos de secado y la denitrificación de los NO_3^- formados en los períodos de saturación. Se ha reportado que una sola incubación aeróbica de 5 días aumentó considerablemente la tasa de pérdida del $N-NO_3^-$ durante la subsecuente incubación anaeróbica de suelos abonados con residuos de leguminosas, pastos y maíz (McKenney *et al.*, 1993). Olde Venterink *et al.* (2002) hallaron efectos significativos del secado y humedecido del suelo en las tasas de denitrificación, y de su interacción con el tiempo, aumentando las tasas de denitrificación con el humedecimiento y disminuyéndolas con el secado. Sin embargo, en suelos donde no se incorporaron residuos de soja, las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 bajo saturación continua no se diferenciaron significativamente de aquellas desde suelos sometidos a ciclos de saturación-secado; este hecho sugiere que la alternancia de períodos contrastantes de humedad genera efectos más pronunciados sobre las emisiones de N_2O y N_2 por denitrificación cuando el suelo presenta residuos susceptibles de atravesar la secuencia descomposición-mineralización-denitrificación, residuos que presentan tiempos de ciclaje (*turn-over*) decididamente menores que la materia orgánica humificada del suelo (Parton *et al.*, 1987). Este efecto es confirmado por el hecho que el agregado de residuos de soja aumentó significativamente las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 sólo bajo ciclos de contenidos de humedad edáficos alternados.

Ningún índice de disponibilidad de C orgánico edáfico pareció explicar satisfactoriamente la variabilidad de las emisiones de N_2O o de N_2O+N_2 . De la misma

manera, Beauchamp y Seech (1990) no encontraron una asociación clara entre la denitrificación y el C soluble en agua en agregados de suelos. En un suelo argiudol de la Región Pampeana, Ciampitti *et al.* (2005) observaron que el contenido de C orgánico soluble disminuía en momentos que las emisiones de N₂O aumentaban, aunque no detectaron correlaciones significativas entre ambas variables. Grundmann *et al.* (1988) hallaron pobres relaciones entre las tasas de denitrificación y los niveles de C soluble en agua, que los autores adscribieron a que por su extracción, esta fracción del C no refleja necesariamente el gran pool de C del material particulado, COP, que se supone es la principal fuente de la denitrificación en los suelos (Parkin, 1987; Parry *et al.*, 2000). Sin embargo, ni las emisiones de N₂O ni las de N₂O+N₂ se relacionaron estadísticamente tampoco con los contenidos de COP del suelo.

La tasa N₂O/(N₂O+N₂) de las emisiones fue afectada por los tratamientos de humedad sólo en ausencia de residuos de soja. En esa situación, ciclos de saturación-secado de 10 días derivaron en valores de esta tasa mayores que en ciclos de períodos de 20 días, probablemente debido a un mayor número de interfases temporales y espaciales de saturación-secado. Tanto bajo ciclos de saturación-secado de 10 y de 20 días, los períodos de saturación superaban las 24-72 horas, permitiendo la formación de la enzima óxido nitroso-reductasa (Firestone y Tiedje, 1979), pero en el primer caso el número de transiciones entre situaciones aeróbicas-anaeróbicas fue del doble; la transición entre condiciones óxicas y anóxicas incrementa la formación del N₂O (Otte *et al.*, 1996) debido a diferencias en la regulación de las enzimas denitrificadoras (Zumft, 1997). Tampoco puede descartarse el efecto de los mayores niveles medios de N-NO₃⁻ con ciclos de saturación-secado de 10 días en ausencia de residuos; Dendooven *et al.* (1996) señalaron que largas incubaciones anaeróbicas redujeron los niveles medios de N-NO₃⁻, estimulando la formación y actividad de la enzima óxido nitroso-reductasa, y por lo tanto aumentando la reducción de N₂O a N₂. La presencia de residuos de soja puede haber limitado las diferencias entre diferentes duraciones de los ciclos de saturación-secado debido a que aumentos en los niveles de C pueden estimular la formación de enzimas denitrificadoras (Letey *et al.*, 1981), adelantando la formación de la enzima óxido-nitroso reductasa y limitando la acumulación inicial de N₂O que ocurre normalmente luego de iniciado un fenómeno de anaerobiosis.

Bajo condiciones de saturación continua, los valores de Eh alcanzados por los suelos fueron bajos, de hasta -48 mV favoreciendo la reducción del N₂O a N₂, independientemente del tratamiento de residuos, resultando en bajas tasas N₂O/(N₂O+N₂). La ausencia de efectos significativos de las variaciones en los valores de Eh sobre la tasa N₂O/(N₂O+N₂) en suelos saturados de humedad, se debió probablemente a que estos valores se encontraban por debajo de un valor crítico por sobre el cual la reducción de N₂O a N₂ es afectada por la presencia de O₂. Este umbral crítico fue estimado en nuestro experimento en 148 mV. Weier *et al.* (1993) hallaron también las menores tasas N₂O/(N₂O+N₂) desde suelos con contenidos de humedad cercanos a saturación, 90% WFPS, y tras el agregado de glucosa.

La presencia de residuos redujo las diferencias entre los valores de la tasa N₂O/(N₂O+N₂) entre los diferentes tratamientos de humedad, estimulando probablemente, a través de una mayor cantidad de compuestos carbonados reducidos, la reducción del N₂O a N₂, como puede suponerse a partir de los menores valores de Eh alcanzados con respecto a los suelos no abonados (Fig. 4.4 a y b). De hecho, tanto las emisiones absolutas de N₂O, como la tasa N₂O/(N₂O+N₂) fueron influenciadas positivamente por los valores de Eh; esto quiere decir que cuando el suelo viró hacia condiciones de mayor potencial de reducción, la participación del N₂O en los componentes finales disminuyó notablemente, como fue observado también en el capítulo 2 de esta tesis en suelos de textura más fina que los utilizados en los experimentos de este capítulo de la tesis. Dambreville *et al.* (2006) también hallaron

que abonos orgánicos estimularon en mayor medida la reducción del N_2O que la actividad denitrificadora general. En la bibliografía se encuentra en repetidas ocasiones el hecho de que la emisión de N_2O se puede favorecer ante situaciones de limitación de donadores de electrones (Stevens y Laughlin, 1998; Jungkunst, 2004; Khalil *et al.*, 2002). Por el contrario, columnas de suelo con incorporación de residuos mostraron en otro estudio mayores tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$ que suelos no abonados (Flessa y Beese, 1995), hecho que fue explicado por los mayores niveles de $N-NO_3^-$ en el primer caso, dado el fuerte efecto inhibitorio de los NO_3^- en la reducción del N_2O a N_2 (Blackmer y Bremner, 1978).

La tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ también fue afectada en forma significativa y positiva con los contenidos de $N-NO_3^-$ y negativamente con el pH del suelo. Los suelos con mayores niveles de aireación (CC, CC-SAT10 y CC-SAT 20) presentaron en el presente experimento, además de mayores niveles medios de Eh, también mayores niveles de $N-NO_3^-$ y menores de pH, condiciones que también contribuyen a la inhibición de la enzima óxido-nitroso reductasa (Blackmer y Bremner, 1978). Es por ello que la relevancia del efecto individual de estas variables sobre la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ no pudo ser claramente definida, aunque generalmente se considera a la aireación como principal factor regulador de la composición de las emisiones gaseosas por denitrificación (Dalal *et al.*, 2003).

Tanto las emisiones de gases nitrogenados como la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ suelen presentar muy alta variabilidad (Stevens y Laughlin, 1998; Dambreville *et al.*, 2006). La alternancia de ciclos de saturación-secado condujo a disminuciones en la variabilidad de las emisiones de N_2O , lo que contribuye a confirmar que aumentos en la magnitud de estas emisiones son más importantes en reducir la variabilidad en dichas emisiones que la presencia consistente y continua de condiciones anaeróbicas del suelo, como fue reportado en el experimento 1 de este capítulo.

La fuerte relación positiva hallada entre las emisiones acumuladas de CO_2 y de N_2O+N_2 indicarían que el agregado de rastrojos estimuló a las bacterias denitrificadoras y a la biomasa heterotrófica general en el mismo sentido. Mahmood *et al.* (1998) encontró que la producción de CO_2 se asoció negativamente con las emisiones totales por denitrificación bajo un cultivo de trigo, probablemente debido a la relación negativa observada entre tasa de producción de CO_2 y el nivel de WFPS, mientras que Ellis *et al.* (1996) y Qian *et al.* (1997) no hallaron relaciones significativas entre las emisiones por denitrificación y la producción de CO_2 en años con precipitaciones normales como en años secos. Mathieu *et al.* (2006) y Chu *et al.* (2007) hallaron sólo leves correlaciones ($r^2=0,22-0,38$) entre las emisiones de N_2O y las de CO_2 , mientras que Millar y Baggs (2005) hallaron fuertes asociaciones entre estas variables ($r^2=0,42-0,96$) en suelos abonados con residuos. En general, la producción de CO_2 y las emisiones por denitrificación deberían estar correlacionadas cuando la respiración reduce seriamente la provisión de O_2 ; esto ocurriría con tasas de respiración muy altas, como por ejemplo tras el agregado de material orgánico, o cuando los suelos están húmedos dificultando seriamente la difusión del O_2 (Groffman y Tiedje, 1991; Tietema *et al.*, 2007). El importante papel del material orgánico sobre el consumo de O_2 y creación de condiciones anaeróbicas fue demostrado por Dobbie y Smith (2001) quienes encontraron que la relación entre las emisiones de N_2O de un suelo de pastura y de un suelo cultivado, este último con menores contenidos de C orgánico, disminuía ante aumentos en la temperatura, cuyo principal efecto es aumentar el consumo de O_2 por las bacterias del suelo. Sin embargo, a pesar de presentar las mayores emisiones diarias y acumuladas de CO_2 , suelos bajo ciclos de saturación-secado no presentaron en este trabajo valores de Eh menores a aquellos bajo capacidad de campo continua, lo que permite inferir que la estimulación de la respiración del suelo no siempre conduce a mayores condiciones reductoras dado que

pequeñas cantidades de O_2 generan condiciones oxidantes (Pearsall y Mortimer, 1939).

4.5. Conclusiones

La incorporación de residuos aumentó significativamente las condiciones reductoras del suelo, y este efecto fue especialmente marcado en suelos saturados, donde la renovación del O_2 de la solución del suelo es lenta.

El agregado al suelo de una alta cantidad de residuos, de aproximadamente el doble de lo que aportan las producciones comerciales, disminuyó notablemente las emisiones de N_2O+N_2 por denitrificación en el primer experimento, a través de un fuerte secuestro del N mineral en formas orgánicas, no denitrificables, rechazándose la primer hipótesis propuesta. Este efecto ocurrió aún siendo el residuo de soja de baja relación C:N, relación igual a 31 en nuestro caso, y en condiciones de alta humedad. Este resultado permite descubrir la importancia de los residuos en la “protección” por inmovilización del N mineral del suelo, que podría ser importante de esperarse un período de “barbecho limpio” con condiciones de elevada humedad. Este resultado no puede ni debe extrapolarse a situaciones donde la presencia y descomposición de residuos convive con plantas en activo crecimiento, típicamente la soja de segunda creciendo sobre los rastrojos de trigo anterior, donde la “protección” del N mineral se convertiría en “competencia” por el mismo entre las plantas y los organismos descomponedores. La incorporación de una cantidad media o “comercial” de residuos permitió importantes pérdidas de N por denitrificación, pero no mayores a suelos no abonados. Sin embargo, el efecto de la aplicación de una cantidad determinada de residuos podría estar condicionado por el nivel inicial de $N-NO_3^-$.

Las emisiones gaseosas de N presentaron alta variabilidad. Del primer experimento pudo concluirse que cualquier factor que aumente la magnitud de las emisiones de N_2O suele conducir a menores niveles de variabilidad en dichas emisiones. En el segundo experimento los coeficientes de variación fueron mínimos bajo condiciones alternadas de saturación-secado, donde las emisiones de N_2O fueron máximas, lo que lleva a la conclusión que es más importante la magnitud general de las emisiones que condiciones ambientales fluctuantes en la determinación de la variabilidad de las emisiones de N_2O . Expresado en otros términos, aumentos en la magnitud de estas emisiones generalmente por ciclos de saturación-secado, fueron más importantes en reducir la variabilidad en dichas emisiones que la presencia consistente y continua de condiciones anaeróbicas del suelo.

La presencia de residuos de soja limitó las diferencias entre los tratamientos de humedad en las emisiones de N_2O pero exacerbó las diferencias en denitrificación total. Puede concluirse entonces que la presencia de residuos contribuyó a la reducción del N_2O a N_2 en los períodos de anaerobiosis; es conocido que además de proveer electrones para las bacterias que reducen los óxidos de N, la disponibilidad de C orgánico estimula la formación de la enzima óxido nitroso reductasa, acortando el período inicial de acumulación de N_2O .

La presencia de residuos de soja en el presente trabajo disminuyó significativamente las emisiones acumuladas de N_2O con respecto a suelos sin residuos, rechazándose la primera hipótesis propuesta. Este resultado confirma que el efecto del agregado de residuos fue mediado a través de un mayor potencial de reducción del N_2O formado a N_2 , confirmándose la segunda hipótesis propuesta. Esta conclusión surge del hecho que en ningún caso las emisiones de N_2O+N_2 fueron reducidas con el agregado de residuos, como podría ocurrir en caso de que la inmovilización del N mineral fuera el efecto dominante. Puede concluirse que la aplicación de residuos, si bien puede estimular la actividad heterotrófica general, podría contribuir al potencial de reducción del N_2O formado en los suelos y limitar sus

emisiones, siendo la reducción a N_2 la única vía de eliminación en los suelos del N_2O generado.

Ciclos de saturación-secado aumentaron las emisiones de N_2O , efecto que parece deberse a emisiones de N_2O+N_2 mayores bajo estos ciclos con respecto a situaciones con contenidos de humedad constantes. Esta alternancia de períodos contrastantes de humedad generó efectos más pronunciados sobre las emisiones de N_2O y N_2 por denitrificación cuando el suelo presentó residuos susceptibles de atravesar la secuencia descomposición-mineralización-denitrificación, residuos que presentan tiempos de *turn-over* decididamente menores que la materia orgánica humificada del suelo, confirmándose la tercer hipótesis propuesta.

La medición conjunta de N_2O+N_2 y de N_2O , y la estimación de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$, en ciclos de saturación-secado es difícil de encontrar en la literatura científica. La dependencia de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ de la historia de humedad del suelo podría tener grandes consecuencias para la relación entre la denitrificación total y las emisiones de N_2O . El aumento de la duración de los períodos de saturación-secado no modificó las emisiones de N_2O N_2O+N_2 de N_2O+N_2 , pero disminuyó la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ en ausencia de residuos debido a una menor ocurrencia de interfases aerobiosis-anaerobiosis, aunque este efecto fue morigerado por la presencia de residuos, debido a un mayor potencial de reducción del N_2O formado. Los mayores niveles medios de $N-NO_3^-$ en los ciclos de saturación-secado más cortos, de 10 días, con respecto a ciclos de 20 días pueden haber contribuido al efecto mencionado sobre la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$.

Las emisiones de CO_2 se relacionaron fuertemente con las emisiones de N_2O+N_2 , más por una estimulación conjunta de la comunidad de bacterias heterotróficas del suelo que por una relación causa-efecto entre el consumo del O_2 y la ocurrencia de procesos de denitrificación.

5. Capítulo 5. Tipo de suelo, aplicación de pesticidas y emisiones de gases nitrogenados

5.1. Antecedentes, objetivos e hipótesis específicos del capítulo 5: Emisiones de gases nitrogenados: tipos de suelo y aplicación de pesticidas

5.1.1. Antecedentes específicos

5.1.1.1. Tipo de suelo y emisiones de gases de N

El tipo de suelo es un factor cuya importancia en las emisiones gaseosas de N_2O y de N_2 ha sido resaltada (Bouwman, 1996; Stehfest y Bouwman, 2006). Los suelos Argiudoles y Hapludoles, los Grandes Grupos de suelos más comunes de la altamente productiva Región Pampeana Argentina, presentan características texturales bien diferentes, teniendo los primeros una mayor proporción de la fracción arcilla (tamaño menor a $2 \mu m$) en su composición granulométrica. Los suelos de texturas finas poseen mayor porcentaje de poros más pequeños, generando condiciones anaeróbicas más fácilmente que aquellos más gruesos (Groffman y Tiedje, 1991). McTaggart *et al.* (2002) encontraron que la textura del suelo influyó significativamente las pérdidas totales de N a valores diferentes de WFPS, aumentando la denitrificación en suelos más finos. Aulakh *et al.* (1991b) hallaron que a similares contenidos de agua, el status de aireación difirió significativamente entre suelos de diferentes texturas, pero con similares valores de espacio poroso ocupado por agua, todos los suelos presentaron condiciones de aireación y tasas de denitrificación semejantes. En adición, se considera que el contenido de agua es un factor más importante en la permeabilidad y difusión gaseosa que las características texturales del suelo, aún en condiciones de baja humedad (Jungkunst, 2004). Por ello, las diferencias en textura entre los suelos probablemente no provocan una influencia decisiva sobre las condiciones de aireación bajo saturación hídrica, dado que la alta humedad genera fuertes condiciones anaeróbicas independientemente del tamaño de los poros que predominan en cada suelo.

Por otro lado, altos niveles de arcillas suelen vincularse a elevados niveles de materia orgánica de los suelos, debido a la formación de complejos húmico-arcillosos, que permiten la estabilización de la materia orgánica (Balesdent *et al.*, 2000), por lo que el aumento en los niveles de arcillas está a menudo acompañado por mayores niveles de nutrientes orgánicos y biomasa microbiana asociada (Kaiser *et al.*, 1992). Aulakh *et al.* (1991b) concluyeron que la influencia de la textura del suelo en las emisiones por denitrificación a condiciones similares de aireación, se debió a una compleja interacción entre la capacidad inherente al suelo de proveer C y NO_3^- y otros factores de suelo. De Klein y Van Logtestijn (1996) encontraron que las tasas de denitrificación se relacionaban con la humedad del suelo en suelos francos pero no en suelos arenosos, debido a una pobre provisión de C y NO_3^- que limitó dichas pérdidas en los suelos de textura más gruesa. Estas evidencias marcan la importancia de analizar el efecto de las distintas características del suelo que cambian en paralelo a la textura cuando se intenta evaluar el efecto de suelos granulométricamente diferentes sobre las emisiones gaseosas de N.

En un trabajo clásico, Reddy *et al.* (1980) encontraron que los pasos más lentos en el proceso de pérdida de N de suelos anegados eran la baja tasa de difusión del NH_4^+ hacia la capa aeróbica y la baja oxidación del mismo producto de la dificultosa difusión del O_2 a través del agua suprayacente, constituyéndose estos procesos en reguladores de las pérdidas de N en suelos inundados. Es probable entonces que suelos más finos, de mayor superficie específica, limiten la difusión ascendente del NH_4^+ en mayor medida que suelos más gruesos. Además, la adsorción de N- NH_4^+ es estimulada por condiciones de anaerobiosis debido a menores tasas de nitrificación y a que bajo condiciones reductoras las capas de óxido férrico sobre los

minerales arcillosos se reducen y disuelven en la solución del suelo, eliminándose los obstáculos para la fijación del N-NH_4^+ en las superficies de las arcillas (Zhang y Scherer, 2000). Apoyando estos conceptos, Bandibas *et al.* (1994) y Vermoesen *et al.* (1996) hallaron una relación positiva entre las tasas de emisión de N_2O y el porcentaje de arena del suelo, bajo condiciones de anegamiento. En una reciente revisión de la bibliografía existente, Ciarlo *et al.* (2006) hallaron que el porcentaje de arcillas se relacionaba negativamente a las emisiones de N por denitrificación. Sin embargo, este efecto puede ser contrareestado por el potencial suministro de C y N mayor para los organismos denitrificadores en los suelos de textura más fina.

Con respecto al efecto de la composición granulométrica y su efecto sobre las emisiones de N_2O , Stehfest y Bouwman (2006) encontraron mayores emisiones de este gas desde suelos con textura fina con respecto a aquellas desde textura más gruesa, coincidiendo con la clásica revisión de Bouwman (1996). Sin embargo, y según el modelo DNDC (Li *et al.*, 1992b) disminuciones de un 20% en el nivel de arcillas conducirían a aumentos en las emisiones de N_2O de más de 40%, debido a una adsorción más fuerte en las arcillas de N_2O que de N_2 .

5.1.1.2. Uso del suelo, nivel de materia orgánica y emisiones de gases nitrogenados

La intensificación de la agricultura convencional provoca la disminución del contenido de materia orgánica edáfica (Dormaar y Willms 2000). En los últimos 30 años en Argentina, con el desarrollo del cultivo de soja y con la posibilidad de producir un doble cultivo en un año, ha habido un incremento constante en la intensidad de uso de los suelos. La intensificación del uso agrícola de los suelos pampeanos causó una generalizada caída en la disponibilidad de C y nutrientes asociados (Uricarriet y Lavado, 1999; Alvarez *et al.*, 2001). La reducción de los niveles de materia orgánica se visualiza en disminuciones semejantes en la actividad de biomasa microbiana, lo cual afecta los ciclos bioquímicos del C y N (Grant *et al.*, 1993).

El nivel de materia orgánica también está relacionado con las posibilidades de promover condiciones reductoras debido a que las energías y electrones que propician las reacciones redox del N provienen, casi de manera exclusiva, de la oxidación de compuestos del C. En suelos con altos contenidos de materia orgánica, el consumo del O_2 y la posibilidad del desarrollo de micrositios anaeróbicos está fundamentalmente relacionado a la fracción fácilmente descomponible del C orgánico (Reddy y Patrick, 1984). En un trabajo con suelos agrícolas de Nueva Zelanda, Choudhary *et al.* (2001) encontraron que la disminución de los niveles de materia orgánica, producto de una larga historia agrícola continuada, condujo a limitaciones en los niveles de denitrificación bajo condiciones de campo. Los suelos de pasturas presentan en general altos niveles de C orgánico, y existe en ellos un alto potencial de mineralización y subsecuente nitrificación y denitrificación (Estavillo *et al.*, 2002). Parry *et al.* (2000) encontraron que a pesar de tener un número similar de organismos heterótrofos, suelos de pasturas y agrícolas tenían una cantidad de organismos denitrificadores que representaba el 2,3 y el 0,55% de la microflora total, respectivamente.

El contenido de materia orgánica humificada puede impactar decisivamente en los procesos de pérdida de N en suelos anegados, ya que también afecta la capacidad de intercambiar cationes y por lo tanto los niveles de adsorción del N amoniacal, cuyo transporte y disponibilidad son importantes reguladores de las pérdidas de este elemento en suelos anegados (Reddy *et al.*, 1980). Reddy y Patrick (1980) encontraron que en suelos fertilizados con fuentes amoniacales, sulfato de amonio y urea, las pérdidas de N disminuían en relación directa con la CIC y nivel de materia orgánica de los suelos, debido a la alta adsorción de N-NH_4^+ .

Dado que las emisiones de N_2O derivan fundamentalmente de procesos de denitrificación (Bergsma *et al.*, 2002; Tietema *et al.*, 2007), aumentos en los niveles de

C estimulan la actividad heterotrófica en general y la actividad denitrificatoria en particular, aumentando las emisiones de N₂O. En una reciente y completa revisión de la bibliografía existente, Stehfest y Bouwman (2006) registraron emisiones de N₂O en aumento ante aumentos en los niveles de C orgánico de los suelos. Por el contrario, Gale *et al.* (1993) encontraron una mayor eliminación de N mineral de aguas residuales por procesos de denitrificación desde suelos minerales con respecto a suelos orgánicos, ambos bajo condiciones de anegamiento, aunque ninguna explicación a este efecto fue propuesta.

La existencia del poder reductor contenido en el material orgánico también es clave para la reducción del N₂O generado a N₂, con la consecuente disminución de la tasa N₂O/(N₂O+N₂). Letey *et al.* (1981) encontraron en suelos con menores contenidos de materia orgánica, que los períodos de formación de las enzimas nitrato reductasa y óxido nitroso reductasa tras el inicio de condiciones anaeróbicas citados por Firestone y Tiedje (1979) requirieron más tiempo para llevarse a cabo. El modelo de descomposición y denitrificación DNDC (Li *et al.*, 1992a y b) asume que aumentos en los niveles de C soluble pueden disminuir las emisiones de N₂O dado se provee suficiente cantidad de C para llevar a cabo la secuencia denitrificadora en forma completa. Henault *et al.* (1998) encontraron emisiones de N₂O significativamente mayores en suelos con bajo contenido de C orgánico, con respecto a suelos con concentraciones de ese elemento mayores; los autores atribuyeron estos altos valores a la baja capacidad de reducción del N₂O en suelos con bajos niveles de C orgánico.

5.1.1.3. Efecto de los pesticidas sobre las emisiones de gases nitrogenados

La intensificación en los últimos años de la producción agropecuaria en Argentina resultó también en un incremento en el consumo de pesticidas. Dentro de los pesticidas, el rubro de los herbicidas es el que más ha crecido en los últimos años (Bertonatti y Corcuera, 2000). El glifosato [N-(fosfonometil)glicina], un herbicida foliar, de acción total no selectivo, fue descubierto en 1970 y es usado en todo el mundo y en Argentina ya que controla eficazmente un amplio rango de malezas (Weed Science Society of America, 2002). El glifosato es considerado generalmente un herbicida de vida corta en el suelo (Ratcliff *et al.*, 2006), siendo su degradación casi exclusivamente biótica (Schnurer *et al.*, 2006). El glifosato puede ser degradado por varias especies de bacterias del suelo, como por ejemplo *Pseudomonas* (Gimsing *et al.*, 2004), para ser utilizado como fuente de C y N (Haney *et al.*, 2000), y de P (Ratcliff *et al.*, 2006). El glifosato se adsorbe fuertemente en los componentes del suelo, especialmente en óxidos de hierro y aluminio, y el grupo fosfonato es el responsable en esta interacción (Toni *et al.*, 2006). Mientras que el grupo fosfonato se une al coloide, el grupo carboxilo permanece relativamente “libre” para ser degradado (Sheals *et al.*, 2002), aunque la adsorción limita la tasa de degradación del glifosato; la inactivación de este herbicida en los suelos por su adsorción a los coloides puede durar días y hasta meses dependiendo de las características del suelo (Schnurer *et al.*, 2006).

Aunque el glifosato inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos en plantas y microorganismos (Jaworski, 1972), en general se considera que es inocuo para los microorganismos del suelo bajo las dosis recomendadas como herbicida, tanto en condiciones de campo como de laboratorio (Busse *et al.*, 2001). Se ha observado que el glifosato estimula la actividad microbiana (Haney *et al.*, 2000, 2002a y b; Krutz *et al.*, 2003) aunque algunos estudios mostraron efectos tóxicos sobre la población microbiana del suelo (Araujo *et al.*, 2003). Schnurer *et al.* (2006) reportaron que la presencia de material capaz de adsorber a este plaguicida disminuyó la importancia de dichos efectos tóxicos.

El fungicida Opera®, compuesto por Epoxiconazole y Pyraclostrobin, ha sido muy utilizado en el cultivo de soja en la República Argentina en los últimos años, y existe muy poca bibliografía relacionada a su efecto sobre los procesos de suelo en la

literatura abierta. El Epoxiconazole, (2*RS*,3*SR*)-1-[3-(2-clorofenil)-2,3-epoxi-2-(4-fluorofenil)propil]-1*H*-1,2,4-triazol, es un funguicida de amplio espectro de la familia de los triazoles (Buerge *et al.*, 2006). El Pyraclostrobin, metil *N*-{2-[1-(4-clorofenil)pirazol-3-yloximetil]fenil}(*N*-metoxi)carbamato, es un funguicida de reciente aparición de la familia de las estrobilurinas, que actúa por inhibición de la germinación de las esporas, el desarrollo del tubo germinativo y la esporulación.

La saturación de los poros del suelo con agua puede afectar las poblaciones microbianas, y por lo tanto, la degradación y aprovechamiento de los nutrientes presentes en los pesticidas, como fue sugerido por Doran *et al.* (2006). Para aquellos pesticidas cuya degradación se relaciona preferentemente a condiciones reductoras como el Fipronil (Doran *et al.*, 2006) la presencia de agua puede contribuir a la desorción de los pesticidas y a una mayor posibilidad de ataque microbiano. Sin embargo, se ha observado que la degradación de otros herbicidas como MCPA o Mecoprop se detiene dramáticamente como consecuencia de la saturación de los suelos (Harrison *et al.*, 1998). Schroll *et al.* (2006) encontraron que la degradación de glifosato fue máxima a potenciales agua cercanos a 0,01 MPa, disminuyendo con aumentos en la humedad. Se ha observado que la degradación del Epoxiconazole como fuente de energía y nutrientes es extremadamente lenta en suelos franco arcillosos y franco arenosos bajo condiciones de humedad cercanas a capacidad de campo (Bromilow *et al.*, 1999), mientras que no existen evidencias en la literatura pública de la degradación de los funguicidas Epoxiconazole y Piraclostrobin en suelos saturados con agua.

Desde una perspectiva ambiental, el uso del glifosato sería preferible al de otros herbicidas de mayor movilidad y toxicidad para mamíferos (Lancaster *et al.*, 2006), aunque su efecto sobre el ciclo del N y las emisiones de gases nitrogenados ha sido pobremente estudiado. Ratcliff *et al.* (2006) advirtieron la fuerte necesidad de conocer los efectos colaterales del uso de glifosato sobre los microorganismos de suelo y sus procesos, como por ejemplo el ciclado de nutrientes. En ese sentido, Stratton y Stewart (1991), Haney *et al.* (2002a) y Lancaster *et al.* (2006) encontraron aumentos en las tasas de mineralización del N orgánico tras el agregado de glifosato al suelo, mientras que Carlisle y Trevors (1986) y Stratton (1990) hallaron efectos tóxicos del glifosato sobre la nitrificación a dosis muy superiores a las comerciales. Se han registrado aumentos en las tasas de denitrificación sólo bajo condiciones de laboratorio tras la aplicación de glifosato a un suelo franco arenoso (Stratton y Stewart, 1991). Por su parte, Carlisle y Trevors (1986) encontraron que el glifosato estimulaba la reducción del NO₃⁻, aunque no afectaba la reducción del N₂O; en presencia de C-glucosa el glifosato no afectó la reducción del NO₃⁻ mientras que inhibió la reducción del N₂O, sugiriendo que cuando este herbicida no es rápidamente metabolizado como fuente de energía y nutrientes, éste puede volverse tóxico para el metabolismo denitrificatorio, especialmente para la reducción del N₂O. Philippot *et al.* (2006) no encontraron alteraciones consistentes en las comunidades de organismos que reducen los NO₃⁻ ante el agregado repetido al suelo de glifosato a concentraciones agronómicas. Los reportes del efecto de pesticidas sobre las emisiones de N₂O o de la tasa N₂O/(N₂O+N₂) de las emisiones son escasos. Recientemente se ha mostrado que la aplicación de cloropicrina, un fumigante de suelo para control de plagas, enfermedades y semillas de malezas, aumentó las emisiones de N₂O desde suelos fumigados (Spokas *et al.*, 2005, 2006), aparentemente por aumentos en la actividad denitrificatoria fúngica bajo condiciones aeróbicas (Spokas *et al.*, 2006). De cualquier modo, es probable que cualquier efecto provocado por el agregado de pesticidas sea transitorio y desaparezca luego de su degradación.

5.1.2. Objetivo específico

El objetivo planteado es estudiar la influencia del uso de dos pesticidas de uso agrícola comercial sobre las emisiones de N₂ y N₂O desde suelos agrícolas de distintas características físico-químicas bajo condiciones de saturación.

5.1.3. Hipótesis específicas

- i) Debido a un mayor contenido de C y N, suelos de textura fina y bajo uso de pastizal presentan las emisiones mayores de N₂O y de N₂O+N₂ por denitrificación.
- ii) El agregado de pesticidas provoca aumentos en la respiración y emisiones de N₂O y de N₂O+N₂ por denitrificación, especialmente en suelos con uso agrícola intenso, deficientes en C.

5.2. Metodología específica

5.2.1. Muestreo y acondicionamiento del suelo

Para el presente estudio se trabajó con dos suelos de características texturales bien diferentes; para cada suelo se ubicó una situación de uso agrícola continuo y otra bajo condiciones de pastizal natural, con una duración para ambos usos de por lo menos por diez años. Los diferentes tipos texturales de suelos y de uso condujeron a 4 tipos de suelo, con diferentes características físico-químicas (Tabla 5.1). El suelo Hapludol típico es de textura areno-franca, con 800 g kg⁻¹, 130,75 g kg⁻¹ y 62,5 g kg⁻¹ de arena, limo y arcilla respectivamente, mientras que el suelo Argiudol típico es de textura arcillosa, con 191 g kg⁻¹, 387,6 g kg⁻¹ y 421,4 g kg⁻¹ de arena, limo y arcilla respectivamente. Se extrajeron del establecimiento El Rincón (35° 05' 17" S 61° 31' 53" O), localidad de El Triunfo, muestras no disturbadas del suelo Hapludol Típico, mientras que las muestras no disturbadas del argiudol típico se extrajeron del establecimiento Abeledo (34° 20' 54" S 59° 22' 41" O), de la localidad de Carmen de Areco. Ambas localidades pertenecen a la Provincia de Buenos Aires.

Al momento del muestreo, los días 10 y 11 de Mayo de 2006, los suelos con uso agrícola se encontraban en período de barbecho, con rastrojos de cultivo de soja cosechado la segunda quincena de Marzo, sin presencia importante de malezas verdes. El suelo Hapludol de pastizal presentaba al momento del muestreo una importante cobertura verde, tomándose las muestras de una pequeña área cercana al casco del establecimiento, que nunca había sido sujeto de uso agrícola. El suelo Argiudol de pastizal fue extraído de un lote vecino al muestreado por uso agrícola, que había sido sembrado con Rye-grass anual (*Lolium multiflorum* L.) y Trébol blanco (*Trifolium repens* L.) en el año 1995, once años previo al muestreo, por lo que la cobertura verde estaba ligeramente enriquecida en estas especies y otras nativas.

Suelo	N-NO ₃ ⁻ (mg kg ⁻¹)	Corg (%)	Nt (%)	Dens. ap. (g cm ⁻³)	HE (%)	WFPS (%) a HE	CIC (cmol _c kg ⁻¹)	P ext. (mg kg ⁻¹)	pH
Hapludol Agrícola	13,81	0,88	0,10	1,18	14,5	30,41	7,89	13,1	6,68
Hapludol Pastizal	9,66	1,34	0,12	1,15	16,9	35,33	10,21	20,3	6,26
Argiudol Agrícola	35,5	1,98	0,21	1,09	23,8	44,72	26,61	12,9	6,09
Argiudol Pastizal	22,69	2,86	0,24	0,98	25,6	40,46	31,89	25,5	6,20

TABLA 5.1: Características generales físico-químicas de los suelos.

5.2.2. Tratamientos e incubación del suelo

El diseño del experimento fue en bloques completos aleatorizados, en 4 bloques. Los bloques fueron: Hapludol típico con uso agrícola, Hapludol típico bajo pastizal, Argiudol típico con uso agrícola y Argiudol típico bajo pastizal. La incubación de los cilindros se llevó a cabo por 16 días. Los siguientes tratamientos se repitieron 3 veces por bloque, asignados aleatoriamente a los cilindros de cada suelo:

Niveles de residuos

C. Sin aplicación de pesticidas

Gl. El glifosato [N-(fosfonometil)glicina], formulación comercial Roundup Max® (Monsanto, Saint Louis, USA) fue aplicado en una cantidad aproximada a una dosis comercial de 5 l ha⁻¹, o 2,4 kg IA/ha y se consideró que todo el producto llegaba al suelo como peor escenario de aplicación posible. En este sentido, y considerando una profundidad de ingreso de 1 cm, la concentración de glifosato lograda en el centímetro superficial sería de 1,73 µg g⁻¹. Esta cantidad se aplica por única vez en solución acuosa de relación agua:glifosato de 80:1 al día 1 de la incubación.

Fu. El funguicida Opera® fue aplicado en una cantidad aproximada a una dosis comercial de 0,5 l ha⁻¹, y se considera que todo el producto llegaba al suelo como peor escenario de aplicación posible. Este funguicida está formulado con una combinación de dos ingredientes activos, Epoxiconazole (133 g l⁻¹) y Pyraclostrobin (50 g l⁻¹), de las familias de triazoles y estrobilurinas, respectivamente. En este sentido, y considerando una profundidad de ingreso de 1 cm, la concentración lograda en el centímetro superficial sería de 0,05 µg g⁻¹ y 0,02 µg g⁻¹ de ingrediente activo de Epoxiconazole y Pyraclostrobin, respectivamente. Esta cantidad se aplica por única vez en solución acuosa de relación agua:glifosato de 300:1 al día 1 de la incubación.

La influencia de los pesticidas fueron estudiadas en sus formulaciones comerciales dado que estas normalmente contienen surfactantes que disminuyen la adsorción del pesticida a los coloides por un aumento en su solubilidad en agua o competencia con el ingrediente activo por el sitio de adsorción (Singh y Kumar, 2000).

Todos los cilindros de suelo fueron humedecidos hasta niveles de saturación, 100% WFPS, niveles que se mantuvieron durante todo la incubación. El agregado de agua inicial fue llevado a cabo por lo menos 2 horas antes del muestreo de gases para minimizar posibles pulsos gaseosos generados por el llenado de los poros con agua. Se realizaron tres mediciones por tratamiento de pérdidas de N por denitrificación en distintos momentos. Estos momentos fueron al día 1, a los 9 días, 11 días y 16 días de la incubación. Los frascos con los cilindros fueron mantenidos abiertos permanecieron expuestos a la atmósfera entre mediciones y su humedad fue corregida regularmente para subsanar las pérdidas por evaporación.

5.2.3. Pretratamientos y determinaciones químicas

Las muestras de suelo adicionales fueron sometidas a las siguientes determinaciones básicas según las metodologías descritas en el Capítulo 1:

- pH en agua en relación suelo:agua 1:2,5 (Thomas, 1996)
- N-NO₃⁻ (Carole and Scorigelli 1971).
- Carbono orgánico total (Nelson y Sommers, 1996)
- Carbono orgánico soluble en K₂SO₄ 0,5M (Dambreville *et al.*, 2006).
- Respiración en laboratorio (Jenkinson y Powlson, 1976).

5.2.4. Cálculos y análisis estadísticos

Se realizaron diagnósticos de influencia (Myers, 1986), y luego se evaluó nuevamente el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Se realizaron con el procedimiento PROC REG del programa SAS análisis

de regresión simple entre las variables respuesta (pérdidas por denitrificación y emisiones de N_2O) y las distintas variables químicas edáficas medidas. También se realizó un análisis de regresión múltiple con el procedimiento PROC REG, con el objetivo de encontrar a las variables edáficas que expliquen en mayor medida la variabilidad de las emisiones de N_2O y las emisiones totales por denitrificación. Los diagnósticos de multicolinealidad fueron hechos previamente a los distintos análisis de regresión para evitar problemas de inestabilidad en los coeficientes estimados, a través de los valores de VIF (factor de inflación de varianza) e índice de condición (Myers, 1986). Se eligió el modelo más adecuado dentro de todos los modelos existentes posibles con las variables explicatorias, de acuerdo a los criterios de C_p de Mallows (Mallows, 1973), error cuadrático medio y coeficiente de determinación R^2 ajustado por el número de parámetros (MacNeil, 1983).

Debido a que las mediciones de las emisiones gaseosas y la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ fueron realizadas en las mismas macetas a lo largo de la incubación, el modelo estadístico elegido fue el de medidas repetidas; sin embargo debido a que los datos no cumplían las condiciones de esfericidad, de Huynh-Feldt y de Greenhouse-Geisser (Huynh y Feldt, 1970), estas variables fueron analizadas con análisis de varianza multivariado, MANOVA. Dado que en todos los casos existió interacción entre los tratamientos y el tiempo de incubación, se realizaron análisis de varianza convencionales fecha por fecha y se separaron las medias según Duncan; de la misma manera fueron analizados los niveles de $N-NO_3^-$, pH y distintas fracciones del C orgánico del suelo. Las emisiones acumuladas y tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$ promedio fueron evaluadas con análisis de varianza convencionales, siendo la separación de medias según Duncan realizada cuando el estadístico-F entre tratamientos fue significativo.

5.3. Resultados

5.3.1. Emisiones de gases nitrogenados

Las emisiones diarias de $N-N_2O$ oscilaron entre 0 y $6,8 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$, con un coeficiente de variación general elevado, de 240%. Las emisiones diarias de N_2O disminuyeron con el tiempo en los suelos de textura arcillosa de Carmen de Areco, mientras que en los suelos areno-francos de la localidad de El Triunfo, estas emisiones aumentaron hacia el octavo día de incubación y luego disminuyeron (Fig. 5.1a). Las emisiones diarias de N_2O en los suelos arcillosos bajo uso agrícola fueron significativamente mayores al resto de las situaciones en los días 1 y 12 de la incubación ($p < 0,0001$ y $p = 0,001$, respectivamente), mientras que en el día 16, ambos suelos bajo uso agrícola presentaron emisiones de N_2O significativamente mayores a los suelos bajo pastizal ($p = 0,002$; Fig. 5.1a). Las emisiones diarias de N_2O no fueron estadísticamente afectadas por los tratamientos de pesticidas impuestos en ningún momento de la incubación ($p > 0,05$).

Las emisiones acumuladas de N_2O oscilaron entre 0,01 y $1,97 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$, con un coeficiente de variación de 108%. Los coeficientes de variación de las emisiones acumuladas de N_2O fueron menores para los suelos arcillosos que para los arenosos, y dentro de cada tipo de suelo, aquellos bajo uso agrícola presentaron menores niveles de variabilidad que los suelos bajo pastizal. Las emisiones acumuladas de N_2O fueron significativamente mayores desde los suelos de textura arcillosa bajo uso agrícola que desde el resto de las situaciones analizadas ($p = 0,002$; Fig. 5.3). No se detectaron efectos significativos de los tratamientos de pesticidas ($p = 0,17$) o de la interacción tipo de suelo x tratamiento ($p = 0,79$) sobre las emisiones acumuladas de N_2O .

Las emisiones diarias de N_2O+N_2 variaron entre 0 y $5,56 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$, con un coeficiente de variación general elevado, de 206%. De la misma manera que las emisiones de N_2O , las emisiones diarias de N_2O+N_2 disminuyeron con el tiempo en los suelos de textura arcillosa de Carmen de Areco, mientras que en los suelos areno-

francos de la localidad de El Triunfo, estas emisiones aumentaron hacia el octavo día de incubación y luego disminuyeron (Fig. 5.1b). Al primer día de incubación, los suelos arcillosos bajo uso agrícola presentaron emisiones diarias de N_2O+N_2 significativamente mayores ($p=0,003$) que bajo uso de pastizal, mientras que en los suelos arenosos el uso agrícola disminuyó estas emisiones con respecto al pastizal (Fig. 5.1b). Al octavo día estas diferencias se mantuvieron pero no fueron significativas ($p=0,85$). En los días 12 y 16 de incubación los suelos de textura arcillosa bajo uso agrícola presentaron emisiones significativamente mayores al resto de las situaciones ($p=0,001$ y $0,003$, respectivamente; Fig. 5.1b). Las emisiones diarias de N_2O+N_2 no fueron estadísticamente afectadas por los tratamientos de pesticidas impuestos en ningún momento de la incubación ($p>0,05$).

Las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 oscilaron entre $0,02$ y $2,42 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$, con un coeficiente de variación de 112%. De la misma manera que las emisiones de N_2O , los coeficientes de variación de las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 fueron menores para los suelos arcillosos que para los arenosos, y dentro de cada tipo de suelo, aquellos bajo uso agrícola presentaron menores niveles de variabilidad que los suelos bajo pastizal. Las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 fueron significativamente menores desde los suelos de textura arcillosa bajo uso de pastizal que desde el resto de las situaciones analizadas ($p=0,02$; Fig. 5.3). No se detectaron efectos significativos de los tratamientos de pesticidas ($p=0,33$) o de la interacción tipo de suelo x tratamiento ($p=0,88$) sobre las emisiones acumuladas de N_2O . Las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 se relacionaron en forma positiva y significativa con las emisiones acumuladas de N_2O ($p=0,0007$, $R^2=0,29$; Fig. 5.4). Esta relación significativa fue similar para las distintas situaciones de localidad y uso ($p=0,08$) y para los tratamientos de pesticidas aplicados ($p=0,12$).

La tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ presentó valores que fueron desde 0 a 17,55, con un coeficiente de variación de los valores diarios de 298%. La tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ desde los suelos bajo uso de pastizal disminuyeron desde el primer día en los suelos con textura arcillosa y desde el octavo día en los suelos de textura arenosa (Fig. 5.2). La tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ desde ambos suelos bajo uso agrícola aumentó hasta el octavo día, se mantuvo hasta el día 12 y a partir de allí descendió hasta valores cercanos a 0 en el último día de incubación (Fig. 5.2). En el último día de incubación la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ de todos los suelos llegó a niveles bajos y similares, con valores entre 0 y 0,68. Los suelos de textura arcillosa presentaron valores de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ significativamente mayores ($p=0,001$) a aquellos de los suelos de textura arenosa en el primer día de incubación (Fig. 5.2), mientras que en los días 8, 12 y 16 de incubación no existieron diferencias significativas ($p>0,05$) entre los cuatro tipos de suelo estudiados. La aplicación de pesticidas presentó efectos significativos sobre la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ sólo el primer día de medición en el suelo arcilloso bajo uso de pastizal; en ese día los suelos aplicados con herbicida presentaron valores de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ significativamente mayores a los suelos donde no se aplicó ningún pesticida ($p=0,03$).

La tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ promedio para toda la incubación presentó una mayor variabilidad en los suelos arenosos que en los de textura más fina, con coeficiente de variación de 187 y 106%, respectivamente. Las tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$ promedio de toda la incubación fueron significativamente mayores desde los suelos de textura arcillosa que desde aquellos de textura arenosa ($p=0,01$; Fig. 5.5a), independientemente del uso del suelo. La aplicación de pesticidas presentó efectos significativos sobre la tasa promedio $N_2O/(N_2O+N_2)$ sólo en los suelos arcillosos. En estos suelos, la aplicación de herbicida aumentó significativamente los valores la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ con respecto al testigo y a los suelos tratados con funguicida ($p=0,03$) bajo uso de pastizal, mientras que bajo uso agrícola los suelos tratados con funguicidas presentaron valores de de

esta tasa significativamente mayores a los suelos donde no se aplicó ningún biocida ($p=0,04$) (Fig. 5.5b).

5.3.2. Emisiones de CO_2

Las emisiones diarias de CO_2 desde los suelos arenosos de El Triunfo bajo uso agrícola aumentaron fuertemente con el tiempo hasta el día doce, a partir del cual disminuyeron (Fig. 5.6a). El resto de las situaciones de localidad y uso presentaron valores bajos y más o menos constantes durante la incubación (Fig. 5.6a). Los tratamientos de pesticidas impusieron generaron efectos significativos sobre las emisiones diarias de CO_2 solamente en los suelos arenosos de El Triunfo bajo uso agrícola (Fig. 5.6b); en esta situación las emisiones de CO_2 desde suelos tratados con pesticidas fueron mayores a aquellos suelos no tratados en los días 1, 8 y 12 de incubación ($p=0,01$, $0,01$ y $0,009$, respectivamente; Fig. 5.6b), no registrándose diferencias el último día de medición.

De la misma manera que las emisiones diarias de CO_2 , las emisiones acumuladas fueron significativamente superiores en los suelos arenosos bajo uso agrícola ($p<0,0001$), mientras que sólo en esta situación de localidad y uso la aplicación de pesticidas produjo aumentos considerables y significativos ($p=0,008$) en las emisiones acumuladas de CO_2 . Las emisiones acumuladas de CO_2 no se relacionaron en forma significativa con los valores log-transformados de las emisiones acumuladas de N_2O ($p=0,85$) y de N_2O+N_2 ($p=0,8$) ni de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ promedio ($p=0,46$).

5.3.3. Carbono orgánico total y soluble, NO_3^- y pH

Los contenidos de C orgánico total variaron obviamente entre las localidades estudiadas y tipos de uso en cada localidad. Como puede verse en la figura 5.10a, los valores de C orgánico total se dividen perfectamente en los suelos de distinta textura en un contenido de C cercano al 2%, mientras que las diferencias debido al uso fueron menos evidentes. Los contenidos de C orgánico total presentaron una mayor variabilidad en los suelos arenosos que en los suelos arcillosos, con coeficientes de variación medios de 20 y 8,5%, respectivamente.

Los contenidos de C orgánico soluble presentaron una mayor variabilidad en los suelos arenosos que en los suelos arcillosos, con coeficientes de variación medios de 41 y 33,3%, respectivamente. Los contenidos de C orgánico soluble disminuyeron con el tiempo de incubación para todas las localidades y tipos de uso con excepción del suelo Argiudol bajo pastizal, donde estos contenidos aumentaron con el tiempo hasta el día 12 de incubación y luego disminuyeron (Fig. 5.8a). El primer día los contenidos de C orgánico soluble fueron significativamente superiores en el Argiudol bajo uso agrícola ($p<0,0001$), mientras que en los días ocho, doce y dieciséis de la incubación dichos contenidos siguieron siempre el mismo orden, con diferencias significativas en todos los casos: Argiudol uso pastizal > Argiudol uso agrícola > Hapludol uso pastizal > Hapludol uso agrícola. Este comportamiento derivó en contenidos de C orgánico soluble promedio para toda la incubación, significativamente diferentes entre todas las situaciones de localidad y uso, en el mismo orden que el mencionado para los contenidos diarios. En los días 12 y 16 de incubación, la aplicación de pesticidas a suelos aumentó significativamente los contenidos de C orgánico soluble edáfico con respecto a suelos no tratados ($p=0,04$ y $0,01$, respectivamente), mientras que los contenidos medios durante toda la incubación de esta fracción de C fueron estadísticamente superiores en los suelos tratados con herbicida y significativamente inferiores en suelos no tratados con pesticidas (Fig. 5.7), independientemente de la localidad o uso (interacción $p=0,69$). Los contenidos medios de C orgánico soluble se relacionaron intensa y positivamente con los contenidos medios de C orgánico total ($p<0,0001$; $R^2=0,92$).

Los contenidos de N-NO_3^- presentaron una mayor variabilidad en los suelos arenosos que en los suelos arcillosos, con coeficientes de variación medios de 29,2 y 16,7%, respectivamente. Siguiendo la tendencia observada por los niveles de C orgánico soluble, los contenidos de N-NO_3^- disminuyeron con el tiempo de incubación para todas las localidades y tipos de uso con excepción de los suelos arcillosos bajo pastizal, donde estos contenidos aumentaron con el tiempo (Fig. 5.8b). Los suelos arenosos con uso agrícola presentaron valores bajos y prácticamente constantes durante la incubación (Fig. 5.8b). Como se desprende claramente de esta figura, en la primer parte de la incubación (días 1-8) los contenidos de N-NO_3^- en los suelos arcillosos bajo uso agrícola son estadísticamente superiores a aquellos de los mismos suelos bajo pastizal, mientras que los suelos arenosos presentaron valores similares y menores a los de los suelos arcillosos ($p < 0,0001$, para ambos días). A partir del día 12 los suelos arcillosos bajo pastizal son los que presentan los mayores contenidos de este anión, significativamente superiores a aquellos de suelos arcillosos bajo uso agrícola y de los suelos arenosos ($p < 0,0001$). Esta dinámica dio como resultado contenidos promedio estadísticamente similares de N-NO_3^- de 27,82 y 27,64 $\mu\text{g g}^{-1}$ para los suelos arcillosos bajo pastizal y uso agrícola, respectivamente, y de 5,1 y 1,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ para los suelos arenosos bajo uso agrícola y pastizal, también estadísticamente similares. No se detectaron efectos significativos de los tratamientos de pesticidas ($p = 0,18$) o de la interacción tipo de suelo x tratamiento ($p = 0,92$) sobre los contenidos medios de N-NO_3^- .

Los valores de pH de los suelos estudiados no variaron con importancia entre los días o tratamientos de pesticidas impuestos; la única variación registrada se dio, tal lo esperado, entre los tipos de suelo diferentes (datos no mostrados).

Las emisiones acumuladas de N_2O se relacionaron significativamente sólo con los contenidos de N-NO_3^- en forma directa ($p = 0,007$, $R^2 = 0,19$; Fig 5.9a). Las emisiones acumuladas de $\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2$, en cambio, no se relacionaron estadísticamente ($p > 0,05$) con ninguna de las variables edáficas analizadas. Los valores promedio de la tasa $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2)$ se relacionaron significativamente y en forma directa con los contenidos de N-NO_3^- ($p < 0,0001$, $R^2 = 0,38$; Fig. 5.9b), de C orgánico total ($p = 0,001$, $R^2 = 0,28$; Fig. 5.10a) y soluble ($p = 0,001$, $R^2 = 0,27$; Fig. 5.10b). Las emisiones acumuladas de CO_2 se relacionaron en forma significativa e inversa con los contenidos de C orgánico total ($p = 0,01$; $R^2 = 0,17$) y de C orgánico soluble ($p = 0,01$; $R^2 = 0,16$), independientemente de los tipos de suelo y uso y de los tratamientos de pesticidas impuestos.

5.3.4. Figuras

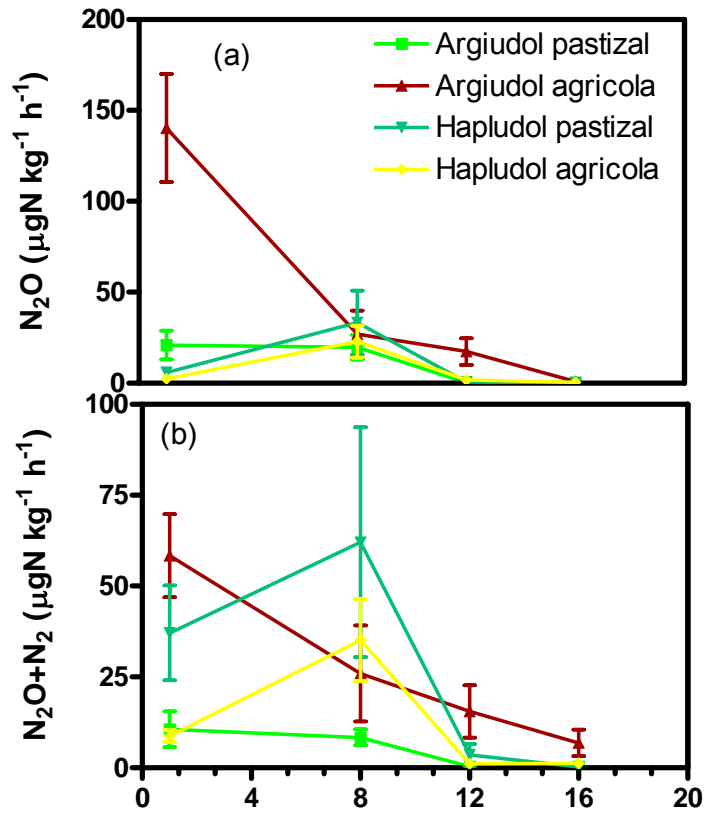


Figura 5.1. Evolución de las emisiones diarias de N_2O (a) y de las emisiones diarias de N_2O+N_2 (b) a través de la incubación para las diferentes tipos de suelos y de uso. Los puntos corresponden a la media de nueve repeticiones con las barras representando el error estándar de la media.

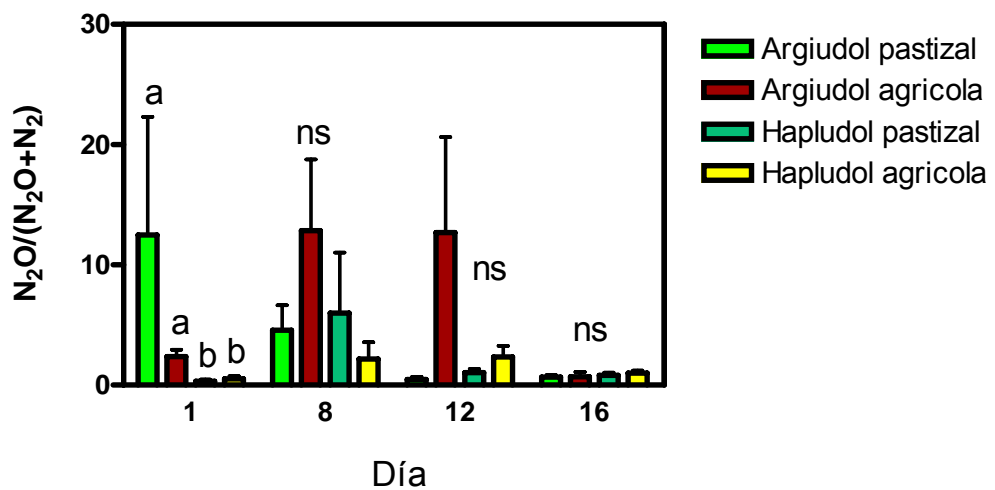


Figura 5.2. Valores de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ a través del experimento para los diferentes tipos de suelo y uso. Las barras corresponden a la media de nueve

repeticiones con las barras pequeñas representando el error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas entre situaciones, con $p < 0,05$.

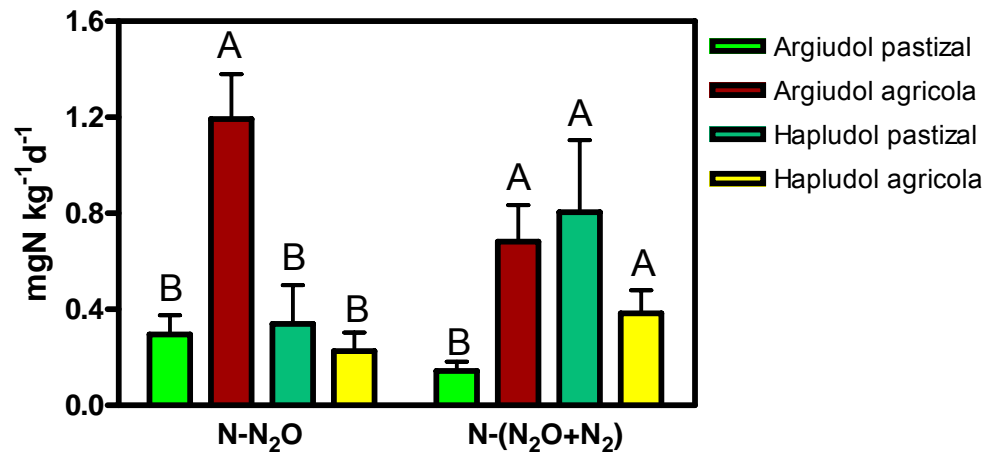


Figura 5.3. Emisiones acumuladas de N₂O y de N₂O+N₂ para los distintos tipos de suelo y uso. Las barras corresponden a la media de nueve repeticiones con las barras pequeñas representando el error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas entre situaciones, con $p < 0,05$.

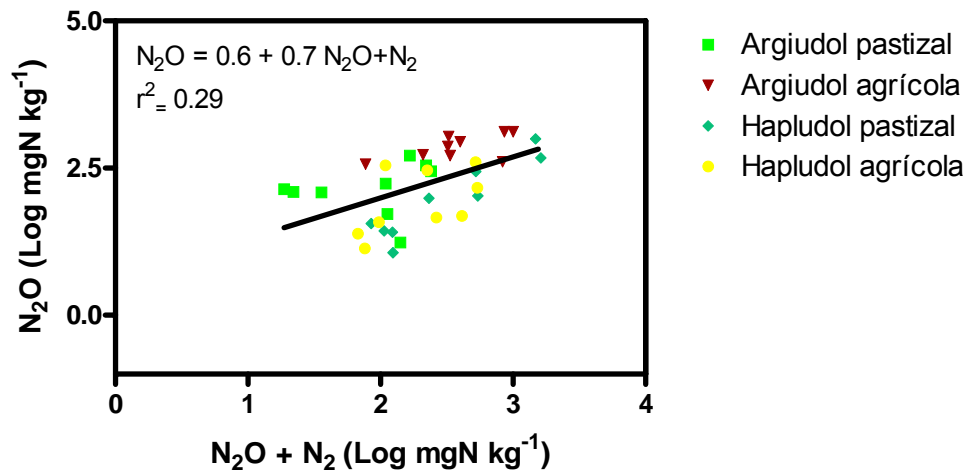


Figura 5.4. Relación entre las emisiones acumuladas de N₂O y por denitrificación de N₂O+N₂ acumuladas, ambas log-transformadas, para las distintos tipos de suelos y usos.

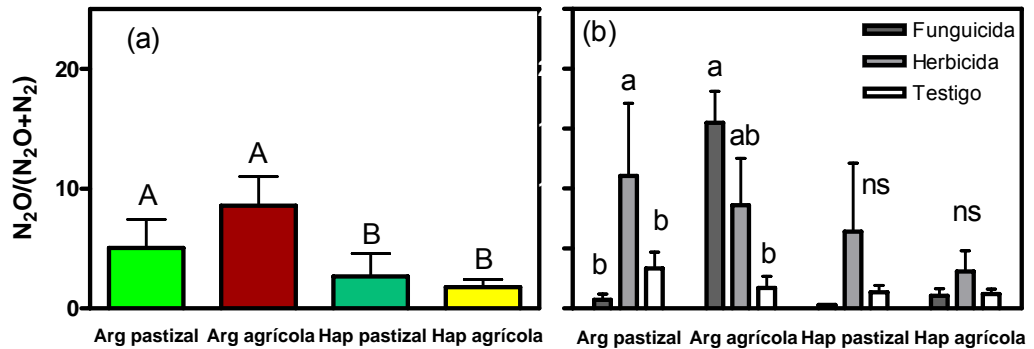


Figura 5.5. Tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$ promedio para los distintos tipos de suelo y uso (a) y para los tratamientos de pesticidas aplicados (b), donde Arg pastizal representa al suelo Argiudol bajo pastizal, Arg agrícola representa al suelo Argiudol bajo uso agrícola, Hap pastizal representa al suelo Hapludol bajo pastizal y Hap agrícola representa al suelo Hapludol bajo uso agrícola. En (a) las barras corresponden a la media de nueve repeticiones con las barras pequeñas representando el error estándar de la media, y letras diferentes indican diferencias significativas entre situaciones, con $p < 0,05$. En (b) las barras corresponden a la media de tres repeticiones con las barras pequeñas representando el error estándar de la media, y letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada situación, con $p < 0,05$.

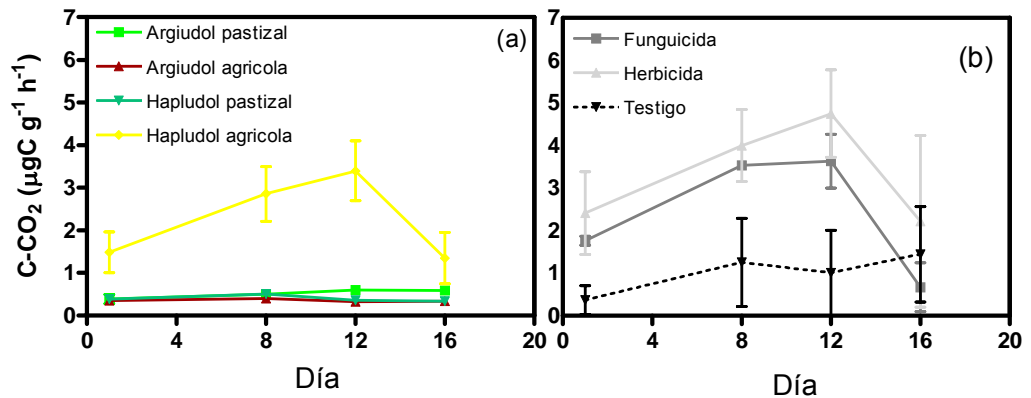


Figura 5.6. Evolución de las emisiones diarias de CO_2 para las distintas localidades y tipos de uso (a), y para los tratamientos de pesticidas aplicados en el suelo de El Triunfo bajo uso agrícola (b). En (a) los puntos corresponden a la media de nueve repeticiones con las barras representando el error estándar de la media. En (b) los puntos corresponden a la media de tres repeticiones con las barras representando el error estándar de la media.

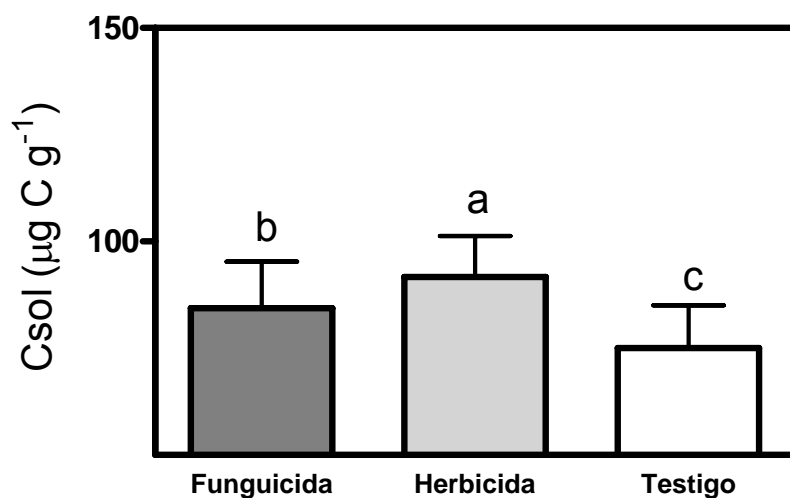


Figura 5.7. Contenidos promedio de C orgánico soluble para los tratamientos de pesticidas aplicados. Las barras corresponden a la media de doce repeticiones con las barras pequeñas representando el error estándar de la media, y letras diferentes indican diferencias significativas entre situaciones, con $p < 0,05$.

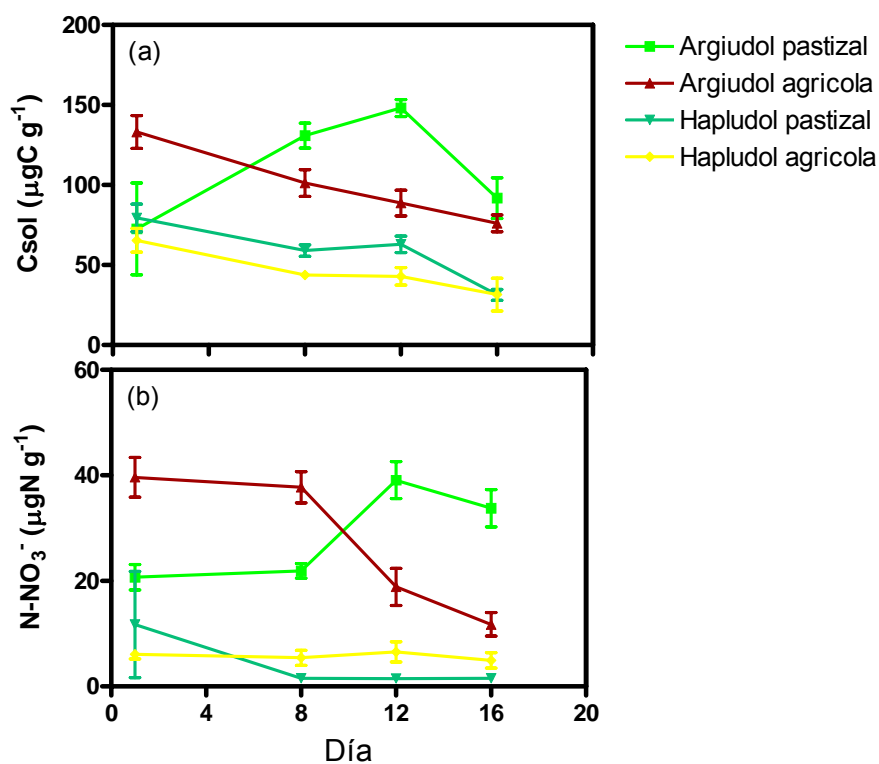


Figura 5.8. Evolución de los contenidos de C soluble (a) y de $N-NO_3^-$ (b) para los distintos tipos de suelo y uso. Los puntos corresponden a la media de nueve repeticiones con las barras representando el error estándar de la media.

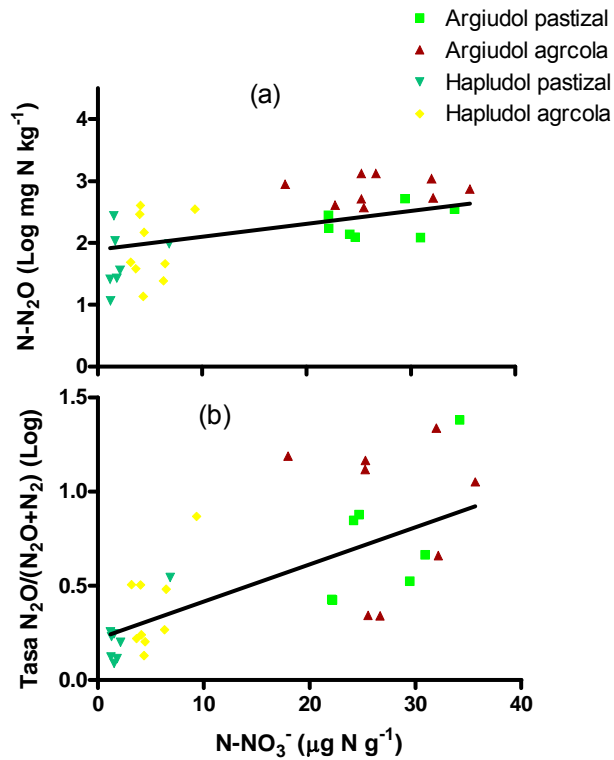


Figura 5.9. Relación entre los contenidos de N-NO_3^- y las emisiones acumuladas de N_2O logtransformadas (a) y la tasa $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ promedio logtransformada (b) para los distintos tipos de suelo y uso.

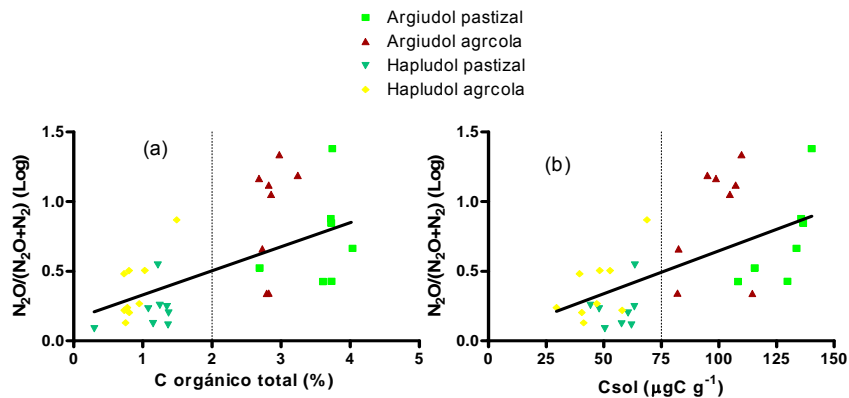


Figura 5.10. Relación entre los contenidos de C orgánico total (a) y contenido de C orgánico soluble (b) y la tasa $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ promedio logtransformada para los distintos tipos de suelo y uso.

5.4. Discusión

Aún en condiciones de elevados y uniformes contenidos de agua, 100% WFPS, tanto las emisiones de N_2O como de $\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2$ presentaron muy elevados niveles de variabilidad, con coeficientes de variación de hasta 240%. Esto indica que existirían otros factores además del contenido de humedad, o régimen de aireación, que

contribuyen a la amplia heterogeneidad espacial y/o temporal del proceso de denitrificación y emisiones de N_2O asociadas. El uso agrícola atenuó la variabilidad de las emisiones de gases nitrogenados. En forma inversa, se ha registrado que suelos argiudoles de la Región Pampeana con historia de agricultura prolongada presentaron un coeficiente de variación máximo de la denitrificación potencial de 108%, mayor a aquel de argiudoles sin historia agrícola y a los valores de hapludoles y haplustoles con y sin historia agrícola de la misma región (Giambiagi *et al.*, 1990), aunque es lógica su menor variabilidad dado que al ser una evaluación del potencial de denitrificación, los suelos fueron sometidos a condiciones uniformes y óptimas para dicho proceso. Por otro lado, la menor variabilidad en las emisiones de gases nitrogenados desde suelos arcillosos se asoció a una menor variabilidad de los contenidos de C orgánico (soluble o total) o $N-NO_3^-$ que aquella de suelos arenosos.

La evolución temporal de las emisiones de N_2O y de N_2O+N_2 en los suelos arcillosos de la localidad de Carmen de Areco bajo uso agrícola (Fig. 5.1a y b) reflejó la evolución de los contenidos de $N-NO_3^-$ y C soluble. La evolución de las emisiones gaseosas en las otras tres situaciones de localidad y uso son más difíciles de explicar, y probablemente se deban a una combinación particular de condiciones redox y de disponibilidades de C y N en cada caso. De la misma manera que las emisiones de N_2O , el pico de emisiones de N_2O+N_2 se dio el primer día en los suelos arcillosos y siete días más tarde en los suelos arenosos. Este comportamiento probablemente se deba a una inducción diferencial de las enzimas denitrificadoras durante la preincubación de los suelos a 30% WFPS. Debido a una mayor proporción de microporos en los suelos de granulometría más fina, similares volúmenes de poros ocupados por agua llevan a mayores posibilidades de generar condiciones reductoras que suelos más arenosos (Aulakh *et al.*, 1991b). Por lo tanto, las mayores condiciones reductoras iniciales de los suelos arcillosos permitieron altas emisiones de gases desde el inicio de la incubación, mientras que los microorganismos de los suelos arenosos necesitaron un tiempo mayor desde el inicio de la saturación para desarrollar completamente la actividad enzimática denitrificadora.

Las dinámicas temporales dieron como resultado mayores emisiones acumuladas de N_2O durante los dieciséis días de incubación desde los suelos agrícolas de textura fina de la localidad de Carmen de Areco (Fig. 5.3). La difusión del O_2 puede ser muy lenta, especialmente en suelos con altos contenidos de arcillas y en consecuencia una alta proporción de microporos (Smith, 1990), donde las condiciones de anaerobiosis son más factibles de ocurrir. Sin embargo, este efecto no debería ser importante en suelos saturados como los usados en este experimento, donde los fenómenos de anaerobiosis no dependen del tamaño de los poros. Las mayores emisiones de N_2O en los suelos arcillosos bajo uso agrícola que bajo pastizal pueden deberse entonces a que en el segundo caso, los mayores niveles medios de materia orgánica coloidal, limitaron la denitrificación, debido probablemente a una limitación en la difusión ascendente del $N-NH_4^+$ para su oxidación a $N-NO_3^-$ en la capa aeróbica superficial (Reddy *et al.*, 1980). De hecho, las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 fueron mínimas en los suelos acillosos bajo pastizal (Fig. 5.3) y se relacionaron significativamente a las emisiones acumuladas de N_2O (Fig. 5.4), remarcando otra vez la importancia de este proceso como formador del N_2O . Similarmente, Holtan-Hartwig *et al.* (2000) encontraron que las menores emisiones medias de N_2O+N_2 se dieron en suelos con los más altos contenidos de materia orgánica. Robertson *et al.* (2000) encontraron en suelos francos que el flujo de N_2O desde suelos agrícolas fue tres veces mayor que desde suelos con pastizales naturales de las mismas series de suelo. Se ha observado que la enzima óxido nitroso-reductasa es más sensible en suelos agrícolas que aquellos de pastizal (Bergsma *et al.*, 2002), hecho que puede haber contribuido a las mayores emisiones de N_2O desde el suelo de textura fina con uso agrícola. Los mayores valores de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ de los suelos arcillosos

bajo uso agrícola que bajo pastizal, aunque estadísticamente similares (Fig. 5.5a) podrían ser una evidencia de dicha sensibilidad enzimática diferencial.

Las mayores emisiones de N_2O del suelo agrícola de textura arcillosa que de los dos suelos de textura arenosa no puede explicarse por una mayor actividad denitrificadora heterotrófica, dado que estos tres suelos presentaron emisiones de N_2O+N_2 estadísticamente similares (Fig. 5.3). No obstante, un mayor nivel medio de $N-NO_3^-$ en el caso del suelo agrícola de Carmen de Areco (Fig. 5.8b) pudo haber inhibido con mayor intensidad la actividad de la enzima óxido nitroso-reductasa (Blackmer y Bremner, 1978), resultando en mayores emisiones de N_2O que ambos suelos arenosos. Una relación significativa entre las emisiones de N_2O y los contenidos de $N-NO_3^-$ (Fig. 5.9a), aun con bajos grados de ajuste, parece confirmar este efecto. La fuerte adsorción del N_2O en la superficie de las arcillas (Li *et al.*, 1992) parece ser un efecto de poca importancia si se observan las elevadísimas emisiones de N_2O desde los suelos agrícolas de textura arcillosa.

Las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 en los dieciséis días de incubación oscilaron entre 0,4 y 38,83 mg N kg⁻¹, valores cercanos a aquellos reportados por Aulakh *et al.* (1991b), quienes hallaron pérdidas por denitrificación de N_2O+N_2 cercanas a 14 mg N kg⁻¹ en treinta días de incubación, desde suelos franco arenosos y franco arcillosos con contenidos de humedad de 90% WFPS. En nuestro trabajo, el efecto de la textura sobre las emisiones acumuladas de N_2O+N_2 no fue marcado (Fig. 5.3). En este caso las emisiones de N_2O+N_2 fueron menores en el suelo agrícola de textura más fina; debido a que la provisión de C y N en este suelo, así como el nivel de aireación, no fueron limitantes para el proceso de denitrificación, la limitación por una difusión deficiente del NH_4^+ y del O_2 hacia la capa aeróbica de este suelo con la mayor CIC parece ser la única explicación posible.

Linn y Doran (1984) propusieron que las emisiones gaseosas de N deberían ser generalmente mayores desde suelos de pasturas que desde suelos agrícolas. En los suelos de textura arcillosa ocurrió exactamente el efecto contrario (Fig. 5.3), debido a una limitación en la difusión ascendente del NH_4^+ y en su oxidación en la capa de suelo aeróbica superficial, como fue mencionado anteriormente. En el caso de los suelos arenosos de la localidad El Triunfo, las emisiones de N_2O+N_2 desde los suelos arenosos de El Triunfo fueron mayores bajo pastizal que bajo uso agrícola, aunque la diferencia entre ambos no fue significativa. Esta ausencia de diferencias puede deberse a que el contenido de C, cuya concentración disminuye consistentemente ante el uso agrícola, no fue limitante para el proceso de denitrificación; de hecho no se registró una asociación positiva entre las emisiones de N_2O+N_2 y los contenidos de C orgánico en ninguna de las localidades, aunque es importante destacar que la variabilidad de las mediciones es tan alta que limita muchas interpretaciones. Por el contrario, Giambiagi *et al.* (1990) mostraron que el uso agrícola disminuyó la denitrificación potencial de suelos hapludoles de la región pampeana, mientras que en los argiudoles no se registró ese efecto, debido a una disminución más acentuada en los suelos de textura más gruesa del contenido de C disponible para los microorganismos del suelo. En la misma línea, estos autores encontraron que las emisiones de N_2O+N_2 desde suelos hapludoles, con los menores contenidos de C y N, se relacionaron estadísticamente con los niveles de N y C orgánicos, mientras que en los suelos argiudoles, mejor provistos en C y N, estas variables no se asociaron en forma significativa. En una reciente revisión de 336 mediciones de denitrificación, Hofstra y Bouwman (2005) no registraron influencias estadísticas del contenido de C orgánico de los suelos o la textura y las emisiones de N_2O+N_2 por denitrificación. La explicación más probable a la ausencia de limitaciones por el contenido de C en las emisiones de N_2O+N_2 desde los suelos arenosos es que los bajos valores medios de $N-NO_3^-$ encontrados en estos suelos saturados, entre 5,1 y 1,5 $\mu g g^{-1}$, limitaron las emisiones de N_2O+N_2 por denitrificación (Van Kessel *et al.*, 1993; Dobbie y Smith,

2003b), aunque la alta variabilidad de estas emisiones no permitieron descubrir asociaciones significativas con los contenidos de N-NO_3^- .

Ni las emisiones diarias o acumuladas de N_2O ni de $\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2$ fueron afectadas por la aplicación de un fungicida o del herbicida glifosato. Es probable que las bajas dosis que se emplean a campo sean demasiado bajas como para causar efectos significativos que se destaquen de la variabilidad natural de los suelos y sus poblaciones analizadas. Dado que el glifosato puede ser degradado aún cuando se encuentra adsorbido (Sheals *et al.*, 2002), es lógico que no existan diferencias entre los suelos con diferentes capacidades adsorptivas estudiados en su efecto sobre las emisiones gaseosas de N por denitrificación. Carlisle y Trevors (1986) encontraron que el glifosato no afectaba la reducción del N_2O en muestras disturbadas de suelos franco arenosos, aún con concentraciones mucho mayores a las usadas en producciones comerciales. En suelos ácidos de bosque, Stratton y Stewart (1991) encontraron que el glifosato estimuló las emisiones de $\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2$ a campo solamente en tres de doce sistemas evaluados, mientras que en ensayos de laboratorio con muestras disturbadas, el agregado de glifosato estimuló la denitrificación en suelos de bosque y agrícolas. Con respecto al efecto sobre las poblaciones microbianas, Roslycky (1982) encontró que el glifosato tuvo efectos de poca relevancia en el número de bacterias, actinomicetes u hongos luego de un período de 214 días. A pesar de que se han hallado efectos tóxicos del glifosato sobre otros procesos del ciclo del N como la nitrificación (Carlisle y Trevors 1986; Stratton, 1990), estos efectos ocurrieron tras la aplicación del herbicida a dosis muy superiores a las comerciales. A nuestro conocimiento tampoco existen demasiados reportes sobre el efecto de otros herbicidas sobre las emisiones de gases nitrogenados; sólo un trabajo señala la ausencia de efectos significativos de herbicidas tipo 2,4 D y de la familia de las triazinas sobre las tasas de denitrificación, con concentraciones de hasta $100 \mu\text{g g}^{-1}$ de ingrediente activo del herbicida (Yeomans y Bremner, 1985).

Las mayores tasas $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ en los suelos arcillosos con respecto a los suelos arenosos (Fig. 5.5a) también puede explicarse por mayores niveles medios de N-NO_3^- en los primeros, y como ya fue mencionado, es conocido el efecto inhibitor de este anión sobre la actividad de la enzima óxido nitroso-reductasa (Blackmer y Bremner, 1978). Nuevamente la significativa relación positiva encontrada entre la tasa $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ y los contenidos de N-NO_3^- (Fig 5.9b) confirman este efecto. Dado que existe una adsorción más fuerte en las arcillas de N_2O que de N_2 (Li *et al.*, 1992), este efecto podría haber contribuido a morigerar el efecto de los mayores N-NO_3^- en los suelos arcillosos sobre la tasa $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$. Cabe destacar que los suelos arcillosos presentaron mayores niveles de C, y por ende mayor poder reductor, de lo que se concluye que el nivel de N-NO_3^- ejerció una influencia dominante sobre el proceso de reducción del N_2O . El hecho de que los suelos arcillosos presentaran además de elevados niveles de N-NO_3^- , elevados contenidos de C orgánico total y soluble, permiten explicar la asociación positiva encontrada entre estas fracciones de C y la tasa $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ (Fig. 5.10), que dista de ser una relación causa-efecto.

La historia previa de aireación y uso del suelo del suelo puede ser un factor importante en la determinación de la magnitud y composición de las emisiones de gases nitrogenados (Dendooven y Anderson, 1995; Dendooven *et al.*, 1996). Bergsma *et al.* (2002) encontraron que diferencias en las emisiones de N_2O desde suelos de uso agrícola y pastizal no disturbado podían deberse a que la historia de pastizal podría haber seleccionado especies denitrificadoras con la habilidad de mantener la actividad óxido nitroso-reductasa, mientras que los suelos agrícolas, mas aireados, podían haber seleccionado especies con mayor actividad nitrato-reductasa. De la misma manera se ha observado que existen diferencias intrínsecas en la composición de las comunidades denitrificadoras de diferentes suelos, que son funcionalmente relevantes y que pueden tener efectos pronunciados en las emisiones de N_2O (Holtan-

Hartwig *et al.*, 2000), aunque estos autores encontraron que situaciones de anegamiento de 48 horas disminuían marcadamente dichas diferencias. En nuestro trabajo, y con suelos saturados de humedad por períodos prolongados, la historia de uso del suelo, o los contenidos de materia orgánica derivados de dicho uso, no parecieron incidir con intensidad en los productos finales de las emisiones de gases nitrogenados (Fig. 5.5), estimada por la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$, siendo más relevantes algunas propiedades actuales del suelo en la determinación de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$, como su contenido de $N-NO_3^-$. La respuesta en las emisiones de N_2O de cada suelo está relacionada a la capacidad de reducción del N_2O formado, y esta capacidad suele estar moderada en los suelos por los niveles de C orgánico (Henault *et al.*, 1998; Jetten *et al.*, 2001), aunque la ocupación de todos los poros por agua proveyó probablemente condiciones altamente reductoras que fueron independientes de la disponibilidad de dadores de electrones o compuestos carbonados.

La aplicación de pesticidas sólo generó efectos significativos sobre la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ promedio en los suelos de textura fina. La ausencia de detección de efectos significativos sobre la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ desde los suelos arenosos puede deberse a la mayor variabilidad general que presentó dicha variable en estos suelos. En el suelo Argiudol bajo pastizal, la aplicación de herbicida aumentó dicha tasa, probablemente a través de un efecto tóxico o inhibidor sobre los microorganismos capaces de reducir el N_2O . Se ha observado que el Cloramfenicol, un compuesto inhibidor de la síntesis de proteínas, afectó en mayor medida en suelos anaeróbicos la reducción de N_2O que la de NO_3^- , provocando su uso aumentos en la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ de 0,23 a 0,72 (Firestone y Tiedje, 1979). Trabajando con microorganismos extraídos de suelos de la Región Pampeana, Zabaloy y Gómez (2005) hallaron que el glifosato inhibía la actividad de rizobios de crecimiento lento; además, existen evidencias de efectos supresores de la actividad microbiana por los surfactantes usados en las formulaciones comerciales de plaguicidas (Haney *et al.*, 2002b). La aplicación de glifosato no provocó un efecto tan marcado en esta tasa en suelos agrícolas (Fig. 5.5b), lo que puede ser asociado a una presión de selección diferencial hacia microorganismos capaces de metabolizar dicho herbicida en el suelo Argiudol bajo uso agrícola. La repetida aplicación de altas dosis de glifosato (hasta 7 litros de formulación comercial por hectárea) en los últimos dos años sobre este suelo agrícola probablemente favoreció la existencia de organismos capaces de degradar eficientemente dicho herbicida, utilizándolo como fuente de energía y N (Haney *et al.*, 2000) y P (Ratcliff *et al.*, 2006), limitando su efecto sobre las emisiones de gases de N. Sin embargo, es difícil separar en el suelo el efecto tóxico o inhibidor y estimulador de la aplicación de glifosato sobre las comunidades responsables del ciclo del N en los suelos.

Una alta adsorción a los coloides o una degradación eficiente por los microorganismos del funguicida aplicado en los suelos arcillosos bajo pastizal pueden explicar la ausencia de efectos significativos de este pesticida sobre la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$. En los suelos agrícolas de la misma localidad, la aplicación de funguicidas sobre un ecosistema con una diversidad microbiana y metabólica más acotada probablemente inhibió la actividad bacteriana capaz de reducir el N_2O , aumentando la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$. Se ha observado que los suelos agrícolas son menos estables a estreses ambientales que suelos de pasturas (Degens *et al.*, 2001; Griffiths *et al.*, 2001), debido a una menor diversidad catabólica microbiana, aunque no existen datos a nuestro conocimiento en la literatura acerca de la degradación de este funguicida o de su efecto sobre las emisiones de gases nitrogenados.

Las diferencias encontradas en los valores de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ entre los tratamientos de pesticidas no pueden adscribirse a los contenidos de $N-NO_3^-$, que fueron estadísticamente similares entre tratamientos ($p=0,17$). En adición el principal efecto de los pesticidas es inhibir la oxidación de los $N-NO_2^-$ (Grant y Payne, 1982),

que también pueden ser sujetos a procesos de denitrificación, y este efecto se da sólo a concentraciones muy por encima de las usadas en forma comercial (Carlisle y Trevors, 1986; Stratton y Stewart, 1991). Este conjunto de información señala que el efecto de los pesticidas sobre los productos finales de la denitrificación no estaría vinculado a deficiencia de óxidos de N susceptibles de ser reducidos.

Las emisiones diarias y acumuladas de CO₂ presentaron valores generalmente bajos, lo que es lógico que ocurra desde suelos saturados, anaeróbicos, que agotan casi todo su O₂ en las primeras cuarenta y ocho horas de saturación (Smith, 1990). Es sabido que existe una microbiología menos eficiente tras el establecimiento de condiciones anaeróbicas; la denitrificación acoplada a la fosforilación por transporte de electrones provee un 60% del ATP generado por respiración con O₂ como aceptor final de electrones (Koike y Hattori, 1975). Curiosamente, sólo el suelo con menores niveles generales de C y N, el suelo de textura arenosa del oeste bonaerense de uso agrícola, presentó valores de respiración altos y sostenidos durante la incubación, significativamente superiores al del resto de las situaciones casi todo el período del experimento (Fig. 5.6a). En este suelo, las emisiones de CO₂ fueron en aumento debido probablemente a la proliferación de bacterias anaeróbicas (Weier *et al.*, 1993) alcanzando elevadas emisiones al día doce de la incubación. Tales magnitudes fueron alcanzadas debido al importante estímulo de los pesticidas sobre la respiración general de este suelo, observándose diferencias significativas entre los tratamientos de pesticidas aplicados (Fig. 5.6b). Se considera que la adsorción de los pesticidas disminuye su degradación en los suelos (Schnurer *et al.*, 2006), por lo que la escasa presencia de coloides de este suelo pobre en arcillas y material orgánico probablemente haya reducido la adsorción e inactivación de los pesticidas. Esta escasa fijación debe haber permitido su uso y respiración por los microorganismos, dado que los pesticidas poseen en su ingrediente activo y surfactantes compuestos de C y N que pueden ser metabolizados y respirados para el crecimiento microbiano. Se ha observado que altas concentraciones de glifosato pueden estimular la actividad microbiana (Haney *et al.*, 2000; Busse *et al.*, 2001), la respiración microbiana (Ratcliff *et al.*, 2006) y aumentar la mineralización del C durante los primeros 7 días de incubación (Haney *et al.*, 2002a). Doran *et al.* (2006) reportaron mayores tasas de degradación del insecticida fipronil en un suelo de textura arenosa que en uno de textura más fina, en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. Entonces, la coexistencia de muy bajos contenidos de C orgánico de este suelo arenoso agrícola con elevadas emisiones de CO₂ permiten explicar la relación inversa y significativa hallada entre las emisiones de CO₂ y las fracciones de C analizadas, más que por una relación causa-efecto entre ambas variables. El efecto de la adsorción del pesticida por los coloides, protegiéndolos de su degradación, puede ser contrareestado por altos niveles de humedad en suelos saturados, como fue observado en la degradación de Triadimefón, un funguicida de la familia de los triazoles (Singh, 2005) efecto que puede explicar la ausencia de diferencias en la respiración general del suelo entre los otras tres situaciones de localidad y uso analizadas. Las emisiones de CO₂ no se relacionaron significativamente con las emisiones de gases nitrogenados, como fue observado y discutido en el capítulo anterior.

Los contenidos de C orgánico total y soluble mostraron diferencias evidentes entre las localidades, o tipos texturales, y el uso pastoril o agrícola. En la evolución temporal del C soluble, como del contenido de N-NO₃⁻, puede observarse el elevado potencial de mineralización que posee el suelo arcilloso bajo pastizal. Los contenidos medios de C soluble fueron de 129,56, 99,8 y 58,17, 47,35 µgC g⁻¹ para los suelos arcillosos bajo pastizal y uso agrícola y para los arenosos bajo pastizal y uso agrícola, respectivamente, que representaban un 0,35, 0,34, 0,46 y 0,52% del C orgánico total. Parry *et al.* (1999) registraron valores similares de C soluble de 157 y 114 µg C g⁻¹ de suelos francos para suelos de pasturas y cultivos anuales, respectivamente, aunque

estos valores representaban un 0,72 y 1,25% del C orgánico total. Se han reportado valores de C soluble inferiores a 60 mg C kg^{-1} como limitantes para la denitrificación (van Kessel *et al.*, 1993; Burton y Beauchamp, 1985), por lo que este elemento puede haber sido limitante en los suelos de textura gruesa, aunque Palma *et al.* (1997) encontraron en suelos de textura franco arcillosa de la Pampa Ondulada que valores de C soluble entre $15\text{-}30 \text{ mg C kg}^{-1}$ no fueron limitantes para este proceso. La aplicación de pesticidas también aumentó significativamente los contenidos de C orgánico soluble (Fig. 5.7), probablemente por degradación de los pesticidas a compuestos de C más simples, siendo el herbicida glifosato el que mayor influencia tuvo sobre esta fracción del C orgánico

5.5. Conclusiones

Las mayores emisiones acumuladas de N_2O ocurrieron desde los suelos de textura arcillosa bajo uso agrícola, confirmando parcialmente la primera hipótesis. La diferencia entre las emisiones de N_2O en los suelos arcillosos entre ambos usos (agrícola-pastizal), puede deberse a que bajo situaciones de pastizal, los mayores niveles medios de materia orgánica coloidal limitaron la denitrificación, debido a una disminución en la difusión ascendente del N-NH_4^+ para su oxidación a N-NO_3^- en la capa de suelo aeróbica superficial. Usos diferentes no generaron diferencias importantes en las emisiones de gases nitrogenados en los suelos arenosos, probablemente porque los contenidos de C no fueron limitantes para la ocurrencia de procesos de denitrificación.

Las menores emisiones de N_2O desde los suelos arenosos que desde el suelo arcilloso agrícola parece deberse a un mayor nivel medio de N-NO_3^- en el caso del suelo arcilloso agrícola, inhibiendo en este último caso con mayor intensidad la actividad de la enzima óxido nitroso-reductasa.

Las mayores tasas $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ en los suelos arcillosos con respecto a los suelos arenosos puede explicarse por mayores niveles medios de N-NO_3^- en los primeros, inhibiendo estos altos niveles la actividad de la enzima óxido nitroso-reductasa. Cabe destacar que los suelos arcillosos presentaron mayores niveles de C, y por ende mayor poder reductor, de lo que se concluye que el nivel de N-NO_3^- ejerció una influencia dominante sobre el proceso de reducción del N_2O . La historia de uso del suelo, o los contenidos de materia orgánica derivados de dicho uso, no parecieron incidir con intensidad en los productos finales de la denitrificación.

Ni las emisiones diarias o acumuladas de N_2O ni de $\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2$ fueron afectadas por la aplicación de un funguicida o del herbicida glifosato, rechazando parcialmente la segunda hipótesis propuesta. Es probable que las bajas dosis que se emplean a campo sean insuficientes para causar efectos significativos que se destaquen de la variabilidad natural de los suelos y sus poblaciones analizadas.

La aplicación de pesticidas sólo generó efectos significativos sobre la tasa $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ promedio en los suelos de textura fina. En los suelos arcillosos bajo pastizal, la aplicación de herbicida aumentó dicha tasa, probablemente a través de un efecto tóxico o inhibidor sobre los microorganismos capaces de reducir el N_2O . En estos suelos bajo uso agrícola la aplicación repetida por años de glifosato puede haber favorecido la presencia de organismos capaces de degradar eficiente y rápidamente dicho pesticida. La aplicación de funguicidas aumentó la tasa $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ en los suelos arcillosas de uso agrícola y no en los de uso pastizal, que se atribuye a una diversidad microbiana y metabólica más acotada, inhibiendo la actividad bacteriana capaz de reducir el N_2O en mayor medida en el suelo agrícola. Por otro lado, los efectos de los pesticidas sobre la $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ fueron independientes de la disponibilidad de N-NO_3^- , que no fue afectada por dichas aplicaciones.

El suelo de textura arenosa agrícola, con menores niveles de C y N, presentó valores de respiración altos y sostenidos durante la incubación, debido a que los

pesticidas fueron escasamente fijados y protegidos en los coloides y estimularon fuertemente las emisiones de CO₂, aceptando parcialmente la segunda hipótesis propuesta.

6. Conclusiones generales y significado

6.1. Conclusiones generales e implicancias para estudios futuros

La determinación simultánea de las emisiones de N_2O y las emisiones totales de N_2O+N_2 por denitrificación permitió abordar de una manera diferente y poco común el estudio de dichas emisiones, relacionándolas con el principal proceso que las genera en los suelos: la denitrificación por organismos heterótrofos. La posibilidad de estimar la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ admitió la posibilidad de comprender si cambios en las emisiones de N_2O ante algún cambio en el ambiente se debían a menores tasas del proceso que le da origen o a diferencias en la composición de las emisiones resultantes. Dicho de otra manera, la determinación de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ permitió relacionar las emisiones de N_2O con el único proceso biológico de eliminación del mismo: su reducción a N_2 . Este enfoque enmarcó todo el trabajo de tesis y contribuyó a la comprensión de los controles de las emisiones de N_2O desde los suelos.

A pesar de las complejas interacciones entre los factores reguladores que gobiernan la denitrificación, el régimen hídrico del suelo se destacó como el principal regulador de las emisiones de N gaseoso, aumentando en todos los casos las emisiones de N_2O+N_2 por denitrificación con aumentos en el tenor hídrico hasta la presencia de agua superficial. Las emisiones de N_2O fueron máximas con contenidos de humedad de 80-100% WFPS, donde las condiciones no fueron lo suficientemente reductoras como para llevar a cabo la transformación completa del N_2O a N_2 . La medición simultánea de las emisiones de N_2O y de N_2O+N_2 por denitrificación permitió demostrar que la presencia de una capa de agua sobrenadante disminuye la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ de las emisiones y afirmar que el efecto limitante de la capa de agua superficial sobre las emisiones de N_2O se deben a un mayor potencial de reducción de dicho gas. Las bajas tasas $N_2O/(N_2O+N_2)$ en forma conjunta con un ambiente más reductor ante la presencia de esta capa de agua superficial confirmaron dicho hallazgo, presumible pero inédito. Con bajos contenidos de humedad, 32-50%WFPS, no hubo efectos significativos de prácticas agronómicas relacionadas a la aplicación de fertilizante nitrogenado o residuos de soja sobre las emisiones de N_2O , lo que permite concluir que la humedad, o la aireación, es un control hegemónico de estas emisiones en suelos agrícolas. Esto implica que cualquier práctica que modifique los niveles de humedad del suelo (irrigación, drenaje, abonos verdes, tipo y longitud del período de barbecho, etc.) probablemente modifique, aún a nivel de micrositio, la existencia y magnitud de las emisiones de N gaseoso.

El efecto de los altos contenidos de humedad sobre las emisiones de N_2O y N_2 desde los suelos es básicamente el efecto de restringir la aireación, reduciendo la disponibilidad del principal y más eficiente aceptor de electrones en los suelos, el oxígeno, y por lo tanto modificando el metabolismo energético de los microorganismos anaerobios facultativos responsables del proceso de denitrificación. El potencial redox del suelo, que expresa la disponibilidad general de electrones del medio estudiado, y a menudo no tomado en cuenta en los estudios de emisiones de gases nitrogenados desde los suelos, fue un control importante de la magnitud de estas emisiones y su composición. La tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ se relacionó significativamente en forma positiva a los valores de Eh de los suelos en los resultados de los capítulos 2 y 4. Sin embargo, a diferencia del capítulo 2 las emisiones de N_2O+N_2 no se relacionaron significativamente a los valores de Eh en el capítulo 4. Esto puede deberse a que los ciclos de saturación-secado implican efectos en el proceso de mineralización del material orgánico que derivan en efectos sobre las tasas de denitrificación, siendo la mineralización afectada en forma claramente diferente a la denitrificación por las condiciones de óxido-reducción del suelo. Se rescata entonces la importancia de la consideración de los controles de los procesos de generación del sustrato de la reacción de denitrificación, esto es NO_3^- y NO_2^- . La respiración de los residuos por los microorganismos no definió las condiciones de óxido reducción en los suelos no

saturados en forma continua, dado que pequeñas cantidades de O_2 tornan al medio oxidante. Del análisis de los resultados de los capítulos donde se analizaron las emisiones de CO_2 en forma conjunta con las emisiones de gases nitrogenados, surge que en ningún caso se registró evidencia fuerte de que las emisiones de N_2O y de N_2 aumentan como consecuencia de una mayor respiración y consumo del O_2 , ni siquiera en los suelos abonados con residuos de soja. Por el contrario, quedó claro que cuando se generan fenómenos de anaerobiosis por la ocupación del 100% de los poros por agua en forma continua, donde la renovación del O_2 es muy lenta, la presencia de residuos aumenta aún más las condiciones de reducción.

La evolución de las emisiones de N_2O desde los suelos, así como la de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ de las emisiones, fueron en general satisfactoriamente explicadas por los tiempos requeridos para la síntesis *de novo* de las enzimas reductasas durante los primeros días de ocurrencia de altos contenidos de humedad, de acuerdo a los hallazgos de Firestone y Tiedje (1979) confirmados por Dendooven y Anderson (1995). Luego de este período, estas emisiones parecieron ser controladas en mayor medida por factores que afectan la actividad de las enzimas formadas, tales como la aireación, los niveles de $N-NO_3^-$ y/o de materia orgánica. Sin embargo, esta distinción se vuelve arbitraria en el caso de factores como la disponibilidad de C o $N-NO_3^-$, que afectan tanto la actividad como la síntesis de las reductasas. Por ejemplo, el aumento de la duración de los períodos de saturación-secado disminuyó la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ debido a una menor ocurrencia de interfases temporales aerobiosis-anaerobiosis, aunque este efecto desapareció ante la presencia de residuos debido a que la disponibilidad de C estimula la formación de enzimas denitrificadoras, adelantando la formación de la enzima óxido-nitroso reductasa y limitando la acumulación inicial de N_2O que ocurre luego de iniciado un fenómeno de anaerobiosis.

La aplicación de fertilizante nitrogenado es la fuente biogénica de N_2O considerada de más rápida manipulación para la mitigación de las emisiones de ese gas. Por ello es vital el entendimiento de cómo los distintos aspectos de su manejo influyen en la producción y consumo del N_2O . El fraccionamiento de la dosis de fertilización nitrogenada no generó cambios importantes en las emisiones de N_2O , con excepción de algunos casos muy puntuales, donde el fraccionamiento limitó dichas emisiones. Este resultado sugiere que esta práctica no sería de mayor utilidad para la mitigación de dichas emisiones desde suelos agrícolas que sufren períodos de muy elevados contenidos de humedad. Las emisiones acumuladas de N_2O y de N_2O+N_2 por denitrificación, en condiciones de altos niveles de humedad, fueron mayores con aplicaciones de fertilizantes a base de $N-NO_3^-$ que con aplicaciones de urea. De hecho, cualquier forma de aplicación de urea en condiciones de alta humedad llevó a emisiones de N_2O bajas y similares a suelos no fertilizados, por lo que se concluye que la naturaleza química del fertilizante aplicado es un factor más relevante que el fraccionamiento de la dosis para mitigar las emisiones de N_2O de suelos que pueden sufrir fenómenos de saturación. Esto constituye un aporte al conocimiento del tema ya que el único trabajo que intentó analizar el efecto del fraccionamiento de la fertilización nitrogenada (Weier, 1999) no consideró el efecto de diferentes fertilizantes nitrogenados y en adición los efectos se confundieron por la acción vegetal. En el presente trabajo no se consideró el importante efecto de la absorción vegetal del N-fertilizante aplicado, debido a que nos enfocamos en el comportamiento del suelo y sus microorganismos. Es probable que el fraccionamiento de la dosis del fertilizante nitrogenado aplicado mejore la eficiencia de absorción del mismo y limite la cantidad de $N-NO_3^-$ disponibles para ser transformados a N_2O , aunque las condiciones de adecuada aireación, que necesitan para el crecimiento la mayoría de los cultivos agrícolas, limiten *per-se* la magnitud de estos efectos sobre las emisiones de gases como el N_2O o el N_2 . Por el contrario, los resultados obtenidos pueden ser aplicados a

situaciones donde el fertilizante es aplicado en suelos sin un activo crecimiento vegetal en forma temporaria, siendo la fertilización a la siembra el ejemplo posible más claro.

La tasa $N_2O / (N_2O + N_2)$ aumentó con la aplicación de fertilizantes nitrogenados, desde 0,2 en suelos control a un promedio general de 0,5 para los suelos fertilizados. Aunque la primera y más sencilla razón que podría esgrimirse para explicar este efecto se centraría en las altas cantidades de $N-NO_3^-$ pos-fertilización que inhiben la reducción del N_2O a N_2 , el principal efecto fue posiblemente a través de la acidez aportada por los fertilizantes nitrogenados, inhibiendo la actividad óxido nitroso-reductasa. Este efecto sería aún de mayor importancia en suelos no saturados, dado que en condiciones de saturación el poder buffer se magnifica y las condiciones de pH de suelos anegados tienden a la neutralidad. Por el contrario, este efecto podría moderarse en suelos ricos en partículas coloidales que brinden una elevada capacidad buffer de pH. De nuevo el fraccionamiento de la dosis no generó una influencia fuerte sobre la tasa $N_2O / (N_2O + N_2)$ bajo las condiciones estudiadas, que implicaron condiciones de alta humedad, y por lo tanto de alta reducción, constituyéndose esta última en el principal factor regulador de la composición de las emisiones de $N_2O + N_2$.

La presencia de residuos de soja en el presente trabajo disminuyó significativamente las emisiones acumuladas de N_2O con respecto a suelos sin residuos, y este efecto fue mediado a través de un mayor potencial de reducción del N_2O formado a N_2 , como se desprende de una menor tasa $N_2O / (N_2O + N_2)$ que los suelos no abonados. Por otra parte, es necesario destacar que nunca pueden descartarse procesos de inmovilización del N mineral cuando se estudia el efecto de la aplicación de residuos de cultivos agrícolas sobre la dinámica de los compuestos de minerales del ciclo del N edáfico. Es claro que estudios en períodos de tiempo mayores, que incluyan ciclos de cultivo completos, e incluso rotaciones, y bajo diferentes sistemas de labranza, pueden dar una idea más cabal de los efectos a largo plazo del manejo de residuos sobre las emisiones de N_2O . Los experimentos llevados a cabo en el presente trabajo de tesis se enfocaron en los momentos iniciales de la aplicación de residuos y la subsiguiente ocurrencia de períodos de alta humedad, constantes o alternados con períodos de secado, para observar los efectos de corto plazo más importantes sobre las emisiones gaseosas de N y la composición de sus productos finales.

La importancia de la cantidad de residuos fue advertida en las influencias significativas de esta en los procesos biológicos que consumen o agotan los NO_3^- del suelo luego de iniciada una situación de anaerobiosis. El agregado al suelo de una alta cantidad de residuos, de aproximadamente el doble de lo que aportan las producciones comerciales, disminuyó notablemente las emisiones gaseosas de N_2O y N_2 por desnitrificación, a través de un fuerte secuestro del N mineral en formas orgánicas, no desnitrificables. Sin embargo, es probable que este efecto sea transitorio, y que pierda importancia en períodos de tiempo mayores al estudiado, una vez que el consumo del C del residuo aproxime la relación C:N de los residuos en descomposición hacia valores más pequeños, relacionados a una mineralización neta del N orgánico. Este efecto ocurrió aún siendo el residuo de soja de baja relación C:N, relación igual a 31 en nuestro caso, y en condiciones de alta humedad. Este resultado permite descubrir la importancia de los residuos en la "protección" por inmovilización del N mineral del suelo, que podría ser importante de esperarse un período de "barbecho limpio" con condiciones de elevada humedad. La incorporación de una cantidad media o "comercial" de residuos permitió importantes pérdidas de N por desnitrificación, pero no mayores a suelos no abonados, aunque el balance entre la desnitrificación y la inmovilización del N mineral podría estar posiblemente condicionado por el nivel inicial de $N-NO_3^-$.

Es conocido que ciclos de saturación-secado aumentan las emisiones de N_2O con respecto a condiciones constantes de saturación. Sin embargo, la medición

conjunta de N_2O+N_2 y de N_2O , y la estimación de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$, en ciclos de saturación-secado es difícil de encontrar en la literatura científica. En el presente trabajo, el estudio simultáneo de las emisiones de N_2O y de N_2O+N_2 por denitrificación permitió identificar que este efecto se debió a emisiones de N_2O+N_2 mayores bajo estos ciclos con respecto a situaciones con contenidos de humedad constantes. De ninguna manera estos resultados niegan que los ciclos de saturación-secado lleven a fluctuaciones en el metabolismo energético de los microorganismos involucrados, alterando la dinámica de la formación de enzimas denitrificadoras; de hecho se observó en ausencia de residuos una mayor tasa en ciclos saturación-secado de 10 días con respecto a ciclos de mayor duración o a condiciones de saturación constante. Otro importante hallazgo es que esta alternancia de períodos contrastantes de humedad presentó efectos más relevantes sobre las emisiones de N_2O y N_2 por denitrificación cuando el suelo presentó residuos susceptibles de atravesar la secuencia descomposición-mineralización-denitrificación, residuos que presentan tiempos de *turn-over* menores que la materia orgánica humificada del suelo. Este hallazgo es de particular importancia dada la ausencia de información previa que analice la importancia del abonado con residuos de cultivos sobre las emisiones gaseosas y la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ en condiciones alternadas de saturación-secado.

Existen en la literatura pocos trabajos que comparen efectos de textura y materia orgánica en condiciones de alta humedad sobre las emisiones de N_2O y de N_2O+N_2 en forma conjunta. Aún cuando existan algunos antecedentes de ello, consideramos vital generar información de estas variables en los suelos más productivos de la Región Pampeana, especialmente en el marco de una tesis doctoral sobre el tema. El sustento de este razonamiento es que más allá de las posibles similitudes entre estos suelos con otros de otras partes del mundo, existen ciertos parámetros ambientales, ecológicos y de manejo, algunos hasta desconocidos o no considerados, que podrían hacer variar las respuestas de las emisiones de N_2O y de N_2O+N_2 . Con respecto a estos grandes grupos de suelo típicos de la Región Pampeana, las mayores emisiones acumuladas de N_2O ocurrieron desde los suelos Argiudoles de textura arcillosa bajo uso agrícola. En los suelos arcillosos del pastizal, los mayores niveles medios de MO coloidal limitaron la denitrificación, debido probablemente a la fijación de $N-NH_4$ en los coloides y a limitación en la difusión ascendente de este ión (y oxidación posterior a NO_3 en la capa aeróbica superficial). El uso del suelo (agrícola vs pastizal) no afectó las emisiones de N_2O y de N_2O+N_2 desde los suelos Hapludoles, debido a los bajos niveles medios de $N-NO_3^-$ en estos suelos, limitando el proceso de denitrificación. Estos conceptos son importantes desde el punto de vista de la fuerte expansión de la agricultura en detrimento de la instalación de pasturas perennes que se ha registrado en la última década en la Región Pampeana. El N_2O también puede ser fuertemente adsorbido en la superficie de los coloides orgánicos, aunque este efecto no fue directamente estudiado en el presente trabajo.

Las mayores emisiones de N_2O y valores de la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ desde los suelos Argiudoles con respecto a los Hapludoles, texturalmente más gruesos, se explicaron básicamente por mayores niveles medios de $N-NO_3^-$ en los primeros, especialmente bajo uso agrícola, inhibiendo con mayor intensidad la actividad de la enzima óxido nitroso-reductasa. Por otro lado, la historia de uso del suelo, o los contenidos de materia orgánica derivados de dicho uso, no parecieron incidir con intensidad en la composición de los productos finales de la denitrificación. Sería de utilidad el estudio de un mayor número de ejemplos dentro de los suelos de la Región Pampeana, y bajo un rango mayor de condiciones de humedad, para confirmar la importancia del control del contenido de N mineral y de C orgánico sobre las emisiones de N_2O .

A pesar de tener fuertes efectos biocidas, la aplicación de un funguicida o del herbicida glifosato produjo escasas variaciones en las emisiones de gases nitrogenados desde los suelos estudiados. Es probable que las bajas dosis que se emplean a campo sean insuficientes para causar efectos significativos que se destaquen de la variabilidad natural de los suelos y sus poblaciones analizadas. En los suelos de textura gruesa bajo uso agrícola continuo, con menores contenidos medios de C y nutrientes asociados, los pesticidas fueron rápidamente metabolizados como fuente de C y probablemente de N y P. La aplicación de pesticidas sólo generó efectos significativos sobre la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ promedio en los suelos de textura fina, aunque es importante considerar que cada biocida generó efectos diferentes de acuerdo al ambiente donde fue aplicado. En los suelos arcillosos bajo pastizal, la aplicación de glifosato aumentó dicha tasa, probablemente a través de un efecto tóxico o inhibidor sobre los microorganismos capaces de reducir el N_2O , mientras que este pesticida no generó efectos significativos sobre esta tasa en suelos agrícolas, con una historia de altos niveles de pulverización con glifosato que puede haber seleccionado organismos capaces de degradar eficientemente dicho pesticida. En estos suelos arcillosos, la aplicación de funguicida aumentó la tasa $N_2O/(N_2O+N_2)$ sólo en suelos bajo uso agrícola, atribuyéndose las diferencias a una menor diversidad catabólica y un consecuente efecto inhibidor sobre la acción de los organismos que reducen el N_2O , con respecto a estos suelos bajo pastizal. Los efectos de otros pesticidas ampliamente usados sobre las emisiones de N_2O son una incógnita que requiere fuertemente de futuras investigaciones. En adición, y dados los resultados obtenidos en los suelos Hapludoles bajo uso agrícola, parece importante registrar también la evolución de otros gases de efecto invernadero tal como el CO_2 , para tener una visión real de las externalidades ambientales que apareja el uso de estos compuestos biocidas.

Existen otras variables ambientales y de manejo que si bien no fueron estudiadas en este trabajo, merecen una consideración especial si se pretende comprender con precisión los factores que afectan las emisiones de gases nitrogenados desde suelos agrícola-ganaderos. Las principales conclusiones extraídas de los resultados se deben enmarcar en condiciones más o menos controladas de temperatura, la que puede jugar un rol fuerte en condiciones de campo. Como todo proceso biológico catalizado por enzimas, la temperatura juega un rol fundamental en la determinación de las tasas de denitrificación y las emisiones de N_2O . El efecto de la temperatura sobre la tasa de $N_2O/(N_2O+N_2)$ de las emisiones ha sido poco estudiado, aunque Keeney et al. (1979), en suelos limosos, y Castaldi et al. (2000), en suelos arenosos, encontraron que aumentos en la temperatura hasta 37 °C podrían incrementar la formación y la emisión del N_2O , mientras que ante aumentos de temperatura el N_2O en general disminuía su participación en los productos finales de la denitrificación. El efecto de prácticas como el sistema de labranza sobre las emisiones N_2O y N_2 han sido estudiadas y se ha concluido que generan influencias ciertas sobre estas emisiones a través del control de la aireación y la consecuente generación de NO_3^- por nitrificación. En un orden menor de jerarquía existe un sinnúmero de prácticas que pueden modificar en forma compleja los principales controles de los procesos generadores de N_2O y N_2 , que deberían ser consideradas y estudiadas en mayor profundidad, como la introducción de organismos promotores del crecimiento vegetal (PGPR) o fijadores de N, diferencias en fechas de siembra o longitud de los ciclos de cultivos, uso de OGM's con uno o más eventos de transgénesis, Agricultura de Precisión, etc.

De los resultados obtenidos en este trabajo de tesis surgen otras conclusiones interesantes que si bien están relacionadas con los controles de las emisiones de N_2O y N_2 , van más allá de ellos. Uno de estos aspectos es la identificación y/o confirmación de la importancia de los procesos responsables de la producción de estos gases. La

variabilidad en las emisiones de N_2O se explicó intensamente con las emisiones de N_2O+N_2 por desnitrificación, lo que sugiere que el proceso de desnitrificación es determinante en la producción de N_2O en las condiciones estudiadas. Las emisiones de N_2O pueden ser evaluadas entonces por la interacción de sus dos componentes: las emisiones totales de N_2O+N_2 por desnitrificación, y la composición de los productos finales de dichas emisiones, representada por la tasa $N_2O/ (N_2O+N_2)$. Procesos de desnitrificación muy intensos o muy lentos, como en los suelos con los tratamientos de humedad de 120 y 40% WFPS respectivamente, fueron especialmente determinantes en las emisiones de N_2O más allá de los productos finales de este proceso.

Del análisis de los resultados de los distintos capítulos se evidenció también que cambios en los niveles de algunos controles como la humedad, la disponibilidad de C y la acidez, generan efectos contrarios sobre los citados componentes. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a estos controles son fundamentalmente diferentes con respecto a su acción sobre la actividad de las enzimas reductasas, responsables últimas de la formación de compuestos nitrogenados gaseosos. Los efectos de la humedad o el C se relacionan claramente a la disponibilidad de electrones o condiciones redox dominantes, mientras que el efecto del pH se asocia a las condiciones óptimas para la actividad enzimática en general que cataliza el intercambio de electrones. El hecho de que aumentos en los contenidos de humedad, C respirable o valores de pH del suelo aumentan las emisiones totales de N_2O+N_2 , pero disminuyen la tasa $N_2O/ (N_2O+N_2)$ provoca que el valor límite de humedad, C o pH a partir del cual las emisiones de N_2O disminuyen es altamente variable y deja claro que cada situación específica debe ser analizada con cautela para determinar el efecto de estos cambios en el balance en las emisiones de N_2O . Por el contrario, mayores contenidos de $N-NO_3^-$, el otro control dominante de las emisiones, aumentan tanto las emisiones de N_2O+N_2 por desnitrificación como la tasa $N_2O/ (N_2O+N_2)$, incrementando inequívocamente las emisiones de N_2O , siempre que las condiciones de aireación sean las adecuadas para la formación y escape de dicho gas.

Otro aspecto interesante es el efecto de condiciones ambientales cambiantes sobre la variabilidad de las emisiones de N_2O y N_2 , intrínsecamente elevada. Con respecto a esta variabilidad de los datos y a la imposibilidad de detectar ciertas diferencias entre los tratamientos impuestos, es importante remarcar que en el estudio de emisiones de gases nitrogenados desde los suelos, el esfuerzo experimental debe apuntarse a un elevado número de repeticiones, dada la fuerte asimetría que surge de muy pocos puntos de elevada actividad desnitrificadora, “hot spots”, y una gran matriz con emisiones apenas detectables. Este inconveniente metodológico se agudiza en condiciones que limitan la acción de los organismos desnitrificadores. Por otro lado, se observó en este trabajo que la variabilidad en las emisiones de N_2O disminuye ante aumentos en las magnitudes de dichas emisiones, por un mayor número de “detecciones” de focos de producción y emisión de tal gas o “hot spots”. Por ejemplo, el capítulo 4 demostró claramente que condiciones ambientales (de humedad) cambiantes, donde se esperaría alta variabilidad en las mediciones, propiciaron las mayores emisiones de N_2O pero la menor variabilidad de dichas emisiones con respecto a situaciones de humedad constantes.

Como complemento de los estudios aquí realizados sería de gran utilidad la aplicación de técnicas de medición de actividad enzimática *in situ* para determinar claramente los efectos de las prácticas agrícolas estudiadas en los parámetros cinéticos de las enzimas de la secuencia desnitrificadora, especialmente de la enzima clave óxido-nitroso reductasa, y en su evolución en el tiempo.

Por último, se considera que los organismos desnitrificadores, al ser bioquímica y taxonómicamente muy diversos, presentan en los suelos *redundancia funcional*, que implica que cambios en la composición de la comunidad microbológica ante algún cambio en el ambiente generan escasas variaciones en su funcionalidad. De este

modo, la biomasa microbiana es considerada una caja negra donde la jerarquía en los controles está encabezada por los factores abióticos estudiados en este trabajo de tesis. Sin embargo, es posible que la determinación de cambios en la composición de la comunidad microbiana, a través de modernas técnicas moleculares, pueda asociarse a cambios en la funcionalidad de dicha comunidad y sus actividades enzimáticas, información que puede contribuir a un entendimiento más cercano de los controles de las emisiones de gases nitrogenados.

6.2. Significado

Las inundaciones han afectado a un vasto sector de la región pampeana en los últimos años, especialmente en el año 2001, en lo que se convirtió en un verdadero estigma para sus pobladores y productores agropecuarios. El reingreso de estas tierras anegadas a la producción luego del drenaje del agua excedente puede ser mejorado a través del conocimiento de las consecuencias que la extendida acumulación de agua produce en las propiedades químicas del suelo.

Desde diversos ámbitos, existe una demanda creciente de información relativa al impacto de las modernas prácticas agrícolas sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos.

El N suele ser un factor limitante principal de la productividad de cultivos y ecosistemas naturales, y la denitrificación puede ser una vía de pérdida de este nutriente muy importante. En adición, la generación de N_2O es una consecuencia ambientalmente relevante del proceso de denitrificación. En los últimos años ha aumentado la importancia dada a la medición de pérdidas bajo determinadas circunstancias de modo que algunas cuantificaciones preliminares de impacto ambiental pudieran ser hechas.

El conocimiento de las transformaciones y pérdidas del N como consecuencia del anegamiento y las elevadas fertilizaciones requeridas por los cultivos de alto potencial genético, permitirá maximizar la eficiencia de recuperación del fertilizante y disminuir los riesgos de perjuicio ambiental. El conocimiento del efecto del N incorporado en forma conjunta con altas cantidades de C en los residuos y de la aplicación de biocidas sobre la actividad biológica en general, y sobre las emisiones gaseosas de N en particular, puede ser de utilidad práctica dado que la producción agropecuaria se enfrenta en forma cotidiana con estos aspectos, que podrían ser manipulados con el fin de lograr formas de producir eficientes y ambientalmente amigables.

Los conocimientos adquiridos serán de utilidad tanto en los sectores productivos, gubernamentales y privados, ya que aportarán herramientas de apoyo a la toma de decisiones y fijación de políticas relacionadas a prácticas agrícolas.

7. Bibliografía general

- Akiyama H.; Tsuruta H. y Watanabe T. 2000. N₂O and NO emissions from soils after the application of different chemical fertilizers. *Chemosphere: Global Change Science* 2: 313-320.
- Alvarez R. 2001. Estimation of carbon losses by cultivation from soils of the Argentine Pampa using the Century model. *Soil Use and Management* 17: 62-66.
- Ambus P. y Jensen E.S. 1997. Nitrogen mineralization and denitrification as influenced by crop residue particle size. *Plant and Soil* 197: 261-270.
- Angers A. y Recous S. 1997. Decomposition of wheat and rye residue as affected by particle size. *Plant and Soil* 189: 197-203.
- Araujo A.S.; Monteiro R.T. y Abarkeli R.B. 2003. Effect of glyphosate on the microbial activity of two brazilian soils. *Chemosphere* 52: 799-804.
- Armstrong W. 1967. The relationship between oxidation-reduction potentials and oxygen-diffusion levels in some waterlogged organic soils. *Journal of Soil Science* 18: 27-34.
- Aulakh M.S.; Rennie D.A. y Paul E.A. 1983. Field studies on gaseous nitrogen losses from soils under continuous wheat versus a wheat fallow rotation. *Plant and Soil* 75: 15-27.
- Aulakh M.S. y Rennie D.A. 1984. Transformations of fall-applied nitrogen-15-labelled fertilizers. *Soil Science Society of America Journal* 48: 1184-1189.
- Aulakh M.S.; Rennie D.A. y Paul E.A. 1984a. Gaseous losses from losses under zero-till as compared to conventional-till management systems. *Journal of Environmental Quality* 13: 130-136.
- Aulakh M.S.; Rennie D.A. y Paul E.A. 1984b. The influence of plant residues on denitrification rates in conventional and zero tilled soils. *Soil Science Society of America Journal* 48: 790-794.
- Aulakh M.S.; Doran J.W.; Walters D.T.; Mosier A.R. y Francis D.D. 1991a. Crop residue type and placement effects on denitrification and mineralization. *Soil Science Society of America Journal* 55: 1020-1025.
- Aulakh M.S.; Doran J.W.; Walters D.T. y Powers J.F. 1991b. Legume residue and soil water effects on denitrification in soils of different textures. *Soil Biology and Biochemistry* 23: 1161-1167.
- Aulakh M.S.; Doran J.W. y Mosier A.R. 1991c. Field evaluation of four methods for measuring denitrification. *Soil Science Society of America Journal* 55: 1332-1338.
- Aulakh M.S.; Khera T.S. y Doran J.W. 2000. Mineralization and denitrification in upland, nearly saturated and flooded subtropical soil. I. Effect of nitrate and ammoniacal nitrogen. *Biology and Fertility of Soils* 31: 162-167.
- Azam F; Müller C.; Weiske A.; Benckiser G. y Ottow J.C.G. 2002. Nitrification and denitrification as sources of atmospheric nitrous oxide - role of oxidizable carbon and applied nitrogen. *Biology and Fertility of Soils* 35: 54-61.
- Balesdent J.; Chenu C. y Balabane M. 2000. Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. *Soil & Tillage Research* 53: 215-230.
- Bandibas J.; Vermoesen A.; De Groot C.J. y Van Cleemput O. 1994. The effect of different moisture regimes and soil characteristics on nitrous oxide emission and consumption by different soils. *Soil Science* 158 (2): 106-114.
- Beauchamp E.G. y Seech A.G. 1990. Denitrification with different sizes of soil aggregates obtained from dry-sieving and from sieving with water. *Biology and Fertility of Soils* 10: 188-193.
- Bergsma T.T.; Robertson G.P. y Ostrom N.E. 2002. Influence of soil moisture and land use history on denitrification end-products. *Journal of Environmental Quality* 31: 711-717.

- Bergstrom D.W.; Tenuta M. y Beauchamp E.G. 2001. Nitrous oxide production and flux from soil under sod following application of different nitrogen fertilizers. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 32 (3-4): 553-570.
- Bertonatti C. y Corcuera J. 2000. Situación Ambiental Argentina: 2000. Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires.
- Betlach M.R. y Tiedje J.M. 1981. Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Applied and Environmental Microbiology* 42: 1074-1084.
- Bijay Singh J.; Ryden C. y Whitehead D.C. 1988. Some relationships between denitrification potential and fractions of organic carbon in air-dried and field-moist soils. *Soil Biology and Biochemistry* 20: 737-741.
- Bijay-Singh J.C.; Ryden J.C. y Whitehead D.C. 1989. Denitrification potential and actual rates of denitrification in soils under long-term grassland and arable cropping. *Soil Biology and Biochemistry* 21: 897-901.
- Blackmer A.M y Bremner J.M. 1976. Potential of soil as a sink for atmospheric nitrous oxide. *Geophysical Research Letters* 3: 739-742.
- Blackmer A.M. y Bremner J.M. 1978. Inhibitory effect of nitrate on reduction of N_2O to N_2 by soil microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 10: 187-191.
- Blackmer A.M. y Bremner J.M. 1979. Stimulatory effect of nitrate on reduction of N_2O to N_2 by soil microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 11: 313-315.
- Blackmer A.M; Bremner J.M. y Schmidt E.L. 1980. Production of nitrous oxide by ammonia-oxidizing chemoautotrophic microorganisms in soils. *Applied and Environmental Microbiology* 40: 1060-1066.
- Bøckman O.C. y Olf H. W. 1998. Fertilizers, agronomy and N_2O . Nutrient cycling in Agroecosystems 52: 165-170.
- Bouwman A.F. 1996. Direct emission of nitrous oxide from agricultural soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 46: 53-70.
- Bremner J.M. 1997. Sources of nitrous oxide in soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 49: 7-16.
- Bromilow R.H.; Evans A.A. y Nicholls P.H. 1999. Factors affecting degradation rates of five triazole fungicides in two soil types: 1. Laboratory incubations. *Pesticide Science* 55: 1129-1134.
- Buerge I.J.; Poiger T.; Müller M.D. y Buser H.R. 2006. Influence of pH on the stereoselective degradation of the fungicides Epoxiconazole and Cyproconazole in soils. *Environmental Science and Technology* 40: 5443-5450.
- Burton D.L. y Beauchamp E.G. 1985. Denitrification rate relationships with soil parameters in the field. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 16: 539-549.
- Busse M.D.; Ratcliff A.W.; Shestak C.J. y Powers R.F. 2001. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1777-1789.
- Cai Z.; Xing G.; Yan X.; Xu H.; Tsuruta H.; Yagi K. y Minami K. 1997. Methane and nitrous oxide emissions from rice paddy fields as affected by nitrogen fertilisers and water management. *Plant and Soil* 196: 7-14.
- Cai Z.; Laughlin R.J. y Stevens R.J. 2001. Nitrous oxide and dinitrogen emissions from soil under different water regimes and straw amendment. *Chemosphere* 42(2001): 113-121.
- Cambardella C.A. y Elliott E.T. 1992. Particulate soil organic-matter changes across a grassland cultivation sequence. *Soil Science Society of America Journal* 56: 777-783.
- Carlisle S.M. y Trevors J.T. 1986. Effect of the herbicide glyphosate on nitrification, denitrification and acetylene reduction in soil. *Water, Air and Soil Pollution* 29: 189-203.

- Carole R.S. y Scarigelli F.P. 1971. Colorimetric determination of nitrate after hydrazine reduction to nitrite. *Microchemical Journal* 16: 657-672.
- Carran R.A.; Theobald P.W. y Evans J.P. 1995. Emission of nitrous oxide from some grazed pasture soils in New Zealand. *Australian Journal of Soil Research* 33: 341-352.
- Cavigelli M.A. y Robertson G.P. 2001. Role of denitrifier diversity of rates of nitrous oxide consumption in a terrestrial ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 297-310.
- Castaldi S. *Responses of nitrous oxide, dinitrogen and carbon dioxide production and oxygen consumption to temperature in forest and agricultural light-textured soils determined by model experiment. Biology and Fertility of Soils* 32: 67-72.
- Chapuis-Lardy L.; Wrage N.; Metay A.; Chotte J.C. y Bernoux M. 2007. *Soils, a sink or N₂O? A review. Global Change Biology* 13: 1-17.
- Choudhary M.A.; Akramkhanov A. y Saggat S. 2001. *Nitrous oxide emissions in soils cropped with maize under long-term tillage under permanent pasture in New Zealand. Soil and Tillage Research* 62: 61-71.
- Chu H.; Hosen Y. y Yagi K. 2007. NO, N₂O, CH₄ and CO₂ fluxes in winter barley field of Japanese Andisol as affected by N fertilizer management. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 330-339.
- Ciampitti I.A.; Ciarlo E.A. y Conti M.E. 2005. Emisiones de óxido nitroso en un cultivo de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]: efecto de la inoculación y de la fertilización nitrogenada. *Ciencia del Suelo* 23: 123-131.
- Ciarlo E.; Conti M. y Ciampitti I. 2006. Emisiones de óxido nitroso: Importancia de los principales agentes edáficos reguladores de la denitrificación. *Revista Facultad de Agronomía* 26 (1): 23-29. ISSN 0325-9250.
- Clayton H.; McTaggart I.P.; Parker J.; Swan L. y Smith K.A. 1997. Nitrous oxide emissions from fertilised grassland: A 2-year study of the effects of N fertiliser form and environmental conditions. *Biology and Fertility of Soils* 25: 252-260.
- Clemens J. y Huschka A. 2001. The effect of biological oxygen demand of cattle slurry and soil moisture on nitrous oxide emissions. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 59: 193-198.
- Conti M.E.; Arrigo N.M. y Marelli H.J. 1997. Relationship of soil carbon light fraction, microbial activity, humic acid production and nitrogen fertilization in the decaying process of corn stubble. *Biology and Fertility of Soils* 25: 75-78.
- Crutzen P.J. 1979. The role of NO and NO₂ in the chemistry of the troposphere and stratosphere. *Annual Reviews on Earth and Planet Science*: 7:443-472
- Curtin D.; Selles F.; Campbell C.A. y Biederbeck V.O. 1994. Canadian prairie agriculture as a source and sink of the greenhouse gases, carbon dioxide and nitrous oxide. Report for Greenhouse Gases Initiative. Agriculture Canada, Swift Current, SK. 66 p.
- Dalal R.C.; Wang W.; Robertson G.P. y Parton W.J. 2003. Nitrous oxide emission from Australian agricultural lands and mitigation options: a review. *Australian Journal of Soil Research* 41: 165-195.
- Dambreville C.; Hénault C.; Bizouard F.; Morvan T.; Chaussod R. y Germon J.C. 2006. Compared effects of long-term pig slurry and mineral fertilization on soil denitrification and its end products (N₂O, N₂). *Biology and Fertility of Soils* 42: 490-500.
- Davidson E.A. 1992. Sources of nitric oxide and nitrous oxide following wetting of dry soil. *Soil Science Society of America Journal* 56: 95-102.
- Davidson E.A. 1993. Soil water content and the ratio of nitrous oxide to nitric oxide emitted from soil. En: R.S. Oremland (Ed). *Biogeochemistry of Global Change – Radiatively Active Trace Gases*. Chapman and Hall, Inc. New York. Pp. 219-235.
- Davidsson T.E. y Leonardson L.G. 1998. Seasonal dynamics of denitrification activity in two water meadows. *Hydrobiologia* 364: 189-198.

Degens B.P.; Schipper L.A.; Sparling G.P. y Duncan L.C. 2001. Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1143-1153.

De Jong E.; Schappert H.J. y MacDonald K.B. 1974. Carbon dioxide evolution from virgin and cultivated soil as affected by management practices and climate. *Canadian Journal of Soil Science*: 54: 299-307.

De Klein C.A.M. y Van Logtestijn R.S.P. 1996. Denitrification in grassland soils in The Netherlands in relation to irrigation, N-application rate, soil water content and soil temperature. *Soil Biology and Biochemistry* 28 (2): 231-237.

Del Prado A.; Merino P.; Estavillo J.M.; Pinto M. y González-Murua C. 2006. N₂O and NO emissions from different N sources and under a range of soil water contents. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 74: 229-243. DOI 10.1007/s10705-006-9001-6

Dendooven L. y Anderson J.M. 1995. Maintenance of denitrification potential in pasture soil following anaerobic events. *Soil Biology and Biochemistry* 27 (10): 1251-1260.

Dendooven L.; Duchateau L. y Anderson J.M. 1996. Gaseous products of the denitrification process as affected by the antecedent water regime of the soil. *Soil Biology and Biochemistry* 28 (2): 239-245.

Dittert K.; Lampe C.; Gasche R.; Butterbach-Bahl K.; Wachendorf M.; Papen H.; Sattelmacher B. y Taube F. 2005. Short-term effects of single or combined application of mineral N fertilizer and cattle slurry on the fluxes of radiatively active trace gases from grassland soil. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 1665-1674.

Dobbie K.E. y Smith K.A. 2001. The effects of temperature, water-filled pore space and land use on N₂O emissions from an imperfectly drained gleysol. *European Journal of Soil Science* 52: 667-673.

Dobbie K.E. y Smith K.A. 2003a. Nitrous oxide emission factors for agricultural soils in Great Britain: the impact of soil water-filled pore space and other controlling variables. *Global Change Biology* 9: 204-218.

Dobbie K.E. y Smith K.A. 2003b. Impact of different forms of N fertilizer on N₂O emissions from intensive grassland. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 67: 37-46.

Doran G.; Eberbach P. y Helliwell S. 2006. The sorption and degradation of the rice pesticides fipronil and thiobencarb on two Australian rice soils. *Australian Journal of Soil Research* 44: 599-610.

Dormaar J.F. y Willms W.D. 2000. A comparison of soil chemical characteristics in modified rangeland communities. *Journal of Range Management* 53: 453-458.

Drury C.F.; Reynolds W.D.; Tan C.S.; Welacky T.W.; Calder W. y McLaughlin N.B. 2006. Emissions of nitrous oxide and carbon dioxide: influence of tillage type and nitrogen placement depth. *Soil Science Society of America Journal* 70: 570-581. doi: 10.2136/sssaj2005.0042.

Ellis S.; Dendooven L. y Goulding K.W.T. 1996. Quantitative assessment of soil nitrate disappearance and N₂O evolution during denitrification. *Soil Biology and Biochemistry* 28(4/5): 589-595.

Ellis S.; Yamulki S.; Dixon E.; Harrison R. y Jarvis S.C. 1998. Denitrification and N₂O emissions from a UK pasture soil following the early spring application of cattle slurry and mineral fertilizer. *Plant and Soil* 202: 15-25.

Elmi A.A.; Madramootoo C.; Hamel C. y Liu A. 2003. Denitrification and nitrous oxide to nitrous oxide plus dinitrogen ratios in the soil profile under three tillage systems. *Biology and Fertility of Soils* 38: 340-348.

Estavillo J.M.; Rodriguez M.; Domingo M.; Muñoz-Rueda A. y Gonzalez-Murúa C. 1994. Denitrification losses from a natural grassland in the Basque Country under organic and inorganic fertilization. *Plant and Soil* 162: 19-29.

Estavillo J.M.; Merino P.; Pinto M.; Yamulki S.; Gebauer G.; Sapek A. y Corré W. 2002. Short term effect of ploughing a permanent pasture on N₂O production from nitrification and denitrification. *Plant and Soil* 239: 253-265.

- Fenn L.B. y Hossner L.R. 1985. Ammonia volatilization from ammonia or ammonium-forming fertilizers. *Advances in Soil Science* 1: 123-169.
- Firestone M.K. y Tiedje J.M. 1979. Temporal change in nitrous oxide and dinitrogen from denitrification following the onset of anaerobiosis. *Applied and Environmental Microbiology* 38: 673-679.
- Firestone M.K. y Davidson E.A. 1989. Microbiological basis of NO and N₂O production and consumption in soil. En: MO.Andrae y D.S. Schimel (eds.). *Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere*. John Wiley and Sons Ltd., New York, pp. 7-21.
- Flessa H. y Beese F. 1995. Effects of sugarbeet residues on soil redox potential and nitrous oxide emission. *Soil Science Society of America Journal* 59: 1044-1051.
- Gale P.M.; Reddy K.R. y Graetz D.A. 1993. Nitrogen removal from reclaimed water applied to constructed and natural wetland microcosms. *Water Environment Research* 65 (2): 162-168.
- Gaskell J.F.; Blackmer A.M. y Bremner J.M. 1981. Comparison of effects of nitrate, and nitric oxide on reduction of nitrous oxide to dinitrogen by soil microorganisms. *Soil Science Society of America Journal* 45: 1124-1127.
- Gerspacher J. y Altosaar I. 2004. Clearing the air: expression of nitrous oxide reductase *in planta*. Abstracts of the Eurosoil 2004, Freiburg, Germany. Pp 43.**
- Giambiagi N.; Rimolo M. y Bianchi B. 1990. Desnitrificación en suelos molisoles de la pradera pampeana. *Ciencia del Suelo* 8 (2): 161-166.
- Gimsing A.L.; Borggaard O.K.; Jacobsen O.S.; Aamand J. y Sorensen J. 2004. Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate mineralization in Danish surface soils. *Applied Soil Ecology* 27: 233-242.
- Ginting D. y Eghball B. 2005. Nitrous oxide emission from no-till irrigated corn: Temporal fluctuation and wheel traffic effects. *Soil Science Society of America Journal* 69: 915-924.
- Granli T. y Bøckman O. 1994. Nitrous oxide from agriculture. *Norwegian Journal of Agricultural Science (Suppl)* 12: 7-128.
- Grant M.A. y Payne W.J. 1982. Effects of pesticides on denitrifying activity in salt marsh sediments. *Journal of Environmental Quality* 11: 369-372.
- Grant R.F.; Juma N.G. y Mc Gill W.B. 1993. Simulation of carbon and nitrogen transformations in soil: mineralization. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 1317-1329.
- Griffiths B.S.; Bonkowski M.; Roy M. y Ritz K. 2001. Functional stability, substrate utilization and biological indicators of soil following environmental impacts. *Applied Soil Ecology* 16: 49-61.
- Groffman P.M. y Tiedje J.M. 1988. Denitrification hysteresis during wetting and drying cycles in soil. *Soil Science Society of America Journal* 52: 1626-1629.
- Groffman P.M. y Tiedje J.M. 1989. Denitrification in north temperate forest soils: spatial and temporal patterns at the landscape and seasonal scales. *Soil Biology and Biochemistry* 21: 613-620.
- Groffman P.M. y Tiedje J.M. 1991. Relationships between denitrification, CO₂ production and air-filled porosity in soils of different texture and drainage. *Soil Biology and Biochemistry* 23 (3): 299-302.
- Groffman P.M.; Altabet M.A.; Böhlke J.K.; Butterbach-Bahl K.; David M.B.; Firestone M.K.; Giblin A.E.; Kana T.M.; Nielsen L.P. y Voytek M.A. 2006. Methods for measuring denitrification: diverse approaches to a difficult problem. *Ecological Applications: Vol. 16*: 2091-2122.
- Grundmann G.L. y Rolston D.E. 1987. A water function approximation to degree of anaerobiosis associated with denitrification. *Soil Science* 144: 437-441.
- Grundmann G.L.; Rolston D.E. y Kachanoski R.G. 1988. Field Soil properties influencing the variability of denitrification gas fluxes. *Soil Science Society of America Journal* 52: 1351-1355.

- Gudelj V.; Galarza C.; Ferrari M.; Senigagliesi C.; Berardo A.; Darwich N. y Echeverría H. 2006. La fertilización en cultivos extensivos de la Región Pampeana Argentina: Aportes del INTA. *Informaciones Agronómicas del Cono Sur* 30: 19-21.
- Hadi A.; Inubushi K.; Purnomo E.; Razie F.; Yamakawa K. y Tsuruta H.. 2000. Effect of land-use changes on nitrous oxide (N₂O) emission from tropical peatlands. *Chemosphere – Global Change Science* 2: 347-358.
- Haney R.L.; Senseman A.; Hons F. y Zuberer D.A. 2000. Effect of glyphosate on microbial activity and biomass. *Weed Science* 48: 89-93.
- Haney R.L.; Senseman A.; Krutz L.J. y Hons F. 2002a. Soil carbon and nitrogen mineralization as affected by atrazine and glyphosate. *Biology and Fertility of Soils* 35: 35-40.
- Haney R.L.; Senseman S.A. y Hons F. 2002b. Effect of roundup ultra on microbial activity and biomass from selected soils. *Journal of Environmental Quality* 31: 730-735.
- Harrison I.; Leader R.U.; Higgo J.J. y Williams G.M. 1998. A study of the degradation of phenoxyacid herbicides at different sites in a limestone aquifer. *Chemosphere* 36: 1211-1232.
- Henault C.; Devis X.; Page S.; Justes E.; Reau R. y Germon J.C. 1998. Nitrous oxide emissions under different soil and land management conditions. *Biology and Fertility of Soils* 26: 199-207.
- Hofstra N. y Bouwman A.F. 2005. Denitrification in agricultural soils: summarizing data and estimating global annual rates. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 72: 267-278.
- Holtan-Hartwig L.; Dörsch P. y Reier Bakken L. 2000. Comparison of denitrifying communities in organic soils: kinetics of NO₃⁻ and N₂O reduction. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 833-843.
- Hong D.; Cai G.; Wang Y. y Chen D. 2002. Nitrification-denitrification loss and N₂O emission from urea applied to crop-soil systems in North China Plain. *Trans. of the 17th World Congress of Soil Science* 14-21, Thailand, August 2002.
- Hutchinson G.L. y Livingston G.P. 2002. Soil-Atmosphere Gas Exchange. En: Dane et al. (eds). *Methods of soil analysis: Part 4. Physical Methods*. SSSA Book Series: 5. SSSA, Madison, WI. ISBN 0-89118-841-x. Pp 1159-1182.
- Huynh H y Feldt LS. Conditions under which mean square ratios in repeated measures designs have exact F-distributions. *Journal of the American Statistical Association* 65: 1582-1589 (1970)
- IPCC 2001. *Climate Change 2001: The scientific basis*. Houghton JT; Ding Y; Griggs DJ; Noguer M; Van der Linden PJ; Dai X (Maskell K, Johnson CA eds.). Cambridge University Press, Cambridge, UK. 94 pp. http://www.grida.no/climate/ipcc_tar/wg1/index.htm.
- Jaworski E.G. 1972. Mode of action of N-phosphonomethyl-glycine inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20: 1195-1198.
- Jenkinson D.S. y Powlson D.S. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 8: 209-213.
- Jenkinson D.S. 1990. An introduction to the global nitrogen cycle. *Soil Use and Management* 6: 56-60.
- Jetten M.S.M. 2001. New pathways for ammonia conversion in soil and aquatic systems. *Plant and Soil* 230: 9-19.
- Jungkunst H.F. 2004. *Black Forest Soils –Sources and Sinks of CH₄ and N₂O-*. PhD Thesis. Universität Hohenheim (310), D-70593, Stuttgart. ISSN 0942-0754.
- Kaiser E.A.; Mueller T.; Joergensen R.G.; Insam H. y Heinemeyer O. 1992. Evaluation of methods to estimate the soil microbial biomass and the relationship with soil texture and organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 24: 675-683.

Kaiser E.A.; Kohrs K.; Kucke M.; Schnug E.; Heinemeyer O. y Munch J.C. 1998. Nitrous oxide release from arable soil: importance of N-fertilization, crops and temporal variation. *Soil Biology and Biochemistry* 30 (12): 1553-1563.

Keeney D.R., Fillery I.R. y Marx G.P. 1979. Effect of temperature on the gaseous nitrogen products of denitrification in silt loam soil. *Soil Science Society of America Journal* 43: 1124-1128.

Khalil M.I.; Boeckx P.; Rosenani A.B. y Van Cleemput O. 2001. Nitrogen transformations and emission of greenhouse gases from three acid soils of humid tropics amended with N sources and moisture regime. II. Nitrous oxide and methane fluxes. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 32 (17-18): 2909-2924.

Khalil M.I.; Rosenani A.B.; Van Cleemput O; Boeckx P.; Shamshuddin J. y Fauziah C.I. 2002. Nitrous oxide production from an ultisol of the humid tropics treated with different nitrogen sources and moisture regimes. *Biology and Fertility of Soils* 36: 59-65.

Khalil M.I. y Baggs E.M. 2005. CH₄ oxidation and N₂O emissions at varied soil water-filled pore spaces and headspace CH₄ concentrations. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 1785-1794.

Khalil K.; Renault P.; Guérin N. y Mary B. 2005. Modelling denitrification including the dynamics of denitrifiers and their progressive ability to reduce nitrous oxide: comparison with batch experiments. *European Journal of Soil Science* 56: 491-504.

Khera T.S.; Aulakh M.S. y Doran J.W. 1999. Significance of soil depth on nitrogen transformations in flooded and nonflooded systems under laboratory conditions. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 54: 209-213.

Khonje D.J.; Varsa E.C. y Klubek. 1989. The acidulation effects of nitrogenous fertilizers on selected chemical and microbiological properties of soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 20: 1377-1395.

Klemedtsson L.; Svensson B.H. y Roswall T. 1988. A method of selective inhibition to distinguish between nitrification and denitrification as sources of nitrous oxide in soil. *Biology and Fertility of Soils* 6:112.119

Knowles R. 1982. Denitrification. En: *Microbiological Reviews* 46(1): 43-70.

Koike I. y Hattori A. 1975. Energy yields and growth of a denitrifying bacterium, *Pseudomonas denitrificans* under aerobic and denitrifying conditions. *Journal of General Microbiology* 88: 1-10.

Kralova M.; Masscheleyo F.H.; Lindau C.W. y Patrick Jr. W.H. 1992. Production of dinitrogen and nitrous oxide in soil suspensions as affected by redox potential. *Water, Air and Soil Pollution* 61: 31-47.

Krutz L.J.; Senseman A. y Haney R.L. 2003. Effect of Roundup Ultra on atrazine degradation in soil. *Biology and Fertility of Soils* 38: 115-118.

Lancaster S.H.; Haney R.L.; Senseman S.A.; Hons F.M. y Chandler J.M. 2006. Soil microbial activity is affected by Roundup WeatherMax and pesticides applied to cotton (*Gossypium hirsutum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 7221-7226.

Letey J.; Valoras N.; Focht D.D. y Ryden J.C. 1981. Nitrous oxide production and reduction during denitrification as affected by redox potential. *Soil Science Society of America Journal* 45: 727-730.

Li C.; Frolking S. y Frolking T.A.1992a. Model of nitrous oxide evolution from soil driven by rainfall events: 1. Model structure and sensitivity. *Journal of Geophysical Research* 97: 9759-9776.

Li C.; Frolking S. y Frolking T.A.1992b. Model of nitrous oxide evolution from soil driven by rainfall events: 2. Model applications. *Journal of Geophysical Research* 97: 9777-9783.

Li X.; Inubushi K. y Sakamoto K. 2002. Nitrous oxide concentrations in an Andisol profile and emissions to the atmosphere as influenced by the application of nitrogen fertilizers and manure. *Biology and Fertility of Soils* 35: 108-113.

- Liang B.C. y Mackenzie A.F. 1997. Seasonal denitrification rates under corn (*Zea mays* L.) in two Quebec soils. *Canadian Journal of Soil Science* 77: 21-25.
- Linn D.M. y Doran J.W. 1984. Effect of water-filled pore on carbon dioxide and nitrous oxide production in tilled and nontilled soils. *Soil Science Society of America Journal* 48: 1267-1272.
- Liu X.; Mosier A.; Halvorson A. y Zhang F. 2006. The impact of nitrogen placement and tillage on NO, N₂O, CH₄ and CO₂ fluxes from a clay loam soil. *Plant and Soil* 280: 177-188.
- Mac Neil M.D. 1983. Choice of a prediction equation and the use of the selected equation in subsequent experimentation. *Journal of Animal Science* 57 (3): 1328-1336).
- Mahmood T.; Tahir G.R.; Malik K.A. y Shamsi S.R.A. 1998. Denitrification losses from an irrigated sandy-clay loam under a wheat-maize cropping system receiving different fertilizer treatments. *Biology and Fertility of Soils* 26: 35-42.
- Malla G.; Bhatia A.; Pathak H.; Prasad S.; Jain N. y Singh J. 2005. Mitigating nitrous oxide and methane emissions from soil in rice-wheat system of the Indo-Gangetic plain with nitrification and urease inhibitors. *Chemosphere* 58: 141-147.
- Mallows C.L. 1973. Some comments on Cp. *Technometrics* 15: 661-664.
- Mathieu O.; Levêque J.; Hénault C.; Milloux M.J.; Bizouard F. y Andreux F. 2006. Emissions and spatial variability of N₂O, N₂ and nitrous oxide mole fraction at the field scale, revealed with ¹⁵N isotopic techniques. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 941-951
- Matson, P.A. y Vitousek, P.M. (1990) Ecosystem approach to a global nitrous oxide budget. *BioScience* 40: 667-672.
- McKenney D.J.; Wang S.W.; Drury C.F. y Findlay W.I. 1993. Denitrification and mineralization in soil amended with legume, grass, and corn residues. *Soil Science Society of America Journal* 57: 1013-1020.
- McSwiney C.P.; McDowell W.H. y Keller M. 2002. Distribution of nitrous oxide and regulators of its production across a tropical rainforest catena in the Luquillo Experimental Forest, Puerto Rico. *European Journal of Soil Science*, 53(3): 265-286.
- McTaggart I.P.; Akiyama H.; Tsuruta H. y Ball B.C. 2002. Influence of soil physical properties, fertilizer type and moisture tension on N₂O and NO emissions from nearly saturated Japanese upland soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 63 (2-3): 207-217.
- McTaggart I.P. y Tsuruta H. 2003. The influence of controlled release fertilizers and the form of applied fertilizer nitrogen on nitrous oxide emissions from an andosol. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 67: 47-54.
- Megonigal J.P.; Patrick Jr. W.H. y Faulkner s.P. 1993. Wetland identification in seasonally flooded forest soils: soil morphology and redox dynamics. *Soil Science Society of America Journal* 57 (1): 140-149.
- Meng L.; Ding W. y Cai Z. 2005. Long-term application of organic manure and nitrogen fertilizer on N₂O emissions, soil quality and crop production in a sandy loam soil. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 2037-2045.
- Menyailo O.V.; Stepanov A.L. y Umarov M.M. 1997. The transformation of nitrous oxide by denitrifying bacteria in Solonchaks. *Pochvovedenie* 1997: 213-215.
- Millar N. y Baggs E.M. 2004. Chemical composition, or quality, of agroforestry residues influences N₂O emissions after their addition to soil. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 935-943.
- Millar N. y Baggs E.M. 2005. Relationships between N₂O emissions and water-soluble C and N contents of agroforestry residues alter their addition to soil. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 605-608.
- Mosier A.R. y Klemedtsson L. 1994. Measuring Denitrification in the Field. En: Weaver et al. (eds). *Methods of soil analysis: Part 2. Microbiological and Biochemical*

Properties. SSSA Book Series: 5. SSSA, Madison, WI. ISBN 0-89118-810-x. Pp 1047-1065.

Mosier A.R.; Duxbury J.M.; Freney J.R.; Heinemeyer O. y Minami K. 1996. Nitrous oxide emissions from agricultural fields: Assessment, measurement and mitigation. *Plant and Soil* 181: 95-108.

Mosier A.R. y Kroeze C. 2000. Potencial impact on the global atmospheric N₂O budget of the increased nitrogen input required to meet future global food demands. *Chemosphere Global Change Science* 2; 465-473.

Mulvaney R.L.; Khan S.A. y Mulvaney C.S. 1997. Nitrogen fertilizers promote denitrification. *Biology and Fertility of Soils* 24: 211-220.

Myers R.H. 1986. *Classical and Modern Regression*. PWS Publishers, Boston, MA. Pp 50-289.

Nelson D.W. y Sommers L.E. 1996. Total Carbon, Organic Carbon and Organic Matter. En: Sparks D.L. et al. (Eds.) *Methods of Soil Analysis*. Part 3. Soil Science Society of America, Madison, WI. Pp:961-1010.

OECD 2000. *Environmental indicators for Agricultura. Methods and Results, Executive Summary 2000*, Paris, Francia. <http://www.oecd.org/dataoecd/0/9/1916629.pdf>.

Olde Venterink H.; Davidsson T.E.; Kiehl K. y Leonardson L. 2002. Impact of drying and re-wetting on N, P and K dynamics in a wetland soil. *Plant and Soil* 243: 119-130.

Otte S.; Grobden N.G.; Robertson L.A.; Jetten M.S. y Kuenen J.G. 1996. Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2421-2426.

Palma R.M.; Rímolo M.; Saubidet M.I. y Conti M.E. 1997. Influence of tillage system on denitrification in maize-cropped soils. *Biology and Fertility of Soils* 25: 142-146.

Parkin T.B.; Sexstone A.J. y Tiedje J.M. 1985. Comparison of field denitrification rates determined by acetylene-based soil core and nitrogen-15 methods. *Soil Science Society of America Journal* 49: 94-99.

Parkin T.B. 1987. Soil microsites as a source of denitrification variability. *Soil Science Society of America Journal* 51: 1194-1199.

Parry S.; Renault P.; Chenu C; y Lensi R. 1999. Denitrification in pasture and cropped soil clods as affected by pore space structure. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 493-501.

Parry S.; Renault P.; Chadeuf J.; Chenu C; y Lensi R. 2000. Particulate organic matter as a source of variation in denitrification in clods of soil. *European Journal of Soil Science* 51: 271-281.

Parton W.J.; Schimel D.S.; Cole C.V. y Ojima D.S. 1987. Analysis of factors controlling soil organic matter levels in Great Plains Grasslands. *Soil Science Society of America Journal* 51: 1173-1179.

Patrick W.H. Jr.; Gambrell R.P. y Faulkner S.P. 1996. Redox Measurement of Soils. En: Sparks D.L. (Ed.) *Methods of Soil Analysis*. Part 3. Soil Science Society of America, Madison, WI. Pp: 1255-1273.

Paul J.W. y Beauchamp E.G. 1989. Effect of carbon constituents in manure on denitrification rates in soil. *Canadian Journal of Soil Science* 69: 49-61.

Pearsall W.H. y Mortimer C.H. 1939. Oxidation and reduction potentials in waterlogged soils, natural waters and muds. *Journal of Ecology* 27: 483-501.

Philippot L.; Kuffner M.; Chêneby D.; Depret G.; Laguerre G. y Martin-Laurent F. 2006. Genetic structure and activity of the nitrate-reducers community in the rizosphere of different cultivars of maize. *Plant and Soil* 287: 177-186.

Picone L.I.; Videla C.C. y García F.O. 1997. Desnitrificación durante el cultivo de trigo en un argiudol típico bajo siembra directa y labranza convencional. *Ciencia del Suelo* 15: 53-58.

- Picone L.I. y Videla C.C. 1998. Relaciones entre la tasa de desnitrificación y el contenido de nitratos, humedad y carbono orgánico soluble del suelo en un cultivo de trigo. *Ciencia del Suelo* 16: 77-82.
- Poth M. y Focht D.D. 1985. ^{15}N kinetic analysis of N_2O production by *Nitrosomonas europaea*: an examination of nitrifier-denitrification. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 1134-1141.
- Qian J.H.; Doran J.W.; Weier K.L.; Mosier A.R.; Peterson T.A. y Power J.F. 1997. Soil denitrification and nitrous oxide losses under corn irrigated with high-nitrate groundwater. *Journal of Environmental Quality* 26: 348-360.
- Ratcliff A.W.; Busse M.D. y Shestak C.J. 2006. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Applied Soil Ecology* 34: 114-124.
- Reddy K.R.; Patrick Jr. W.H. y Phillips R.E. 1980. Evaluation of selected processes controlling nitrogen loss in a flooded soil. *Soil Science Society of America Journal* 44: 1241-1246.
- Reddy K.R. y Patrick Jr. W.H. 1980. Losses of applied Ammonium ^{15}N , Urea ^{15}N , and organic ^{15}N in flooded soils. *Soil Science* 130 (6): 326-330.
- Reddy K.R. y Patrick Jr. W.H. 1984. Nitrogen transformations and loss in flooded soils and sediments. *Critical Reviews in Environmental Control* 13(4): 273-309.
- Richter M. 1980. Mejoras en la determinación de amonio por destilación. *Revista Facultad de Agronomía* 1: 1-9.
- Ritchie G.A. y Nicholas D.J. 1972. Identification of the sources of nitrous oxide produced by oxidative and reductive processes in *Nitrosomonas europaea*. *Biochemical Journal* 126: 1181-1191.
- Robertson G.P.; Paul E.A. y Harwood R.R. 2000. Greenhouse gases in intensive agriculture: Contributions of individual gases to the radiative forcing of the atmosphere. *Science* 289: 1922-1925.
- Rodríguez M.B. y Giambiagi N. 1995. Denitrification in tillage and no tillage pampean soils: relationships among soil water, available carbon, and nitrate and nitrous oxide production. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 26 (19&20): 3205-3220.
- Rodríguez M. 1997. Influencia de las labranzas y la fertilización nitrogenada en la desnitrificación de un Argiudol típico de la Pampa Ondulada. Tesis de Maestría, Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.
- Roslycky I. 1982. Glyphosate and the response of the soil microbiota. *Soil Biology and Biochemistry* 14: 87-92.
- Rudaz A.O.; Wälti E.; Kyburz G.; Lehmann P. y Fuhrer J. 1999. Temporal variation in N_2O y N_2 fluxes from a permanent pasture in Switzerland in relation to management, soil water content and soil temperature. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 73: 83-91.
- Ryden J.C.; Lund J. y Focht D.D. 1979a. Direct measurement of denitrification loss from soils: I. Laboratory evaluation of acetylene inhibition of nitrous oxide reduction. *Soil Science Society of America Journal* 43: 104-110.
- Ryden J.C.; Lund J.; Letey J. y Focht D.D. 1979b. Direct measurement of denitrification loss from soils: II. Development and application of field methods. *Soil Science Society of America Journal* 43: 110-118.
- Ryden J.C.; Skinner J.H. y Nixon D.J. 1987. Soil core incubation system for the field measurement of denitrification using acetylene-inhibition. *Soil Biology and Biochemistry* 19(6): 753-757.
- Sainz Rozas H.R.; Echeverría H.E. y Picone L.I. 2001. Denitrification in Maize under no-tillage: Effect of nitrogen rate and application time. *Soil Science Society of America Journal* 65: 1314-1323.

- Sainz Rozas HR.; Echeverría H.E. y Barbieri P.A. 2004. Pérdidas por desnitrificación en un suelo bajo siembra directa en función de la presencia de plantas de maíz y de la dosis de nitrógeno. *Ciencia del Suelo*. 22: 27-35.
- SAS Institute Inc. 1985. *User's guide: statistics*. 5th ed. SAS Inst., Cary, NC.
- Schlegel H.G. 1992. *Allgemeine Mikrobiologie*. 7th ed. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Schnurer Y.; Persson P.; Nilsson M.; Nordgren A. y Giesler R. 2006. Effects of surface sorption on microbial degradation of glyphosate. *Environmental Science and Technology* 40: 4145-4150.
- Schroll R.; Becher H.H.; Dörfler U.; Gayler S.; Grundmann S.; Hartmann H.P. y Ruoss J. 2006. Quantifying the effect of soil moisture on the aerobic microbial mineralization of selected pesticides in different soils. *Environmental Science and Technology* 40: 3305-3312.
- Shapiro S.S. y Wilk M.B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biométrica* 52: 591-611.
- Sheals J.; Sjöberg S. y Persson P. 2002. Adsorption on glyphosate on goethite: molecular characterization of surface complexes. *Environmental Science and Technology* 36: 3090-3095.
- Shelton D.R.; Sadeghi A.M.; McCarty G.W. e Isensee A.R. 1997. A soil core method for estimating N-mineralization and denitrification during cover crop decomposition. *Soil Science* 162 (7): 510-517.
- Shelton D.R.; Sadeghi A.M. y McCarty G.W. 2000. Effect of soil water content on denitrification during cover crop decomposition. *Soil Science* 165 (4): 365-371.
- Shepherd M.F.; Barzetti S. y Hastie D.R. 1991. The production of atmospheric NO_x and N₂O from a fertilized agricultural soil. *Atmospheric Environment* 25A: 1961-1969.
- Simek M. 1999. The response of denitrifiers in a sandy loam soil affected by a long-term fertilization to organic carbon and nitrate. *Folia Microbiology* 44(1): 85-89.
- Simek M. y Cooper J.E. 2001. Nitrogen use efficiency in temperate zone arable lands. En: Shiyomi y Koizumi (eds.). *Structure and function in agroecosystem design and management*. ISBN 0-8493-0904-2. CRC Press LLC. Boca Raton, Florida. Pp: 227-250.
- Singh N. 2005. Factors affecting Triadimefon degradation in soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 70-75.
- Singh R.P. y Ghildyal B.P. 1980. Soil submergence effects on nutrient uptake, growth and yield of five corn cultivars. *Agronomy Journal* 72: 737-741.
- Singh R.P. y Kumar R. 2000. Evaluation of the effect of surfactants on the movement of pesticides in soils using a soil thin-layer chromatography technique. *Soil and Sediment Contamination* 9: 407-423. doi: 10.1080/10588330091134329.
- Skiba U.; Smith K.A. y Fowler D. 1993. Nitrification and denitrification as sources of nitric oxide and nitrous oxide in a sandy loam soil. *Soil Biology and Biochemistry* 25 (11): 1527-1536.
- Smith C.J.; Wright M.F. y Patrick Jr. W.H. 1983. The effect of soil redox potential and pH on the reduction and production of nitrous oxide. *Journal of Environmental Quality* 12: 186-188.
- Smith K.A. 1990. Anaerobic zones and denitrification in soil: modelling and measurement. En: Revsbech N.P. y Sørensen J. (eds.). *Denitrification in Soil and Sediment*. Plenum Press, New York. Pp.: 229-244.
- Smith K.A. y Arah J.R.M. 1992. Measurement and modelling of nitrous oxide emissions from soils. *Ecological Bulletins* 42: 116-123.
- Smith K.A. 1997. The potential for feedback effects induced by global warming on emissions of nitrous oxide by soils. *Global Change Biology* 3: 327-338.

- Smith K.A.; McTaggart I.P. y Tsuruta H. 1997. Emissions of N₂O and NO associated with nitrogen fertilization in intensive agriculture, and the potential for mitigation. *Soil Use and Management* 13: 296-304.
- Smith K.A.; Thomson P.E.; Clayton H.; McTaggart I.P. y Conen F. 1998. Effects of temperature, water content and nitrogen fertilisation on emissions of nitrous oxide by soils. *Atmospheric Environment* 32(19): 3301-3309.
- Smith M.S. 1982. Dissimilatory reduction of NO₂⁻ to NH₄⁺ or N₂O by a soil *Citrobacter* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 43: 854-860.
- Snyder C. 2006. Fertilizer BMPs for cotton in the Midsouth. *Better Crops* 2:7-9.
- Spokas K.; Wang D. y Venterea R. 2005. Impact of soil fumigation with chloropicrin and methyl isothiocyanate on greenhouse gases. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 475-485.
- Spokas K.; Wang D.; Venterea R. y Sadowsky M. 2006. Mechanisms of N₂O production following chloropicrin fumigation. *Applied Soil Ecology* 31 (1-2): 101-109.
- Stehfest E. y Bouwman L. 2006. N₂O and NO emission from agricultural fields and soils under natural vegetation: summarizing available measurement data and modeling of global annual emissions. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 74: 207-228. DOI 10.1007/s10705-006-9000-7
- Stevens R.J. y Laughlin R.J. 1998. Measurement of nitrous oxide and di-nitrogen emissions from agricultural soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 52: 131-139.
- Stevens R.J. y Laughlin R.J. 2001. Cattle slurry affects nitrous oxide and dinitrogen emissions from fertilizer nitrate. *Soil Science Society of America Journal* 65: 1307-1314.
- Stratton G.W. 1990. Effects of the herbicide glyphosate on nitrification in four soils from Atlantic Canada. *Water, Air and Soil Pollution* 51: 373-383.
- Stratton G.W. y Stewart K.E. 1991. Effects of the herbicide glyphosate on nitrogen cycling in an acid forest soil. *Water, Air and Soil Pollution* 60: 231-247.
- Strong D.T. y Fillery I.R.P. 2002. Denitrification response to nitrate concentrations in sandy soils. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 945-954.
- Tanco R. y Kruse E. 2001. Prediction of seasonal water-table fluctuations in La Pampa and Buenos Aires, Argentina. *Hydrogeology Journal* 9: 339-347.
- Tenuta M. y Beauchamp E.G. 2000. Nitrous oxide production from urea granules of different sizes. *Journal of Environmental Quality* 29: 1408-1413.
- Thomas G.W. 1996. Soil pH and Soil Acidity. En: Sparks D.L. (Ed.) *Methods of Soil Analysis. Part 3..* Soil Science Society of America, Madison, WI. Pp:475-490
- Tiedje J.M.; Sextone A.J.; Myrold D.D. y Robinson J.A. 1982. Denitrification: Ecological niches, competition and survival. *Antonie Van Leeuwenhoek* 48: 569-583.
- Tiedje J.M.; Sextone A.J.; Parkin T.B.; Revsbech N.P. y Shelton D.R. 1984. Anaerobic processes in soil. *Plant and Soil* 6: 197-212.
- Tiedje J.M. 1988. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. En: *Biology of anaerobic microorganisms*. A.J.B. Zehnder (ed.). Wiley and Sons, Ltd, New York. Pp. 179-244.
- Tiedje J.M.; Simkins S. y Groffman P.M. 1989. Perspectives on measurement of denitrification in the field including recommended protocols for acetylene based methods. *Plant and Soil* 115: 216-284.
- Tiedje J.M. 1994. Denitrifiers. En: Weaver R.W., Angle J.S. y Bottomley P.S. (eds). *Methods of soil analysis: Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. SSSA Book Series: 5. SSSA, Madison, WI. ISBN 0-89118-810-x. Pp 245-267.
- Tietema A.; van der Lee G.E.M.; Bouten W.; Rappoldt C. y Verstraten J.M. 2007. The production of N₂O in Douglas fir litter as affected by anoxic conditions within litter particles and pores. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 239-248.

- Toni L.R.M.; De Santana H. y Zaia D.A.M. 2006. Adsorption of glyphosate on soils and minerals. *Quimica Nova* 29: 829-833.
- Turner F.T. y Patrick W.H. Jr. 1965. Chemical changes in waterlogged soils as a result of oxygen depletion. En: J.W. Holmes (ed) *Transactions of the 9th Congress of Soil Science*, Adelaida, Nueva York. Pp 53-65.
- Updegraff K.; Pastor J.; Bridgham S.D. y Johnston C.A. 1995. Environmental and substrate controls over carbon and nitrogen mineralization in northern wetlands. *Ecological Applications* 5: 151-163.
- Uricarriet S. y Lavado R.S. 1999. Indicadores de deterioro en suelos de la Pampa Ondulada. *Ciencia del Suelo* 17 (1): 37-44.
- Van Kessel C.; Pennock D.J. y Farrell R.E. 1993. Seasonal variations in denitrification and nitrous oxide evolution at the landscape scale. *Soil Science Society of America Journal* 57: 988-995.
- Venterea R.T.; Burger M. y Spokas K.A. 2005. Nitrogen oxide and methane emissions under varying tillage and fertilizer management. *Journal of Environmental Quality* 34: 1467-1477.
- Vermoesen A.; de Groot C.; Nollet L.; Boeckx P. y van Cleemput O. 1996. Effect of ammonium and nitrate application on the NO and N₂O emission out of different soils. *Plant and Soil* 181: 153-162.
- Wang F.L. y Bettany J.R. 1995. Carbon and nitrogen losses from undisturbed soil columns under short-term flooding conditions. *Canadian Journal of Soil Science* 75: 333-341.
- Wang W.J.; Chalk P.M.; Chen D. y Smith C.J. 2001. Nitrogen mineralisation, immobilisation and loss, and their role in determining differences in net nitrogen production during waterlogged and aerobic incubation of soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1305-1315.
- Webb J.; Ellis S.; Harrison R. y Thorman R. 2004. Measurement of N fluxes and soil N in two arable soils in the UK. *Plant and Soil* 260: 253-270.
- Weed Science Society of America 2002. Glyphosate. En: *Herbicide Handbook*. 8th edition. WSSA, Lawrence, KS, USA. Pp. 231-234.
- Weier K.L.; Doran J.W.; Power J.F. y Walters D.T. 1993. Denitrification and the dinitrogen/nitrous oxide ratio as affected by soil water, available carbon, and nitrate. *Soil Science Society of America Journal* 57: 66-72.
- Weier K.L. 1999. N₂O and CH₄ emission and CH₄ consumption in a sugarcane soil after variation in nitrogen and water application. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 1931-1941.
- Weitz A.M.; Linder E.; Froelking S.; Crill P.M. y Keller M. 2001. N₂O emissions from humid tropical agricultural soils: effects of soil moisture, texture and nitrogen availability. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1077-1093.
- Williams D. L., Ineson P. y Coward P.A. 1999. Temporal variations in nitrous oxide fluxes from urine-affected grassland. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 779-788.
- Wolsing M. y Priemé A. 2004. Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFPL of nir gene fragments. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 261-271.
- Wrage N.; Velthof G.L.; Van Beusichem M.L. y Oenema O. 2001. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1723-1732.
- Xu Y.C.; Shen Q.R.; Li M.L.; Dittert K. y Sattelmacher B. 2004. Effect of soil water status and mulching on N₂O and CH₄ emission from lowland rice field in China. *Biology and Fertility of Soils* 39: 215-217.

- Yan X.; Du L.; Shi S. y Xing G. 2000. Nitrous oxide emission from wetland rice soil as affected by the application of controlled-availability fertilizers and mid-season aeration. *Biology and Fertility of Soils* 32: 60-66.
- Yeomans J. C. y Bremner J. M. 1985. Denitrification in soil: Effects of herbicides. *Soil Biology and Biochemistry* 17: 447-452.
- Yoshinari T.; Hynes R. y Knowles R. 1977. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction and measurement of denitrification and nitrogen fixation in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 9: 177-183.
- Zabaloy M.C. y Gómez M. A. 2005. Diversity of Rhizobia isolated from an agricultural soil in Argentina based on carbon utilization and effects of herbicides on growth. *Biology and Fertility of Soils* 42: 83-88.
- Zhang Y. y Scherer H.W. 2000. Mechanisms of fixation and release of ammonium in paddy soils after flooding. II. Effect of transformation of nitrogen forms on ammonium fixation. *Biology and Fertility of Soils* 31: 517-521.
- Zumft W.G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiological and Molecular Biology Reviews* 61: 553-568.