

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EFFECTO DE UN INHIBIDOR DE LA NITRIFICACIÓN SOBRE
LAS EMISIONES DE ÓXIDO NITROSO (N₂O) DESDE SUELOS
EN CONDICIONES DE PASTOREO**

por

Pablo Andrés TORRES ASTETE

TESIS presentada como uno
de los requisitos para obtener
el título de Magíster en
Ciencias Agrarias
Opción Ciencias del Suelo

**MONTEVIDEO
URUGUAY
(MAYO 2019)**

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Ing. Agr. Dra. Lucía Salvo, Ing. Agr. PhD. Amabelia del Pino, y Ing. Agr. Dra. Pilar Irisarri, el (día) de (mes) de (2019). Autor/a: Ing. Agr. Pablo Torres. Directora: Dr. Verónica Ciganda. Co-directora: Dr. María Teresa Federici

AGRADECIMIENTOS

A Verónica Ciganda y María Teresa Federici, por toda la paciencia y ayuda que brindaron para terminar mi tesis.

A Julieta Mariotta.

A INIA por darme la oportunidad de poder trabajar y realizar mi tesis.

A la ANII por la beca otorgada para poder realizar mi tesis.

A toda mi familia, especialmente a Graciana y Antonia.

TABLA DE CONTENIDO

	página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTO.....	III
RESUMEN.....	VII
SUMMARY.....	VIII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. ANTECEDENTES	2
1.1.1. Calentamiento global y gases efecto invernadero	2
1.1.2. El óxido nitroso como gas de efecto invernadero	4
1.1.3. Emisiones de N₂O desde el suelo	4
1.1.3.1. Nitrificación	6
1.1.3.2. Desnitrificación	6
1.1.4. Ciclaje del N en sistemas de producción pastoriles	7
1.1.4.1. Características de las manchas de orina	8
1.1.4.2. Efecto de la orina en las propiedades químicas del suelo	10
1.1.4.3. Efecto de las manchas de orina sobre los microorganismos del suelo	11
1.1.4.4. Efecto de la orina sobre la pastura	14
1.1.5. Estrategias para la mitigación de las emisiones de N₂O ...	15
1.1.5.1. Inhibidores de la nitrificación	15
1.1.5.2. Manejo de la dieta animal	17
1.1.6. Emisiones de gases efecto invernadero en Uruguay	19
1.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	22
1.2.1. Hipótesis	22
1.2.2. Objetivos	22
1.2.2.1. Objetivos específicos	22

2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	23
2.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	23
2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y TIPO DE CÁMARA UTILIZADA.....	23
2.3. COLECTA Y ANÁLISIS DE ORINA.....	25
2.4. MUESTREO DE N ₂ O.....	26
2.5. CÁLCULO DEL FLUJO DIARIO, ACUMULADO DE N ₂ O Y FACTOR DE EMISIÓN.....	26
2.6. ANÁLISIS DEL SUELO Y DE LA PASTURA.....	27
2.7. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA MICROBIANA DEL SUELO.....	28
2.7.1. <u>Extracción de ADN y amplificación del gen ADNr</u> <u>16S</u>	28
2.7.2. <u>Análisis de patrones de bandas (DGGE)</u>	29
2.7.2.1. Análisis multivariado.....	30
2.7.2.2. Índices de diversidad.....	30
2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
3. <u>RESULTADOS</u>	32
3.1. DATOS METEOROLÓGICOS.....	32
3.1.1. <u>Precipitación y temperatura</u>	32
3.1.2. <u>Contenido volumétrico de agua y temperatura del suelo</u>	32
3.2. NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ , N TOTAL y pH DEL SUELO.....	34
3.3. CONTENIDO DE N Y RENDIMIENTO DE LA PASTURA.....	42
3.4. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LAS VARIABLES DEL SUELO Y DE LA PASTURA.....	45
3.5. EMISIONES DE N ₂ O.....	47
3.6. ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD BACTERIANA DEL SUELO.....	52
4. <u>DISCUSIÓN</u>	57
5. <u>CONCLUSIONES</u>	70
6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	72

7. <u>EFFECTO DEL DCD (DICIANDIAMIDA) SOBRE LAS EMISIONES DE</u> <u>ÓXIDO NITROSO (N₂O) DESDE SUELOS EN CONDICIONES DE</u> <u>PASTOREO.....</u>	87
--	----

RESUMEN

En sistemas de producción pastoril, las deposiciones de orina de los rumiantes son la principal fuente de N mineral en la generación de N_2O desde el suelo. Esto se debe a que entre el 60% y el 95% del N ingerido desde la pastura retorna al suelo como N-ureico a través de la orina. Este estudio tiene como objetivo cuantificar el efecto de un inhibidor de la nitrificación, Diciandiamida (DCD) sobre las emisiones de N_2O provenientes de la orina de bovinos en condiciones de pastoreo. El trabajo se llevó a cabo en la estación experimental de INIA-La Estanzuela, Colonia, Uruguay. Se instalaron dos experimentos a campo, uno sobre una pastura nativa degradada de bajo contenido proteico (PBN) y otro sobre una mezcla de festuca y alfalfa, de alto contenido proteico (PAN). El diseño experimental utilizado fue de bloques completos al azar con cuatro repeticiones y tres tratamientos utilizando la metodología de cámaras estáticas de flujo cerrado. Los tres tratamientos fueron: Control, sin aplicación de orina (Control), aplicación de orina bovina (Orina), y orina con el inhibidor de la nitrificación (Orina+DCD). Las emisiones de N_2O , el $N-NO_3^-$, $N-NH_4^+$ y el pH del suelo, así como la biomasa y contenido de N vegetal fueron monitoreados durante un año luego de la aplicación de los tratamientos. La estructura de la comunidad microbiana se evaluó mediante DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) del gen 16S ADNr. Los resultados indican que los máximos flujos de N_2O ocurrieron dentro de los 50 días después de la aplicación de la orina, siendo mayores en la PBN. Si bien las diferencias no fueron significativas, la aplicación de DCD mostró valores de emisiones de N_2O un 32 % inferiores en la PAN y un 31 % en el PNB, respecto a la aplicación de orina sin inhibidor. La aplicación de Orina y de Orina+DCD no generó cambios en la estructura de bacterias del suelo. Los resultados sugieren que el uso del DCD permitiría mitigar las emisiones de N_2O originadas en las manchas de orina bovina en condiciones de pastoreo.

Palabras clave: Óxido nitroso, Orina bovina, Diciandiamida

EFFECT OF A NITRIFICATION INHIBITOR ON NITROUS OXIDE (N₂O) EMISSIONS FROM SOILS IN GRAZING CONDITIONS

SUMMARY

In pastoral production system, the ruminant urine depositions are the main source of mineral N in the generation of N₂O from the soil. This is because between 60% and 95% of N consumed from the pasture returns to soil as ureic-N through the urine. The aim of this study was to determine the effect of a nitrification inhibitor, dicyandiamide (DCD), on N₂O emissions from bovines urine patches under grazing conditions. The experiment was conducted at the experimental station INIA- La Estanzuela, Colonia, Uruguay. Two field experiments were installed, one over a degraded native pasture of low protein content (PBN), and another over a cultivated pasture (Fescue-Lucerne), of high protein content (PAN). The experimental design used was a randomized complete blocks with four replications and three treatments using the methodology of closed flow static cameras. The three treatments were: Control, without application of urine (Control), application of bovine urine (Urine) and urine with the nitrification inhibitor (Urine+DCD). The emissions of N₂O, the NO₃⁻, N-NH₄⁺ and the pH of soil, as well as the biomass and content of vegetal nitrogen were monitored for one year after the application of the treatments. The structure of the microbial community was evaluated by DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) of the gen 16S rDNA. The results indicate that the maximum flows of N₂O occurred within 50 days after the application of urine, being older in the PBN. Although the differences were not significant, the application of DCD showed values of N₂O emissions 32% lower in the PAN and 31% in the PBN, with respect to the application of urine without the inhibitor. The application of Urine and Urine+DCD did not generate changes in the structure of soil bacteria. The results suggest that the use of DCD would mitigate the N₂O emissions originated in bovine urine stains under grazing conditions.

Keywords: Nitrous oxide, Bovine urine, Dicyandiamide

1. INTRODUCCIÓN

El calentamiento global del planeta causado por las emisiones de gases efecto invernadero (GEI), y sus efectos sobre el cambio y la variabilidad climática, se ha constituido en una de las preocupaciones ambientales más importantes de la actualidad. La presencia de GEI representa menos del 1 % del volumen total del aire seco en la atmósfera. Sin embargo, estos tienen un importante rol en la cantidad de energía que la tierra puede absorber y re-emitir como radiación infrarroja (IR) desde la superficie, previniendo su pérdida hacia la atmósfera (IPCC, 2013).

La actividad agropecuaria mundial es responsable del 14 % de las emisiones globales de GEI, siendo el dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) y óxido nitroso (N_2O) los principales gases emitidos (IPCC, 2013). En el caso del N_2O , la actividad agropecuaria mundial es responsable del 60% de la emisión global de este gas (Smith et al., 1997). Sin embargo, en Uruguay el N_2O es producido casi en su totalidad por la actividad agropecuaria (90,1%), contribuyendo la ganadería en más del 80 % (MVOTMA, 2017).

Las emisiones nacionales reportadas periódicamente basan gran parte de sus cálculos en factores de emisión (FE) universales recomendadas por el Panel Intergubernamental para el Cambio Climático (IPCC). Dado que los principales factores del suelo que controlan las emisiones de N_2O son variables locales como la disponibilidad de N, humedad, temperatura, textura, % carbono y pH, así como la calidad de la pastura ingerida, es necesario cuantificar y generar factores de emisión propios de N_2O , que permitan demostrar la real contribución de la agricultura de nuestro país a las emisiones de GEI globales.

En sistemas de producción ganadera de base pastoril, como en Uruguay, se estima que > 80 % del nitrógeno (N) ingerido de la pastura retorna al suelo a través de la deposición de orina y heces, mientras que el restante 20% es retenido y utilizado por el animal (Bolan et al., 2004). Además, se ha reportado una relación lineal y directa entre el N consumido en la dieta y el

contenido de N en las excreciones, encontrándose mayoritariamente en la orina en forma de urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) (Dijkstra et al., 2013). Una vez que la urea es depositada en el suelo, puede ser una fuente importante de emisión de N_2O a través de los procesos microbianos de nitrificación y desnitrificación (Guo et al., 2013). La desnitrificación es el proceso que se considera como una fuente mucho más potente de N_2O que la nitrificación desde suelos bajo praderas (Luo et al., 2010).

La utilización de inhibidores de la nitrificación, como la dicianidamida (DCD) ha sido planteada y evaluada como una herramienta efectiva para mitigar las emisiones de N_2O (Clough et al., 2007; Zaman et al., 2008). En otros países, existen estudios del impacto ambiental de la aplicación de DCD sobre la emisión de N_2O desde suelos pastoriles, pero existen pocos estudios sobre el impacto del DCD sobre las comunidades microbianas del suelo (Wakelin et al., 2013).

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. Calentamiento global y gases efecto invernadero

La radiación emitida desde el sol es la principal fuente de energía para la tierra y es la que condiciona el clima a nivel global. Aproximadamente la mitad de la energía de la radiación solar se ubica dentro del espectro visible mientras que el resto es principalmente radiación infrarroja cercana y ultravioleta. Alrededor del 31 % de esta energía es parcialmente re-emitida hacia el espacio por nubes, aerosoles o reflejada por la superficie de la tierra (nieve, hielo, desiertos) (Kiehl y Trenberth, 1997). El resto de esta energía es absorbida principalmente por la superficie terrestre (tierra y océanos). La energía absorbida por las distintas capas de vegetación permite que sucedan los procesos de evapotranspiración, fotosíntesis, asimilación de C, y la energía remanente que pasa a través de las distintas capas controla la evaporación del suelo, el derretimiento de la nieve y otros procesos que

involucran cambios en la temperatura. Gran parte de la radiación térmica emitida desde el suelo y océanos es absorbida en la atmósfera por nubes y otros componentes gaseosos que regresan la radiación hacia la tierra. Estos componentes gaseosos son los llamados GEI, ya que emiten y absorben radiación con una longitud de onda específica dentro del espectro de la radiación infrarroja. Parte de la radiación re-irradiada por los GEI es absorbida por la superficie de la tierra elevando la temperatura de la superficie terrestre. Los gases más importantes que causan el efecto invernadero son el vapor de agua (H_2O), dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), óxido nitroso (N_2O) y ozono (O_3). (IPCC, 2013).

El intercambio de energía entre la superficie de la tierra y la atmósfera permite mantener la temperatura global cerca de la superficie en un promedio de 14°C (Kiehl y Trenberth, 1997). Las concentraciones atmosféricas de GEI han cambiado naturalmente a través de la historia de la tierra. Sin embargo, actividades antropogénicas en la era postindustrial han resultado en un aumento en la emisión de los cuatro GEI mencionados, CO_2 , CH_4 , N_2O , O_3 (Conrad, 1996). Además, GEI artificiales, generalmente considerados como gases con un alto índice de potencial de calentamiento global (HFC, PFC y SF_6), se han acumulado en la atmósfera a partir de la revolución industrial (Graedel y Keene, 1995).

El índice de potencial de calentamiento global (GWP, *Global-warming potential por su sigla en inglés*) se basa en la capacidad de los gases para contribuir al efecto invernadero. Las características del gas que determinan este potencial son la capacidad de absorción de radiación infrarroja y el tiempo de vida media en la atmósfera (IPCC, 2013).

El CH_4 contribuye en un 15% y el N_2O en un 6% al efecto invernadero, ocupando estos gases el segundo y tercer lugar en importancia como GEI después del CO_2 . Para poder comparar los flujos de CH_4 y N_2O , estos son expresados en equivalentes de $\text{CO}_2\text{-C}$. El CH_4 y el N_2O tienen, respectivamente, un potencial de calentamiento global de 23 y 298 veces mayor que el CO_2 en un período de 100 años (IPCC, 2013).

1.1.2. El óxido nitroso como gas de efecto invernadero

El N_2O es un compuesto nitrogenado químicamente estable, que persiste en la atmósfera por 118 años (Prather and Hsu, 2010). De acuerdo con lo reportado por el IPCC (2013), los suelos bajo condiciones naturales, los océanos y la atmósfera son responsables de la emisión de 6,6, 3,8 y 0,6 Tg N_2O -N año⁻¹, respectivamente. En el mismo informe se reportó que las emisiones de origen antropogénico son estimadas en 6,7 Tg N_2O -N año⁻¹, siendo la agricultura responsable de la emisión de 2,8 Tg N_2O -N año⁻¹ y las emisiones asociadas a combustibles fósiles, actividad industrial, quema de biomasa, deposición atmosférica y excremento humano representan 2.2 Tg N_2O -N año⁻¹. Además, las emisiones desde ríos, estuarios y zonas costeras atribuidas a actividades antropogénicas contribuyen alrededor de 1,7 Tg N_2O -N año⁻¹. La concentración de N_2O en la atmósfera es de 314 ppb y se incrementa en un rango de 0,8 ppbv año⁻¹ que es equivalente a una adición neta de 3,9 Tg N_2O -N año⁻¹ (Reay et al., 2012).

1.1.3. Emisiones de N_2O desde el suelo

El suelo es la mayor fuente de emisión de N_2O ya que contribuye aproximadamente con el 70% de la producción global de N_2O (Godde y Conrad, 2000). Las emisiones directas de N_2O se producen como consecuencia de los procesos microbianos de nitrificación (i.e. oxidación del NH_4) y desnitrificación (i.e. reducción del NO_3^-) que ocurren en los suelos (Figura 1). Por otro lado, las emisiones indirectas se originan a partir del nitrógeno proveniente de suelos que es movido fuera de los mismos a través de procesos de erosión, lixiviación y volatilización (Davidson y Kanter, 2014). Los procesos de transformación del N pueden ocurrir simultáneamente en diferentes micrositios del suelo. Los procesos de nitrificación y de desnitrificación dependen de varios factores: el tipo de suelo (Godde y Conrad, 2000), el uso de fertilizantes nitrogenados (Senbayram al., 2008), la

concentración de O_2 del suelo (Bollmann y Conrad, 1998), el riego (Panek et al., 2000), la época del año (Wolf and Brumme, 2002), el pH (Baggs, 2011) y la competición entre hongos y bacterias desnitrificantes por el NO_3^- (Siciliano et al., 2014). Tanto la nitrificación como la desnitrificación tienen reguladores en común, como la presión parcial de oxígeno y el contenido de agua del suelo.

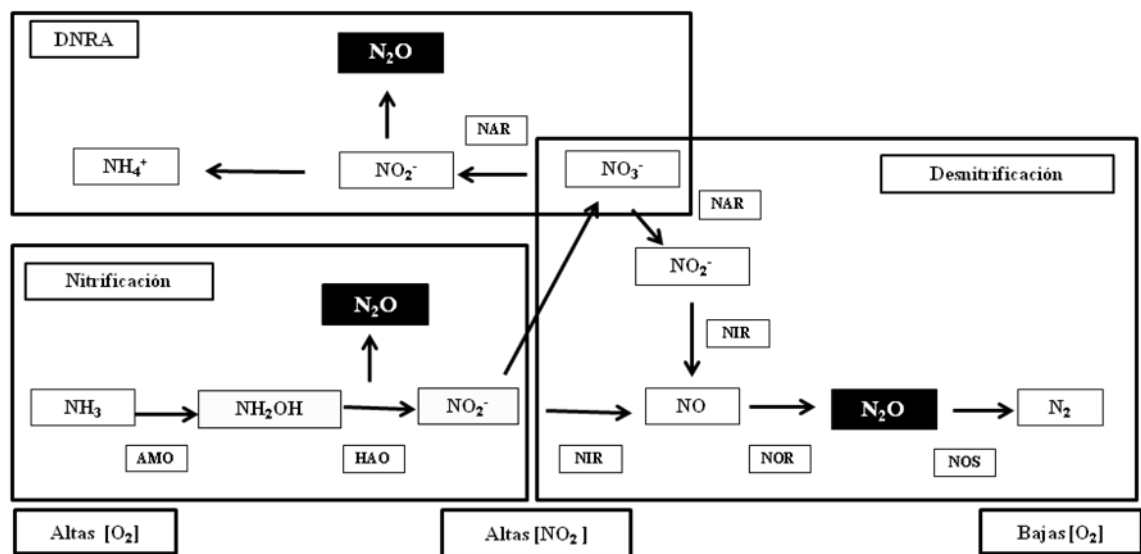


Figura 1. Vías en las que participan microorganismos del suelo en la producción de N_2O . Se indican las condiciones predominantes que conducen cada proceso (Modificado de Baggs, 2011). DNRA, reducción desasimilatoria; AMO, amonio monooxigenasa; HAO, hidroxilamina oxidoreductasa; NAR, nitrato reductasa; NIR, nitrito reductasa; NOR, óxido nítrico reductasa; NOS, óxido nitroso reductasa.

En suelos bien aireados (Espacio porosos lleno de agua, WFPS < 60%, percentage of water-filled pore space), la nitrificación es la fuente preferencial de flujos de N_2O (Bateman and Baggs, 2011), mientras que en suelos con un alto contenido de agua (WFPS > 60-90%) la producción de N_2O es conducida principalmente por la desnitrificación anaeróbica (Smith et al., 2001). Otras vías en la emisión de N_2O desde el suelo son la nitrificación desnitrificante (habilidad de bacterias oxidadoras de amonio para

desnitrificar), la co-denitrificación (llevada a cabo por bacterias y hongos) y la reducción desasimilatoria de NO_3^- a NH_4^+ (DNRA), la cual produce N_2O como uno de sus subproductos. Además, la quimiodesnitrificación, reacción no biológica de productos intermedios de la nitrificación, contribuye también con pequeñas cantidades de N_2O (Baggs, 2011).

1.1.3.1. Nitrificación

El proceso de nitrificación en los suelos es la transformación del NH_4^+ a formas oxidadas de N (NO_2^- y NO_3^-). La primera etapa de la nitrificación es la oxidación del NH_4^+ a hidroxilamina (NH_2OH) por la enzima amonio monooxigenasa (AMO) y después a nitrito (NO_2^-) por la hidroxilamina oxidoreductasa (HAO) (Guo et al., 2013).

La enzima AMO es una enzima ligada a la membrana de microorganismos nitrificantes que contiene una molécula de Cu como un cofactor (Guo et al., 2013), además Zahn et al. (1996), sugiere al Fe como un segundo cofactor. Los microorganismos responsables de la oxidación del NH_4^+ son principalmente bacterias quimilitoautotróficas oxidadoras de NH_3 (AOB) (Subbarao et al., 2006). Los géneros más importantes en realizar esta transformación son: *Nitrosomonas*, *Nitrosovibrio*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus*, *Nitrosococcus* y archeas oxidadoras de NH_3 (AOA) (Guo et al., 2013).

1.1.3.2. Desnitrificación

El proceso desnitrificación es considerado la fuente más potente de emisión de N_2O desde suelos bajo praderas y también es el responsable del retorno del N a la atmósfera como N_2 , cerrando el ciclo del N en el suelo (Luo et al., 2016). La desnitrificación es un proceso de respiración microbiana en que el NO_3^- y NO_2^- sustituyen al O_2 como un aceptor final de electrones, en condiciones donde el suministro de O_2 es limitado para la respiración aeróbica de los microorganismos del suelo (Baggs, 2011).

La reducción de nitrato (NO_3^-) o nitrito (NO_2^-) hacia los gases óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O) es catalizada por la acción de cuatro enzimas: nitrato reductasa (Nar), nitrito reductasa (Nir), óxido nítrico reductasa (Nor) y óxido nitroso reductasa (Nos) (Figura 1) (Guo et al., 2013).

La tasa de producción de $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$ desde el suelo puede ser variable y el N_2O producido puede ser el producto final dominante. La desnitrificación también puede proporcionar un valioso servicio al ecosistema removiendo el NO_3^- desde aguas contaminadas con sedimentos y otros suelos saturados con nitratos (Saggar et al., 2013).

1.1.4. Ciclaje del N en sistemas de producción pastoriles

Los ecosistemas pastoriles abarcan alrededor del 25% de la superficie de la tierra, ocupando 117 millones de km^2 de superficie y proporciona alimento para 1800 millones de cabezas de ganado (Saggar et al., 2013). Las pasturas manejadas bajo pastoreo es el sistema de producción animal predominante en muchos países, incluido Uruguay.

El ciclo del N en ecosistemas bajo praderas es complejo, y presenta muchas vías para la liberación de formas móviles de N hacia la atmósfera (Luo et al., 2016). Las entradas de N a los suelos bajo condiciones pastoriles son principalmente la fijación atmosférica de N por las leguminosas, la fertilización nitrogenada y la deposición de la excreta animal. En ecosistemas pastoriles el N es frecuentemente un nutriente limitante y es aplicado para aumentar la productividad de la pastura (Saggar et al 2013). Este agregado de N de fertilizante puede representar un costo tanto económico como ambiental, debido a que se puede llegar a punto de saturación en el contenido de N del sistema, cuando plantas, microorganismos y el suelo no puedan llegar a asimilar o retener el exceso de N. Esto puede producir pérdidas desde el sistema a través de la volatilización de NH_3 , la lixiviación de nitratos (NO_3^-) y emisiones gaseosas

de óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N₂O) (Luo et al., 2016, Saggar et al., 2013).

En suelos bajo condiciones pastoriles los animales contribuyen de manera significativa en el ciclado de nutrientes a través de la deposición de excremento y orina (Saggar et al., 2004). El N asociado a la excreción animal (tanto orina y heces) es un componente importante y contribuye críticamente al ciclo del N. Según Luo et al. (2010), solamente una pequeña proporción del N (entre el 5% y 30%) consumido por los bovinos es convertido a leche o se traduce en un aumento en el peso para el animal, el resto es excretado en heces y orina. Por su lado, Dijkstra et al. (2013) observó que el N excretado en la orina representa entre el 70-75% y entre el 60-65% en ovinos y bovinos, respectivamente, del N consumido en pasturas.

1.1.4.1. Características de las manchas de orina

La principal vía de pérdidas de N desde el ganado vacuno es la excreción de N a través de la orina, con una concentración de N que varía entre 2-20 g N L⁻¹ (Bristow et al., 1992). Las variaciones del suplemento de nitrogenado de la dieta (no proteico), afecta directamente las salidas de N urinario, por lo tanto, el contenido de N en la orina aumenta con el aumento del contenido de N en la dieta (Kebreab et al., 2001). En un periodo corto de tiempo el N de la orina es más susceptible a pérdidas que el N fecal (Bussink y Oenema, 1998). Generalmente, la mayor parte del N de la orina del ganado vacuno está en forma de urea (Cuadro 1), la cual es hidrolizada rápidamente (completa la hidrólisis entre 1 a 2 días) desde su deposición, y se transforma a NH₄⁺ y NO₃⁻, vía nitrificación, y luego a formas gaseosas vía desnitrificación. Por lo tanto, el N de la orina puede ser una fuente importante de N₂O (Dijkstra et al., 2013).

Cuadro 1. Concentración de constituyentes de la orina que contienen N, proveniente de ganado lechero.

	Concentración (g N/L de Orina)	Proporción (%)
N Total	9,7	
Urea	7,8	81
Alantoína	1,1	11,2
Ácido Úrico	0,07	0,7
Creatinina	0,26	2,6
Ácido Hipúrico	0,45	4,6

Modificado de Kool et al. (2006) y Dijkstra et al. (2013).

La orina de vacunos es una solución acuosa, compuesta principalmente de compuestos nitrogenados y sulfurosos (Dijkstra et al., 2013). La concentración de carbono en la orina de vacunos es baja y varía entre 3,1 a 20,4 g C L⁻¹ (Lovell y Jarvis, 1996). El pH de la orina de rumiantes varía entre 8,4 y 8,6, pero puede ser menor a 7,2 (Haynes y Williams, 1992). La deposición de N varía en rangos que van desde 20 a 80 g N m⁻² en los parches de heces y 50 a 200 g N m⁻² en los parches de orina (Bolan et al., 2004).

Los bovinos orinan 8-12 veces al día, produciendo entre 1,6 y 2,2 L en cada deposición. El área que cubre cada parche de orina se encuentra entre 0,16 a 0,49 m² (Haynes y Williams, 1993). Sin embargo, el área afectada promedio en la pastura es de 0,68 m² debido a la difusión de la orina a través del suelo, por lo tanto, puede llegar hasta el sistema radicular de plantas que se encuentran fuera del parche de orina (Bolan et al., 2004). El tamaño del parche de orina se encuentra influenciado por un número de factores que incluyen el viento, la pendiente y la densidad aparente del suelo (Williams et al., 1999b). Williams y Haynes, 1994, observaron que el flujo de orina en el suelo es principalmente a través de los macroporos, lo que le permitiría a la orina penetrar hasta los 400 mm de profundidad, pero la

mayor parte (85%) de la orina se encuentra en los primeros 100 mm del suelo.

La tasa de retorno anual del N que se encuentra en la orina hacia a la pradera está en función de muchas variables que incluyen el número de animales en pastoreo y el consumo de N y agua de los animales (Haynes y Williams, 1993). Por ejemplo, en Nueva Zelanda, animales en pastoreo depositan anualmente alrededor de 5 veces más N (1,5 Tg), que el nitrógeno aplicado en fertilizantes (0,31 Tg) (Saggar et al., 2004). Por lo tanto, la orina contribuye mucho más a las emisiones gaseosas de N y a las pérdidas de NO_3^- que la fertilización con N en sistemas pastoriles.

Otro factor que puede afectar las pérdidas de N es la composición de la orina, por ejemplo, el aumento de un constituyente de la orina como el ácido hipúrico podría reducir las emisiones de N_2O (Kool et al., 2006).

1.1.4.2. Efecto de la orina en las propiedades químicas del suelo

Seguido a la deposición de orina, el pH en los primeros 20-40 cm del suelo generalmente incrementa de 1 a 3 puntos (Haynes y Williams, 1992; Shand et al., 2002). Esto ocurre debido a que la mayor parte de la urea contenida en la orina queda retenida en las capas superficiales del suelo, en donde se hidroliza y genera condiciones básicas. Generalmente, el pH del suelo retorna a su estado original después de 2 a 3 semanas, aunque se pueden mantener niveles elevados de pH, si el NH_4^+ se volatiliza como NH_3 y si la nitrificación es retardada por bajas temperaturas y/o muy bajas condiciones de humedad del suelo (Somda et al., 1997).

La cantidad estimada de N a partir de la orina depositada por animales en pastoreo puede ser mayor a $1000 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$ (Zaman y Nguyen, 2012). Estudios que han utilizado isotopos estables han encontrado que entre el 20-30% del N de la orina queda en la materia orgánica del suelo (MOS) (Leterme et al., 2003). Sørensen y Jensen (1996) en un trabajo con orina marcada con ^{15}N , observaron una mayor concentración de ^{15}N en un suelo

franco arenoso respecto a un suelo arenoso. Estos autores atribuyeron la mayor pérdida de ^{15}N desde suelos arenosos a una mayor tasa de mineralización del N de la orina y a un bajo consumo de N por las plantas. En otros estudios que utilizaron orina marcada con ^{15}N obtuvieron una recuperación del N en el siguiente orden: arcillas (81%) > franco limoso (77%) > franco arenoso (71%) (Clough et al., 1998).

La deposición de orina aporta diferentes nutrientes a la solución del suelo, ya sea directamente desde la deposición en sí misma o indirectamente como consecuencia de cambios en el suelo que ocurren luego de su deposición (Shand et al., 2002). Los iones detectados en la solución del suelo inmediatamente después de la deposición de orina son consistentes con la concentración de estos presentes en la orina (Haynes y Williams, 1992). Inmediatamente luego de la deposición de orina las concentraciones de HCO_3^- , Cl^- y SO_4^{2-} disminuyen en el tiempo mientras que el NO_3^- es el anión dominante como producto de la nitrificación (Williams y Haynes, 1994). Al mismo tiempo, el incremento en las concentraciones de NO_3^- puede incrementar las concentraciones de otros iones, como Ca^{2+} y Mg^{2+} , que provienen principalmente desde sitios de intercambio del suelo, debido a su desplazamiento por compuestos presentes en la orina como el K^+ , Na^+ y NH_4^+ y por iones H^+ liberados durante la nitrificación (Haynes y Williams, 1992; Williams y Haynes, 1994).

1.1.4.3. Efecto de las manchas de orina sobre los microorganismos del suelo

Los suelos bajo praderas son de especial interés en el estudio de la distribución espacial de las comunidades de microorganismos debido a la estrecha relación entre plantas y microorganismos (Niklaus et al., 2006; Bremer et al., 2007) y la influencia que tiene la pradera sobre las propiedades del suelo (Marschner et al., 2003). En un estudio realizado por Ritz et al. (2004), observaron que la distribución espacial de las

comunidades microorganismos en el suelo se encuentra influenciada por las concentraciones de cada nutriente en el suelo, además Philippot et al. (2009), observaron que la distribución espacial de las comunidades de bacterias del suelo de una pastura se correlaciona positivamente a las propiedades del suelo, tal como pH, humedad del suelo y a la concentración de NH_4^+ y NO_3^- .

Los microorganismos representan una parte intrínseca del ecosistema del suelo, y su diversidad influencia tanto la estabilidad, la productividad y la resiliencia del ecosistema, afectando la calidad del suelo y de las plantas (Torsvik and Øvreås, 2002). La heterogeneidad natural del suelo, incluso a distancia menores a 1 mm, puede producir una distribución desigual de los microorganismos (Nannipieri et al., 2003). Existen zonas con una alta actividad de los microorganismos ("hot spots"), donde las condiciones son adecuadas para su crecimiento, pero en general la disponibilidad de fuentes de nutrientes y energía es baja (Nannipieri et al., 2003). La dependencia del agua limita en gran medida el crecimiento de los microorganismos a los agregados de suelo, al agua retenida en las arcillas y la materia orgánica (Philippot et al, 2009). Las variaciones de temperatura y humedad afectan directamente la biomasa microbiana, e indirectamente, la disponibilidad de sustrato (Dalal, 1998).

La biomasa microbiana contenida en suelos de praderas de clima templado ha sido estimada en 1–4 ton ha⁻¹ and 2–5 ton ha⁻¹ para poblaciones de bacterias y hongos, respectivamente (Williams et al., 1999a). Esta se estima a partir de contenido de C orgánico del suelo, al cual encuentra correlacionada (Schutter y Dick, 2001; Nannipieri et al., 2003). Una menor biomasa en suelos bajo pasturas es debida probablemente a una menor biomasa de hongos (Bardgett et al., 1996; Grayston et al., 2001). Contrariamente, la biomasa de bacterias estimada a partir de la cuantificación de la respiración microbiana es generalmente mayor en praderas mejoradas que en suelos bajo praderas naturales, (Grayston et al., 2001).

El uso de fertilizantes para incrementar la concentración de nutrientes puede alterar la estructura de comunidad de microorganismos, e incrementar el pH del suelo (Grayston et al., 2001; Clegg et al., 2003; Grayston et al., 2004). Un incremento del pH del suelo puede acelerar la degradación de la materia orgánica alterando la relación C:N del suelo (Van Bergen et al., 1998). Por lo tanto, el pH del suelo bajo praderas permanentes sin fertilización tiende a ser menor (Haynes y Williams, 1993).

En sistemas de producción ganaderas bajo pastoreo, se generan altas entradas de N debido a las deposiciones de Orina. Al existir altos niveles de N en las manchas de orina (entre 700 y 1200 kg N ha⁻¹), el contenido de NO₃⁻ y N₂O podría exceder la capacidad de los sistemas biológicos para desnitrificar o para reducir el N₂O a N₂ (Kelliher et al., 2014). Por otro lado, limitaciones en las características fisicoquímicas del suelo, tales como la aireación y el pH, pueden afectar la eficiencia de las transformaciones biológicas del N en el suelo. Como consecuencia, aumentarían las pérdidas de NO₃⁻ por lixiviación y las emisiones de N₂O desde suelos agrícolas, especialmente desde alrededor de las manchas de orina (Haynes y Williams, 1993). Por lo tanto, es probable que las deposiciones de orina bovina tengan un impacto sobre la actividad y la biomasa de los microorganismos del suelo, así como sobre la estructura de las poblaciones de microorganismos involucrados en las transformaciones del N en el suelo (Rooney et al., 2006). Los efectos directos de las deposiciones de orina en el suelo son el aumento del pH de suelo cuando la urea es hidrolizada a NH₄⁺, un rápido aumento de la presión osmótica debido a la producción de NH₄⁺ combinada con sales presentes en la orina, y la acumulación, bajo ciertas condiciones, de compuestos tóxicos como el NO₂⁻ (Petersen et al., 2004a). La orina puede variar en su composición química, y el efecto sobre el sistema suelo depende en parte de las condiciones iniciales de este (Clough et al., 2007). En sistemas ganaderos bajo pastoreo las emisiones de N₂O asociadas a las deposiciones de orina son temporales y espacialmente variables, generándose “hotspots” de emisiones (Molodovskaya et al., 2012). La

comprensión de como las comunidades de microorganismos nitrificantes y desnitrificantes son capaces de cambiar en respuesta a distintos tipos de suelo y prácticas de manejo agrícola, y de cómo estos cambios se relacionan a las emisiones de N_2O permitiría el desarrollo de prácticas de manejo más adecuadas que reduzcan la pérdida de N (Luo et al., 2010).

1.1.4.4. Efecto de la orina sobre la pastura

Las deposiciones de orina de animales en pastoreo generalmente estimulan el crecimiento de la pastura debido a la incorporación de N al suelo (Ledgard et al., 1982; Haynes y Williams, 1993). Esta respuesta en crecimiento ocurre principalmente en las gramíneas de la pastura. Sin embargo, las especies fijadoras de N_2 pueden ver reducido su crecimiento como resultado del aumento en el contenido de N debido a la deposición de orina (Ledgard et al., 1982; Fraser et al., 1994). Algunos estudios han observado un rápido consumo de N por las plantas que se encuentran adyacentes a las deposiciones de orina, encontrando hasta un 12 % de N urinario en el tejido de plantas después de 29 días de la deposición de la orina al suelo (Williams y Haynes, 1994) y un 43 % después de un año (Fraser et al., 1994). Otros autores, trabajando con isótopos estables, han reportado que entre el 22-78% del N en la orina es absorbido y retenido por la planta (Clough et al., 1998, Leterme et al., 2003). En este sentido, Williams y Haynes (1994) reportaron que las plantas que se encuentran en los parches de orina contenían más N y menos Mg^{2+} y Ca^{2+} que plantas fuera de los parches de orina. Las deposiciones de orina, además, pueden causar un daño a la pastura debido a su alta concentración de N (Ritchey et al., 2003). Al mismo tiempo, el contenido de P de la pastura (generalmente entre 0.21–0.63% del peso seco) puede verse incrementado después de la aplicación de orina o urea, principalmente en sitios donde el P en la solución del suelo es bajo (Williams et al., 1999b, Soder y Stout, 2003).

1.1.5. Estrategias para la mitigación de las emisiones de N₂O

1.1.5.1. Inhibidores de la nitrificación

El uso de inhibidores de la nitrificación (IN), como la diciandamida (DCD), se ha visto como una técnica útil para reducir las emisiones de N₂O desde los parches de orina depositados en el suelo por animales en pastoreo y promover un uso eficiente del nitrógeno en el suelo (Barneze et al., 2015). Un gran número de estudios, particularmente en Nueva Zelanda, han observado que los IN pueden reducir las emisiones de N₂O entre 30-80% (Di et al., 2007; Luo et al., 2010; Zaman et al., 2009; Akiyama et al., 2015). Además, los IN pueden incrementar la eficiencia en la aplicación de fertilizantes reduciendo pérdidas de N derivados de la desnitrificación, y previniendo pérdidas por lixiviación (Bronson et al., 1992). Por ejemplo, el DCD (C₂H₄N₄) y el 3,4- dimetilpyrazole fosfato (DMPP), se han visto que son efectivos en reducir las emisiones de N₂O desde fertilizantes nitrogenados o desde residuos orgánicos (Delgado y Mosier 1996; McTaggart et al. 1997; Merino et al., 2002; Weiske et al., 2001). El DCD inhibe temporalmente la nitrificación desactivando la enzima amonio monooxigenasa (AMO), la primera enzima que involucra la oxidación de NH₄⁺ a NO₃⁻ en suelos, por microorganismos oxidadores de amonio (Di y Cameron, 2016), bloqueando la conversión del amonio proveniente de la orina a hidroxilamina (Morales et al., 2015). En contraste, la inhibición de la hidroxilamina oxidoreductasa (HAO) no es favorable para una implantación práctica como IN, porque altas concentraciones de hidroxilamina han sido reportadas como tóxicas para las nitrosomonas (Arp y Stein, 2003). Una vez aplicado al suelo, el DCD es degradado por las bacterias del suelo a CO₂ y NH₄⁺. A pesar de que la emisión de CO₂ desde la degradación del DCD puede contribuir a las emisiones de GEI, la cantidad producida a partir de DCD con cantidades

usualmente aplicadas (10–30 kg DCD/ha) son depreciables a 2,3% de las emisiones de N₂O y menores al 0,2% del total de CO₂ equivalente de emisiones de GEI estimados desde sistemas ganaderos en Nueva Zelanda (De Klein et al., 2014). La aplicación de DCD solamente afecta temporalmente la nitrificación y el ciclo del nitrógeno en suelos pastoriles. Sin embargo, es una posibilidad que bacterias nitrificantes pueden adaptarse al DCD, especialmente si se usa repetidamente. La mayoría de las investigaciones realizadas sobre suelos que reciben DCD, se han realizado solamente por uno 1 o 2 años, existiendo incertidumbre sobre el uso repetido de DCD en un mismo sitio sobre la eficacia en la reducción de DCD sobre las emisiones de N₂O (De Klein et al., 2011). El efecto inhibitorio del DCD depende de la temperatura, el contenido de agua, la materia orgánica y pH del suelo (Selbie et al., 2014). Una de las mayores limitaciones de la aplicación de DCD al suelo, es su facilidad para escurrir fuera de la zona radicular, disminuyendo su eficiencia (McCarty y Bremner, 1989). La tasa de degradación de DCD es dependiente de la temperatura, con una vida media de 3 a 4 meses con temperaturas medias del suelo de 10°C, y con una vida media de 20 días aproximadamente a temperaturas de 25 °C (Kelliher et al., 2008). Además, Kelliher et al. (2014), determino que la vida media del DCD se podría aumentar, si es aplicado en suelos de temperaturas relativamente frías para maximizar su longevidad (para T<10 °C, t_{1/2}>72 a 14 días) y su eficacia como inhibidor de la nitrificación. El DCD puede ser fitotóxico a concentraciones mayores de 20 mg kg⁻¹, en cultivos como el algodón, maíz, sorgo y papa (Bolan et al., 2004). Además, el DCD tiene algunas ventajas que lo hacen más deseable que otros IN, por ejemplo, tiene un menor costo de producción, es altamente soluble en agua, por lo que puede ser aplicado de forma líquida, y además es menos volátil, otra característica importante, es que se descompone completamente en el suelo como NH₄⁺ y CO₂ (McCarty y Bremner, 1989). De hecho, el DCD puede ser considerado como un fertilizante de liberación lenta (contiene alrededor de 65% de N), además no se considera un bactericida y no afecta a otros heterótrofos que son

responsables de muchas otras actividades biológicas en el suelo, sin embargo, la alta solubilidad del DCD puede tener un alto potencial de perderse por lixiviación (Mazzetto et al., 2015).

En Nueva Zelanda, el DCD es aplicado en dosis de 10 kg ha⁻¹, y es usado como una herramienta efectiva para inhibir la nitrificación, ya que reduce los sustratos de la desnitrificación, limitando las pérdidas de N a través de lixiviación de nitratos y emisiones de N₂O (Di et al., 2007; Zaman et al., 2009). Trabajos anteriores sugieren que el DCD específicamente inhibe bacterias oxidadoras de amonio por que inhibe la conversión del amonio derivado de la orina a hidroxilamina (Di et al., 2009). Esta inhibición se piensa que es específica y hasta la fecha no se han observado datos de un impacto significativo sobre las comunidades microbianas (O'Callaghan et al., 2010; Wakelin et al., 2013). Morales et al. (2015), observo que el tipo de suelo y las deposiciones de orina son los factores más importantes que determinan la estructura de la comunidad microbiana del suelo bajo pastoreo bovino. En dicho trabajo, se observó que, a nivel de comunidades de microorganismos, la deposición de orina produce una disminución en la riqueza (número de especies de un hábitat), tanto en la presencia como en la ausencia de DCD, confirmando que el inhibidor no contribuye a reducir la riqueza de los microorganismos del suelo.

1.1.5.2. Manejo de la dieta animal

El manejo de la dieta puede afectar fuertemente el contenido y la concentración de N en la orina, y por lo tanto el N que se deposita en el suelo. El uso de distintos tipos de dietas que permitan reducir la concentración de N presente en la orina, a través de la redistribución del N hacia otras vías, como es la leche y un aumento en la concentración de N en las deposiciones de excremento, podrían reducir potencialmente la disponibilidad de formas lábiles de N presentes en la orina, y permitiría disminuir las emisiones de N₂O desde los parches de orina (Selbie et al.,

2014). El consumo de N por rumiantes es un factor clave que determina la tasa de excreción de N, variaciones en la cantidad de carbohidratos en la dieta y el de proteína cruda pueden alterar significativamente un uso eficiente de N en el rumen, que determina la cantidad de N que queda retenido o excretado (Dijkstra et al., 2013). Reduciendo el contenido de proteína cruda en la dieta de rumiantes, generalmente permitiría disminuir la cantidad de N asociado a la orina, esto se debe a que una disminución en la degradación de la proteína cruda en el rumen reduciría la acumulación de NH_3 , e incrementaría la absorción renal de urea (Selbie et al., 2014). Una disminución en la concentración del N en la orina se produce principalmente por una reducción en la excreción de urea. Gardiner et al. (2016) observaron que la concentración de todos los compuestos nitrogenados presentes en la orina, con la excepción del ácido úrico, disminuyeron en animales que fueron alimentados con dietas bajas en N. El N fecal es menos susceptible a pérdidas que el N que se encuentra en la orina, por lo tanto, el factor de emisión para el N asociado a heces es un 25% del factor de emisión del N asociado a la orina (Gardiner et al., 2016). Incrementos en la excreción de N asociado a las heces como producto del incremento del consumo de carbohidratos en la dieta, podría reducir las emisiones de N_2O , sin embargo, se podría producir un incremento en las emisiones de CH_4 (Dijkstra et al., 2013).

Totty et al. (2013) encontró que una dieta basada en *Cichorium intybus*, *Plantago lanceolata*, *Lotus pedunculatus*, *Lolium perenne* y *trifolium repens*, puede disminuir entre un 17-19% el N contenido en la orina comparado con dietas basadas solamente en *Lolium perenne* y *Trifolium repens*. Una dieta diversa con bajos contenidos de proteína cruda (PC) y altos niveles de carbohidratos solubles en agua (CSA), probablemente permitirían una mayor eficiencia en el uso de N en el rumen. Además, esta dieta produce un incremento en el contenido de urea en leche, lo que permitiría sustentar la hipótesis que incrementos en la relación de CSA: PC produce más urea en leche y menos N en la orina. Estos resultados indican que una dieta diversa

tiene un potencial significativo para alterar la dinámica de excreción de N en rumiantes. Sin embargo, faltan investigaciones de cómo diferentes dietas pueden afectar las concentraciones de las diferentes formas de N en la orina (Gardiner et al., 2016).

1.1.6. Emisiones de gases efecto invernadero en Uruguay

Las estimaciones de las emisiones de GEI de Uruguay están basadas en el Quinto Informe de Evaluación del IPCC (MVOTMA, 2017), donde se establecen métricas comunes para calcular la equivalencia en dióxido de carbono de las emisiones y la absorciones de los GEI, como son el Potencial de Calentamiento Global (GWP), que es una medida relativa de cuánto calor puede ser atrapado por un GEI en un determinado período de tiempo en comparación con el CO₂ y el Potencial de Cambio de Temperatura Global (GTP), que se refiere al cambio de la temperatura media global en superficie que induce un determinado GEI, respecto al CO₂. Ambas métricas pueden ser utilizadas para cuantificar y comunicar contribuciones absolutas y relativas de emisiones de GEI de diferentes sustancias y las emisiones de regiones o países y fuentes o sectores (MVOTMA, 2017).

Las emisiones de GEI en Uruguay de acuerdo con la métrica GWP_{100 AR2}, el sector AFOLU (Agricultura, silvicultura y otros usos de la tierra, por su sigla en inglés), generó el mayor aporte a las emisiones totales (sin considerar las remociones) con un 75,1 %, seguido del sector Energía con el 20,1 %, Desechos con el 3,2 % y finalmente el sector IPPU (Procesos Industriales y Uso de Productos, por su sigla en inglés) con el 1,6 % de las emisiones.

Sin considerar remociones de CO₂, las emisiones netas de metano expresadas en Gg de CO₂-eq de acuerdo con la métrica GWP_{100 AR2}, representan el 50,2 % de las emisiones totales nacionales, las emisiones netas de óxido nitroso el 28,5 % de las emisiones totales nacionales, las de

dióxido de carbono el 21,1% y las de HFCs y SF6 representan el 0,3% (Figura 2).

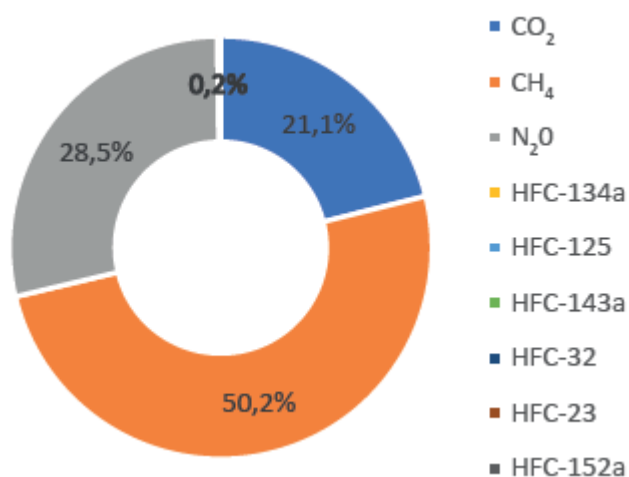


Figura 2. Contribución de emisiones por gas, 2014, GWP₁₀₀ AR2 (MVOTMA, 2017)

Las categorías con mayor proporción de emisiones, sin considerar remociones, fueron: fermentación entérica (Sector AFOLU) con el 45,0 % de las emisiones nacionales, seguido por las emisiones directas de N₂O de suelos gestionados (Sector AFOLU) con un aporte del 22,0 % de las emisiones nacionales, la quema de combustibles en el transporte (Sector Energía) con el 10,9 % de las emisiones nacionales y emisiones indirectas de N₂O de suelos gestionados (Sector AFOLU) con un aporte del 5,5 %.

Utilizando la métrica GTP₁₀₀ AR5, las emisiones netas de Uruguay, debido a la elevada participación del CH₄, descienden muy significativamente en CO₂ eq (reducción del 81 %) y las emisiones netas del país descienden un 55 % comparado con las emisiones registradas con la métrica GWP₁₀₀ AR2 (Figura 3). El sector AFOLU generó el mayor aporte a las emisiones totales de acuerdo con la métrica GTP₁₀₀ AR5 (sin considerar las remociones) con un 58,0 %, seguido del sector Energía con el 37,7 %, el sector Procesos Industriales con el 2,7 % y finalmente Desechos con el 1,7

%. El GWP₁₀₀ AR2 indica que el CH₄ es el principal gas emitido, mientras que el uso de la métrica del GTP₁₀₀ AR5 señala que el principal gas de efecto invernadero en Uruguay es el N₂O. Éste representa el 41,2 % de las emisiones, seguido del CO₂ (40,4 %) y el metano (18,3 %) y en menor proporción los HFC y el SF6 (menor al 1 %). Las categorías con mayor incidencia en las emisiones utilizando la métrica GTP son: emisiones directas de N₂O de suelos gestionados (31,8 %); transporte (20,7 %), fermentación entérica (16,4 %) y las emisiones indirectas de N₂O de suelos gestionados (8,0 %).

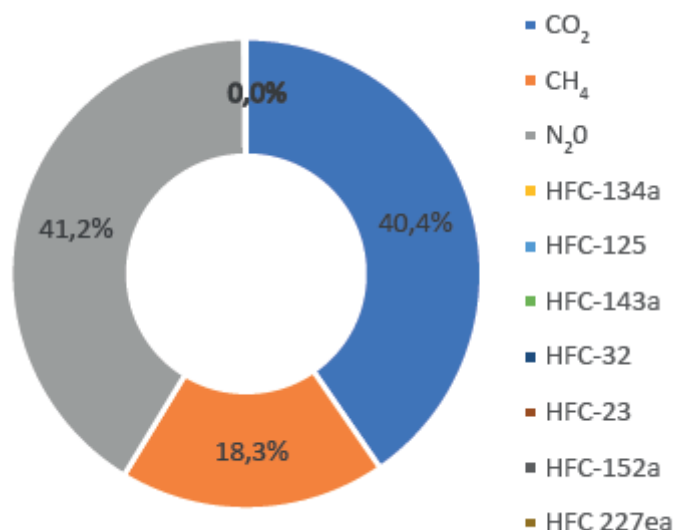


Figura 3. Contribución de emisiones por gas, 2014, GTP₁₀₀ AR5 (MVOTMA, 2017)

A lo largo de la serie 1990-2014, el principal GEI con respecto a emisiones es el metano de acuerdo con la métrica GWP₁₀₀ AR2 y el óxido nitroso según la métrica GTP₁₀₀ AR5.

1.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.2.1. Hipótesis

La orina excretada por bovinos en condiciones de pastoreo aumenta la disponibilidad de N en el suelo, favoreciendo las emisiones de N₂O. La aplicación al suelo de inhibidores de la nitrificación contribuye a mitigar las emisiones de N₂O.

1.2.2. Objetivo general

Contribuir al proceso de intensificación sostenible de la producción ganadera nacional a través del estudio de las emisiones de N₂O derivadas de la deposición de orina bovina y de posibles estrategias de mitigación vinculadas con la calidad de la pastura y al uso de inhibidores de las emisiones de N₂O.

1.2.2.1. Objetivos específicos

- Cuantificar el efecto de dos dietas pastoriles de niveles proteicos contrastante sobre las emisiones de N₂O derivadas de las deposiciones de orina bovina.
- Cuantificar el efecto de un inhibidor del proceso de nitrificación sobre emisiones de N₂O derivadas de deposiciones de orina bovina.
- Identificar el efecto de variables fisicoquímicas del suelo (pH, humedad, temperatura, NO₃⁻ y NH₄⁺) en las emisiones de N₂O.
- Determinar el efecto de la aplicación de orina y un inhibidor de la nitrificación sobre cambios en la estructura en la comunidad de bacterias del suelo (gen ADNr 16S).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

El trabajo experimental se llevó a cabo desde julio 2013 hasta julio 2014 en la estación experimental de INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay, sobre suelos del tipo Brunosol éutrico. Se instalaron dos sitios experimentales: una pastura nativa degradada de bajo contenido proteico (PBN), dominado por gramilla (*Cynodon dactylon*) y otra sobre una mezcla de Festuca (*Festuca arundinacea* Pers.) y Alfalfa (*Medicago sativa* L.), de alto contenido proteico (PAN).

Los análisis iniciales de suelo y pastura para los sitios experimentales (PBN y PAN) se observan en la Cuadro 2.

Cuadro 2. Análisis de suelo y pastura de los sitios PBN y PAN

Sitio	PBN	PAN
pH (H ₂ O)	5,9	5,8
N (%)	0,4	0,2
C.Org (%)	4,8	2,7
N-NO ₃ (µg N/g)	20,7	8,0
N-NH ₄ (µg N/g)	22,1	14,9
Bray I (µg P/g)	40,4	38,9
N Pastura (%)	1,59	3,14

2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y TIPO DE CÁMARA UTILIZADA

En cada experimento se utilizó un diseño estadístico de bloques completos al azar con cuatro repeticiones y tres tratamientos. Los tratamientos aplicados fueron: Control sin aplicación de orina (Control), aplicación de orina colectada de bovinos bajo pastoreo (Orina), y aplicación

de orina colectada con el agregado del inhibidor de la nitrificación, diciandiamida (Orina+DCD) a una dosis de 10 kg ha⁻¹.

Para las mediciones de N₂O se utilizó la metodología de cámaras estáticas de flujo cerrado (De Klein et al, 2012). En cada cámara se realizó muestreos de gases durante un año. Cada cámara (Figura 4, A) posee una parcela contigua (Figura 4, B) sobre la cual se aplicaron los mismos tratamientos y se utilizó para obtener muestras de suelos y de la parte aérea de la pradera para el análisis de parámetros físicoquímicos. En ambos ensayos se monitoreó el suelo a 15 cm de profundidad, utilizando un sensor de temperatura (ECT- Decagon Service) y humedad (Ec-5, Decagon Service) (Imagen 1, C)

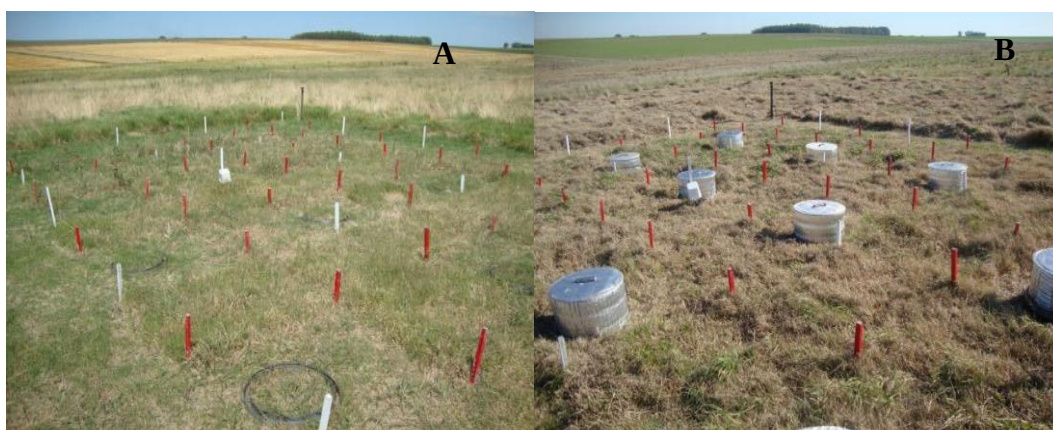


Figura 4. Diseño de las parcelas

Las cámaras fueron construidas en acero inoxidable siguiendo el protocolo sugerido por Rochette y Eriksen-Hamel (2008). Las cámaras constan de dos partes: 1) base de 40 cm de diámetro con borde acanalado de 2 cm de ancho la cual se inserta 10 cm en el suelo (Figura 5 A); y 2), tapa de 40,5 cm diámetro y 25 cm de altura (Figura 5 B). La tapa cuenta, con una septa de goma (Figura 5 C) a través de la cual se obtienen las muestras gaseosas. Las cámaras están forradas con una membrana aislante de espuma de polietileno. El diseño de las cámaras aseguro una superficie de

aplicación de los tratamientos de 1256 cm² y un volumen de muestreo de gases de 31415 cm³.



Figura 5. Diseño de las cámaras para muestreo de gases.

2.3. COLECTA Y ANÁLISIS DE ORINA

La orina se colectó de vacas hembras de raza carnífera, las cuales fueron asignadas previamente a pastoreo en ambos sitios experimentales, PBN y PAN, por un período de al menos 7 días para asegurar que la excreción de orina correspondía a la pastura ingerida. Una vez recolectados los litros necesarios para aplicar según los tratamientos en las cámaras y parcelas, se tomaron cinco submuestras de orina de 100 mL. A cada submuestra se le agregó 5 mL de ácido sulfúrico con el objetivo de inmovilizar el N de la muestra y se analizó su contenido de N por el método de Kjedhl (Cuadro 3). En cada cámara se agregó 1 L de orina asegurando cubrir toda la superficie.

Cuadro 3. Contenido de N de la orina colectada de cada sitio experimental.

Sitio	N (%)
Orina PBN	0.52
Orina PAN	0.44

2.4. MUESTREO DE N₂O

La colecta de muestras gaseosas en las cámaras comenzó el día 25 de julio, inmediatamente luego de aplicados los tratamientos. En cada evento de muestreo, se colectaron tres muestras en cada cámara: al tiempo 0, a los 20 minutos y a los 40 minutos. Los muestreos se realizaron manualmente a través de la septa de la tapa de la cámara utilizando una jeringa. Cada muestra fue de 10 mL y se guardaron sobrepresurizadas en viales de 6 ml previamente evacuados (exetainer, Labco), durante el primer mes las muestras se colectaron tres veces por semana, durante las siguientes tres semanas se realizaron dos muestreos por semana, para luego continuar con un muestreo mensual hasta completar el año.

La concentración de N₂O de las muestras gaseosas obtenidas en ambos ensayos fueron determinadas en un cromatógrafo de gases (Agilent, modelo 7890), equipado con un detector de captura electrónica (ECD).

2.5. CÁLCULO DEL FLUJO DIARIO, ACUMULADO DE N₂O y FACTOR DE EMISIÓN

El flujo de emisión de N₂O para cada día de muestreo se calculó utilizando el paquete HMR (Pedersen et al., 2010), en el software R, basada en la ecuación de flujo desarrollada por Hutchinson y Mosier (1981), utilizando la siguiente relación para calcular el flujo de N₂O desde el suelo.

$$F_0 = V \times (C_1 - C_0)^2 \div [A \times T_1 \times (2 \times C_1 - C_2 - C_3)] \times \ln[(C_1 - C_0) \div (C_2 - C_1)]$$

Donde F₀ es el flujo al tiempo 0, V es el volumen de la cámara (L), A es la superficie de la cámara (m²); C₀, C₁, C₂ son las concentraciones de gas de la cámara (ppm (V)) en el tiempo 1, 2, 3 respectivamente, y T₁ es el intervalo entre los puntos de muestreo (minutos).

Condición; $[(C1 - C0) \div (C2 - C1)] > 1$

El flujo acumulado se calculó mediante la integral de todos los valores de flujo hasta los 60 días después de la aplicación de los tratamientos para cada experimento utilizando el método de integración trapezoidal. Se realizó utilizando la función suma-producto en una planilla Excel en igual período de tiempo para todos los tratamientos (Berger et al., 2011).

El factor de emisión del N₂O (FE, %) para la orina se calculo utilizando la siguiente ecuación:

$$FE = [(N-N_2O_{\text{Orina}} - N-N_2O_{\text{control}}) / N\text{-Aplicado}_{\text{Orina}}] \times 100$$

Donde, N-N₂O_{Orina} es el flujo acumulado desde las manchas de orina, N-N₂O_{control} es el flujo acumulado desde el suelo sin la aplicación de los tratamientos y N-Aplicado_{Orina} es la concentración de N de la orina aplicada al suelo.

2.6. ANÁLISIS DEL SUELO Y LA PASTURA

Las muestras de suelo se obtuvieron durante los mismos días de los muestreos de gases en las parcelas contiguas a cada cámara a una profundidad de 15 cm. Los análisis fueron realizados por el laboratorio de análisis de suelos, plantas y agua de INIA La Estanzuela. Las mismas fueron analizadas para NH₄⁺ mediante extracción por KCL y colorimetría, NO₃⁻, mediante potenciometría utilizando un electrodo de actividad específica y pH del suelo utilizando un buffer de acetato de calcio a pH 7 y determinando la acidez midiendo el pH de equilibrio del suelo. Además, de cada parcela se obtuvo una muestra de la pastura y se cuantificó su contenido de materia seca y de N. Tanto para los análisis de suelo y de pasturas se muestrearon los días: 1, 14, 28, 78, 145, 208, 230, 264, 310, 340.

2.7. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA MICROBIANA DEL SUELO

La estructura de la comunidad microbiana se determinó mediante la técnica DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) de fragmentos del gen ADNr 16S. Estas determinaciones fueron realizadas directamente a partir del ADN extraído de muestras de suelo (profundidad 15 cm) de cada parcela correspondientes a los días 1 (T1), 15 (T2), 30 (T3) y 45 (T4) de comenzado los experimentos.

2.7.1. Extracción de ADN y amplificación del gen ADNr 16S

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit "Soil Power DNA Isolation kit" (Laboratorios MoBIO). Se evaluó la concentración y pureza del ADN obtenido midiendo la absorbancia a 260, 280 y 320 nm utilizando el equipo "NanoDrop 8000" (Thermo Scientific) y se verificó su integridad mediante geles de agarosa al 1%.

A partir del ADN purificado se realizaron amplificaciones del gen ADNr 16S utilizando cebadores específicos para el dominio bacteria (Cuadro 4). El gen ADNr 16S posee regiones conservadas y otras menos conservadas o hipervariables (V1-V9), que se utilizan para estudios filogenética y taxonomía.

Cuadro 4. Cebador utilizado en la reacción de PCR.

	Primer	Secuencia	Referencia
16S ADNr	F984GC*	GC-AACGCGAAGAACCTTAC	Heuer et al., 1997
	R1378	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	

*GC_clamp: CGCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG.

Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 25 µl, contenido en 1X PCR buffer, 1 U Taq polimerasa, 0,2 mM de cada uno de

los cuatro dNTP, 3,0 µg de MgCl₂, 0,4 µg de cada primer y 0,4 µl de seroalbúmina bovina (BSA) y 1 µg del ADN extraído. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 2%. Las condiciones de PCR consistió en un paso de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 53°C por 1 min y extensión a 72°C por 2 min, y una extensión final a 72°C por 10 min.

2.7.2. Análisis de patrones de bandas (DGGE)

Los productos de PCR se analizaron mediante DGGE (DGGE 2499, C.B.S Scientific), en geles de acrilamida-bisacrilamida (9%) que contenían un gradiente lineal de agentes desnaturalizantes urea - formamida (70-50%). La corrida electroforética se realizó por 21 horas, a una temperatura de 60°C a 70 volts, utilizando un buffer TAE 0,5 X. Como marcador de la migración se utilizó una mezcla de amplicones del ADNr 16S de las cepas *Bacillus aryabhattai*, *Bacillus thuringensis*, *Serratia sp*, *Streptomyces sp.*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Pseudomona sp* y *Bacillus sp*. Los geles se revelaron utilizando Gelred (Biotium) por 30 minutos y se fotografiaron bajo un transiluminador de luz ultravioleta (software CareStream). En la Figura 6, se visualiza los patrones de bandas generados en el DGGE, donde se puede observar, como un ejemplo, el diseño de un gel, donde P representa el sitio (PBN), IV y I representan dos tiempos de muestreo, C, O y C+I, representan los tratamientos utilizados y M representa el marcador de migración.

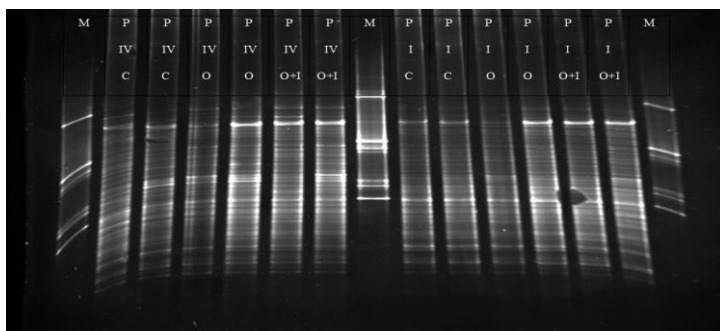


Figura 6. Diseño y Patrones de bandas generadas en el DGGE.

2.7.2.1. Análisis multivariado

Los patrones de bandas de los geles de DGGE fueron generados utilizando el software Bionumerics versión 7,5 (Applied Maths), generando matrices de ausencia (0) y presencia (1) de bandas. Para el cálculo de similitudes de las matrices generadas a partir de los tratamientos de la PBN y PAN, se utilizó como coeficiente la correlación de Pearson y se utilizó el algoritmo Ward para construir los dendrogramas (Boon et al., 2002, Aboim et al., 2008). La matriz de distancias generada se visualizó mediante un análisis de coordenadas principales, utilizando el software INFOSTAT versión 2017 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>).

2.7.2.2. Índices de diversidad

El índice de índice de Shannon-Wiener (H) fue calculado utilizando la curva densimétrica de cada banda. La intensidad de la banda fue reflejada como la altura máxima en la curva densimétrica (Software PAST (<http://folk.uio.no/hammer/past/>)).

$$H = -\sum (n_i / N) \log (n_i / N)$$

En esta fórmula, “ni” representa el máximo de la altura de la curva y “N” es la suma de todas las alturas de las curvas densiométricas

2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada sitio experimental fue analizado independientemente. Los efectos de los tratamientos en cada sitio sobre el NH_4^+ , NO_3^- y pH del suelo, contenido de N y materia seca vegetal se compararon realizando un ANOVA. Las comparaciones de medias de los tratamientos se realizaron a través de un análisis post-hoc (LSD Fischer) ($p > 0,05$).

Para entender el efecto de los tratamientos sobre los flujos de N_2O se realizó un análisis de componentes principales (ACP), utilizando las variables del suelo NO_3^- , NH_4^+ ; pH; nitrógeno (N, %), y las variables de la pastura materia seca (MS, kg/ha), N (%).

Para el ANOVA y el análisis multivariado se utilizó el programa estadístico InfoStat versión 2017.

3. RESULTADOS

3.1. DATOS METEREOLÓGICOS

3.1.1. Precipitación y temperatura

Los datos de temperatura del aire y de las precipitaciones fueron obtenidos a partir de la base de datos de la Unidad de Meteorología de INIA La Estanzuela. Durante el año en que se realizaron los muestreos de gases las precipitaciones alcanzaron un total de 1250 mm y la temperatura promedio fue de 18,3 °C (Figura 7). En los primeros 80 días, la lluvia acumulada fue de 266 mm, registrándose dos episodios de lluvias superiores a 40 mm durante los días experimentales 49 y 58. La temperatura promedio de esta primera etapa fue de 12,1 °C.

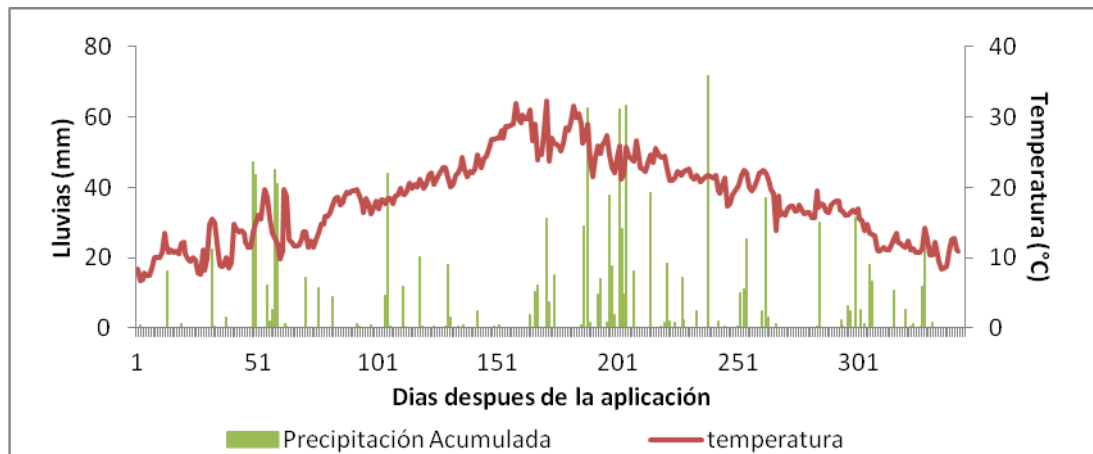


Figura 7. Temperatura y precipitaciones (Fuente. GRAS, 2016)

3.1.2. Contenido volumétrico de agua y temperatura del suelo

A partir de los datos obtenidos desde los sensores instalados en cada sitio experimental (PBN y PAN), se determinó que el valor promedio del contenido volumétrico de agua del suelo para el sitio PBN durante los primeros 80 días fue de 41%, con un máximo de 47% y un mínimo de 33%,

mientras que la temperatura promedio del suelo fue de 16,2°C y varió entre 9,6°C y 24°C (Figura 8).

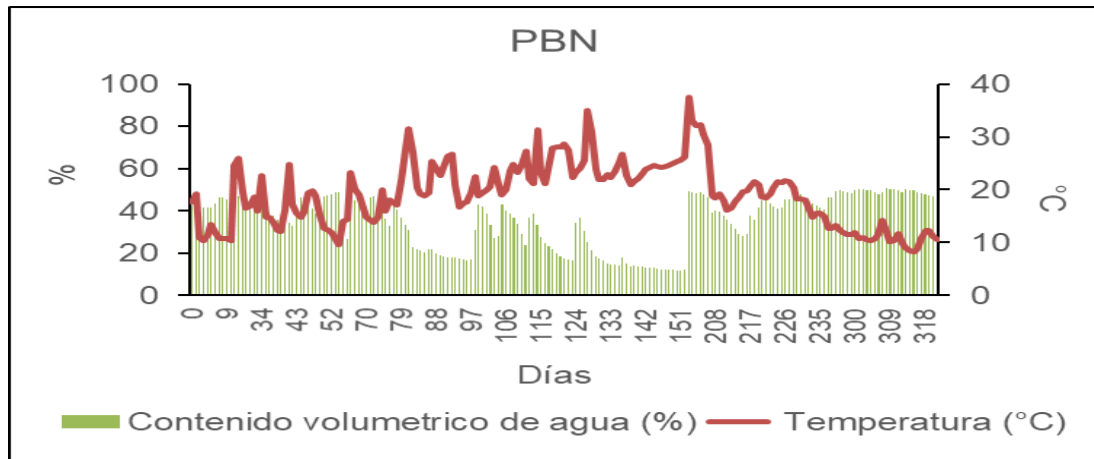


Figura 8. Evolución del contenido de agua volumétrico y temperatura del suelo durante el período experimental para PBN.

En el sitio PAN (Figura 9) el contenido volumétrico de agua del suelo fue de 29% con un máximo de 40,2% y mínimo de 19,7%. La temperatura promedio del suelo fue de 16,2°C y varió entre 6,4°C y 19°C.

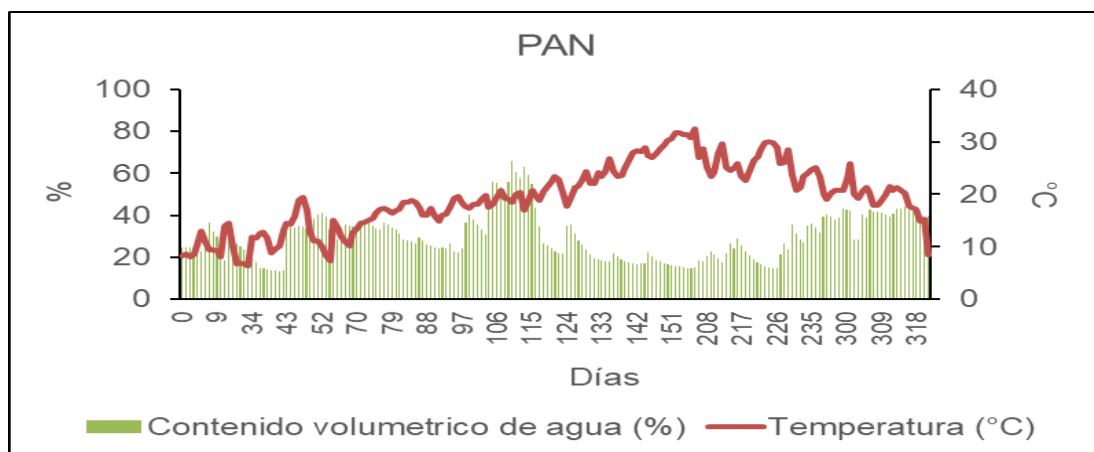


Figura 9. Evolución del contenido de agua volumétrico y temperatura del suelo durante el período experimental para PAN.

3.2 NH_4^+ , NO_3^- , N TOTAL Y pH DEL SUELO

Los cambios en la concentración de N-NH_4^+ del suelo en los sitios experimentales PAN y PBN se observan en las figuras 10 y 11, respectivamente. En el experimento PAN, tanto la aplicación de orina como la aplicación de Orina+DCD produjeron un incremento en las concentraciones de N-NH_4^+ en el suelo. Entre los días 0 y 14 después de aplicados los tratamientos, la concentración de N-NH_4^+ del suelo aumentó de 15,7 a 129,5 $\mu\text{g N-NH}_4^+/\text{g}$ de suelo en el tratamiento Orina, y de 25,41 a 185 $\mu\text{g N-NH}_4^+/\text{g}$ de suelo en Orina+DCD. No se observaron cambios en la concentración de N-NH_4^+ en el suelo en el tratamiento Control en la PAN. Se observaron diferencias estadísticas ($P < 0,05$) entre los tratamientos Orina y Orina+DCD y el tratamiento Control en el día 14 y entre el tratamiento Orina+DCD y el tratamiento control en el día 28 después de la aplicación de los tratamientos. El efecto inhibitorio sobre la nitrificación del DCD favoreció el aumento de la concentración NH_4^+ en el suelo en un 30,1 % respecto al tratamiento en que solo se aplicó orina. La concentración de N-NH_4^+ en el ensayo PAN de los tratamientos Orina y Orina+DCD regreso a valores similares al tratamiento Control aproximadamente a los 78 días después del inicio del ensayo.

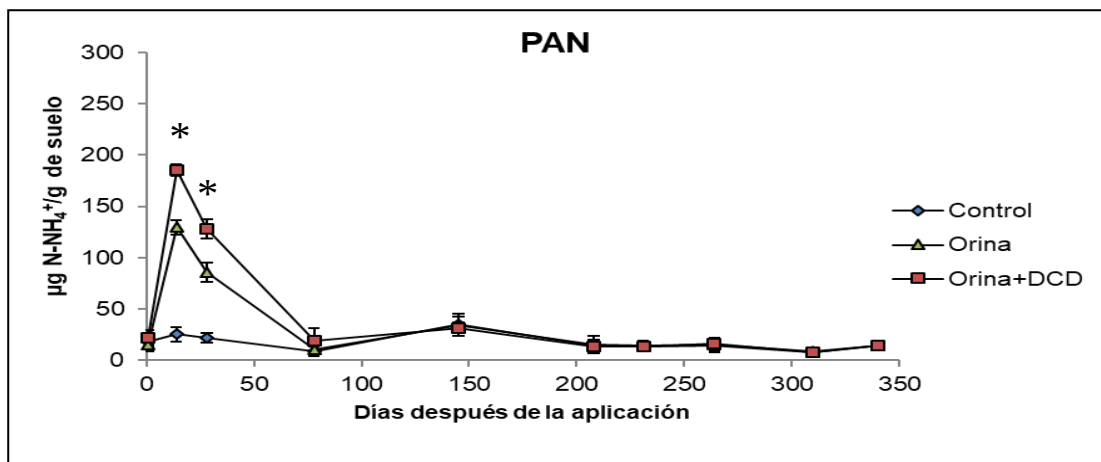


Figura 10. Concentración de N-NH_4^+ en suelo del sitio experimental PAN para los tratamientos Control, Orina y Orina + DCD. Cada punto representa la media de cuatro replicas para cada muestreo y las barras de error corresponden a la desviación estándar. * indica diferencias estadísticas entre los tratamientos según test de LSD Fisher ($p < 0,05$).

En el sitio PBN la concentración de N-NH_4^+ en el suelo aumento con la aplicación de Orina. En el tratamiento donde solo se aplicó Orina aumento de 17,9 a 169,5 $\mu\text{g N-NH}_4^+/\text{g}$ de suelo desde el día 0 al 14 y en el tratamiento Orina+DCD aumento de 27,4 a 243,7 $\mu\text{g N-NH}_4^+/\text{g}$ de suelo desde el día 0 al 14. Además, se observó en el ensayo PBN que en el día 14 los tres tratamientos fueron estadísticamente diferentes ($P < 0,05$) y en el día 28 los tratamientos Orina+DCD y el tratamiento control fueron estadísticamente diferentes. ($P < 0,05$). Al igual que en el ensayo PAN en el ensayo PBN, no se observaron cambios en la concentración de N-NH_4^+ en el suelo en el tratamiento control durante el periodo donde se realizaron las mediciones. El efecto inhibitorio de la nitrificación del DCD en el ensayo PBN produjo que la concentración de N-NH_4^+ en el suelo aumentara en un 30,1 % en el tratamiento Orina+DCD con respecto al tratamiento que solo se le aplico orina. Además, se observó que las concentraciones de N-NH_4^+ de los tratamientos Orina y Orina+DCD para el ensayo PBN regresaron a valores

similares al tratamiento control a los 78 días después de la aplicación de los tratamientos.

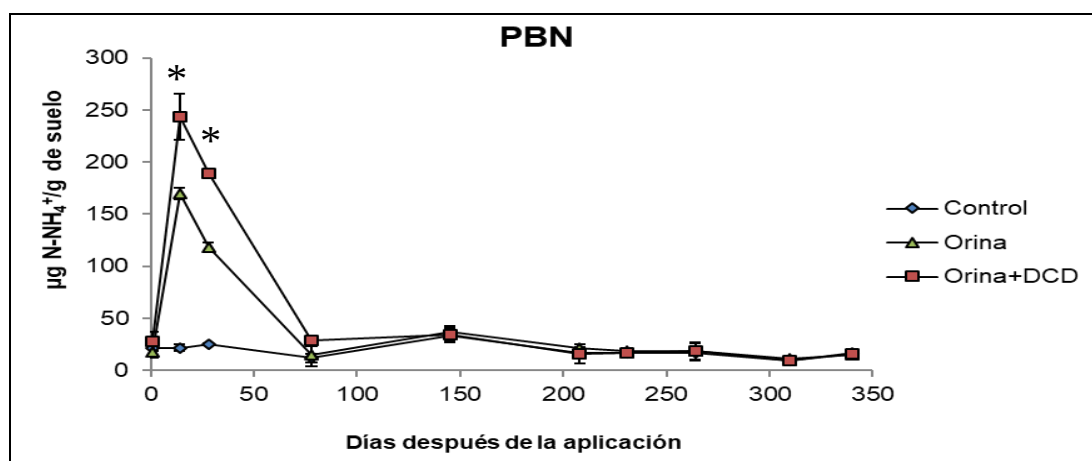


Figura 11. Concentración de NH_4^+ del suelo de la PBN tratados con Control, Orina y Orina + DCD. Cada punto representa la media de cuatro replicas para cada muestreo y las barras de error corresponden a la desviación estándar. * indica diferencias estadísticas entre los tratamientos según test de LSD Fisher ($p < 0,05$).

Los cambios en la concentración de N-NO_3^- en los sitios experimentales PAN y PBN se observan en las figuras 12 y 13, respectivamente. A partir de los resultados obtenidos en el ensayo PAN, se pudo observar que la aplicación de la orina sin el inhibidor de la nitrificación produjo que la concentración de N-NO_3^- en el suelo aumentara antes que en el tratamiento donde se aplicó Orina+DCD. La concentración de N-NO_3^- en el suelo del tratamiento Orina aumento de 13,11 $\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{g de suelo}$ a 49,20 $\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{g de suelo}$ desde el día 0 al día 14, en cambio, la aplicación de Orina con inhibidor de la nitrificación (Orina+DCD), retraso la transformación NH_4^+ a NO_3^- en el suelo, observándose que la concentración de N-NO_3^- en el suelo durante los primeros 28 días fue similar al tratamiento control. La mayor concentración de N-NO_3^- en el suelo para el tratamiento Orina+DCD fue a los 78 días, con una concentración de 72,71 $\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{g de suelo}$. En

el ensayo PAN se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el tratamiento Orina y los tratamientos Control y Orina+DCD en el día 14 y entre los tratamientos Control y Orina el día 28. Además, se observó que las concentraciones de N-NO_3^- en el suelo de los tratamientos Orina y Orina+DCD en el ensayo PAN regresaron a valores similares a los iniciales aproximadamente a los 145 días después de la aplicación de los tratamientos.

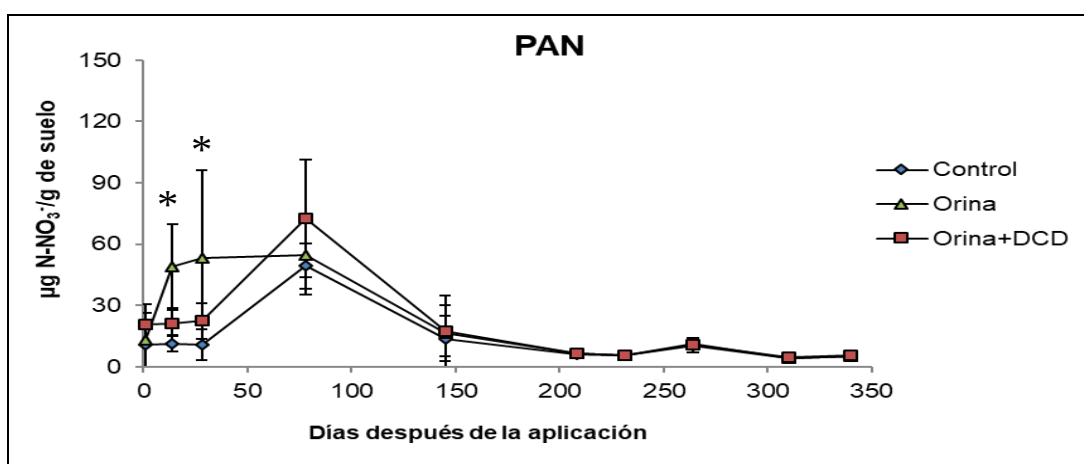


Figura 12. Concentración de NO_3^- para los suelos de PAN tratados con Orina y Orina+DCD. Cada punto representa la media de cuatro replicas para cada muestreo y las barras de error corresponden a la desviación estándar. * indica diferencias estadísticas entre los tratamientos según test de LSD Fisher ($p < 0,05$).

El efecto de la aplicación de Orina con y sin el inhibidor de la nitrificación sobre la concentración de N-NO_3^- en el suelo en el ensayo PBN siguió una tendencia similar a lo observado en el ensayo PAN. En la PBN se observó que la aplicación al suelo de Orina sin el DCD produjo que la concentración de N-NO_3^- en el suelo aumentara antes que en el tratamiento donde se aplicó la orina junto al inhibidor de la nitrificación. La concentración de N-NO_3^- en el suelo en el tratamiento Orina aumento de $18,8 \mu\text{g N-NO}_3^-/\text{g}$ de suelo a $42,83 \mu\text{g N-NO}_3^-/\text{g}$ de suelo desde el día 0 al día 14, llegando a

su máxima concentración el día 78 con 67,5 $\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{g}$ de suelo. En cambio, en el tratamiento Orina+DCD, la aplicación del inhibidor de la nitrificación retraso la transformación NH_4^+ a NO_3^- en el suelo, observándose que la concentración de N-NO_3^- en el suelo durante los primeros 28 días fueron similares al tratamiento control.

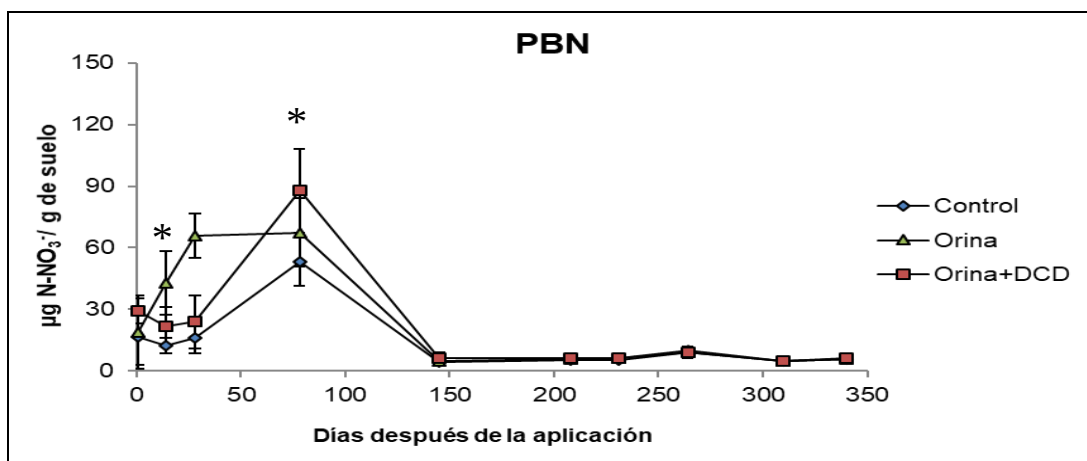


Figura 13. Concentración de NO_3^- para los suelos PBN tratados con Orina y Orina+DCD. Cada punto representa la media de cuatro replicas para cada muestreo y las barras de error corresponden a la desviación estándar. * indica diferencias estadísticas entre los tratamientos según test de LSD Fisher ($p < 0,05$).

La mayor concentración de N-NO_3^- en el suelo para el sitio PBN se obtuvo en el tratamiento Orina+DCD el día 78, con una concentración de 87,7 $\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{g}$ de suelo. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el tratamiento Control y Orina el día 14, y entre el tratamiento Control y Orina+DCD el día 78. Además, se observó que las concentraciones de N-NO_3^- en el suelo de los tratamientos Orina y Orina+DCD en el ensayo PBN regresaron a valores similares a los iniciales aproximadamente a los 145 días después de la aplicación de los tratamientos.

El efecto la aplicación de Orina y de Orina+DCD sobre el pH del suelo en el sitio PAN y PBN se observan en las figuras 14 y 15, respectivamente. En el ensayo PAN la aplicación al suelo de orina con y sin el inhibidor de la nitrificación produjo que el pH del suelo aumentara, a diferencia del tratamiento Control donde el pH disminuyo. En el ensayo PAN el pH del suelo del tratamiento Orina aumento de 5,8 a 6,0 desde el día 0 al 14, en cambio la aplicación de Orina más el DCD provoco que el pH del suelo aumentara más que en el tratamiento donde solo se aplicó orina, pasando de 5,8 a 6,1 desde el día 0 al 14, observándose diferencias estadísticas entre los tratamientos Control y Orina+DCD el día 14. El pH del suelo de los tratamientos Orina y Orina+DCD del ensayo. PAN llegaron a valores similares al tratamiento control después de día 28 desde de la aplicación de los tratamientos al suelo.

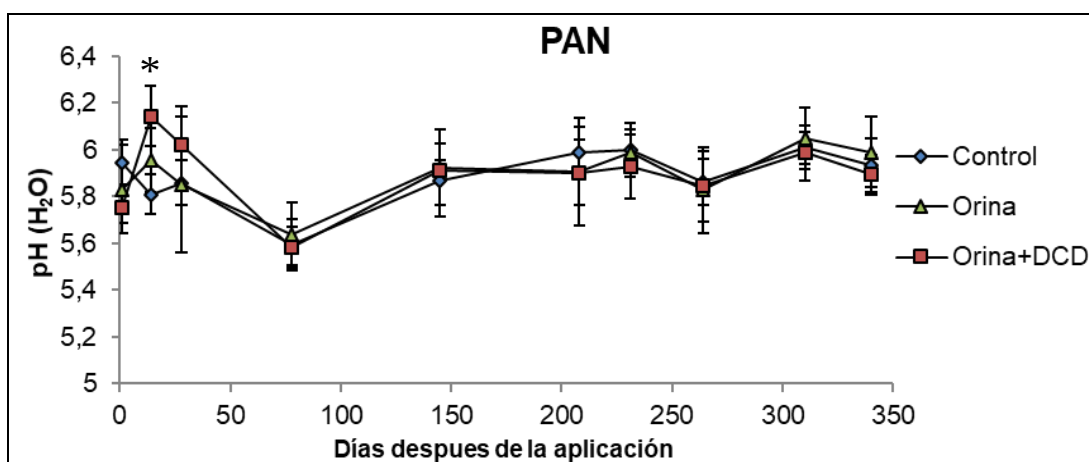


Figura 14. pH del suelo del ensayo PAN tratados con Orina y Orina + DCD. Cada punto representa la media de cuatro replicas para cada muestreo y las barras de error corresponden a la desviación estándar. * indica diferencias estadísticas entre los tratamientos según test de LSD Fisher ($p < 0,05$).

En el ensayo PBN, las variaciones en el pH del suelo siguieron una tendencia similar a lo observado en el ensayo PAN. En el ensayo PBN el pH del suelo del tratamiento Orina aumento de 5,8 a 6,01 desde el día 0 al 14,

en cambio la aplicación de Orina más el DCD provoco que el pH del suelo aumentara más que en el tratamiento donde solo se aplicó orina, pasando de 5,7 a 6,2 desde el día 0 al 14. Además, en el ensayo PBN se observó en el día 14 que los tres tratamientos fueron estadísticamente distintos ($P < 0,05$). Además, se observó que el pH del suelo de los tratamientos Orina y Orina+DCD del ensayo PBN llegaron a valores similares al tratamiento control después de día 28 desde de la aplicación de los tratamientos al suelo.

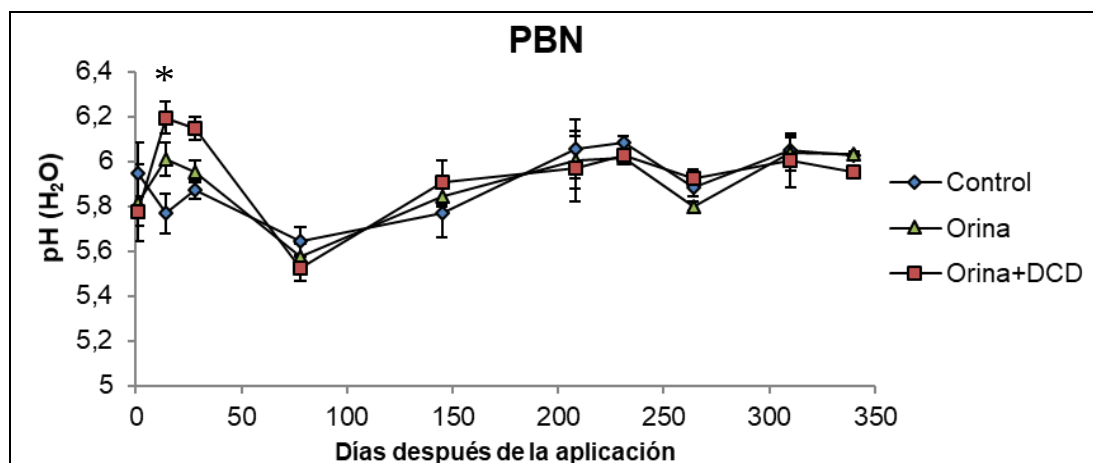


Figura 15. pH del suelo del ensayo PBN tratados con Orina y Orina + DCD. Cada punto representa la media de cuatro replicas para cada muestreo y las barras de error corresponden a la desviación estándar. * indica diferencias estadísticas entre los tratamientos según test de LSD Fisher ($p < 0,05$).

No se observó un efecto de la aplicación de Orina y de Orina más el inhibidor de la nitrificación sobre el contenido de N total del suelo tanto en el ensayo PAN y PBN (figuras 16 y 17, respectivamente). El nitrógeno total promedio en la PAN durante los primeros 145 días fue de 0,29%, en cambio en la PBN el nitrógeno total del suelo en promedio tuvo un valor aproximado de 0,44%. Si se observó un aumento del N total (%) del suelo tanto para el PAN y la PBN, desde la primera medición al 14 después del inicio del

ensayo, el aumento en la concentración de N del suelo fue independiente a la aplicación de Orina y del inhibidor de la nitrificación al suelo.

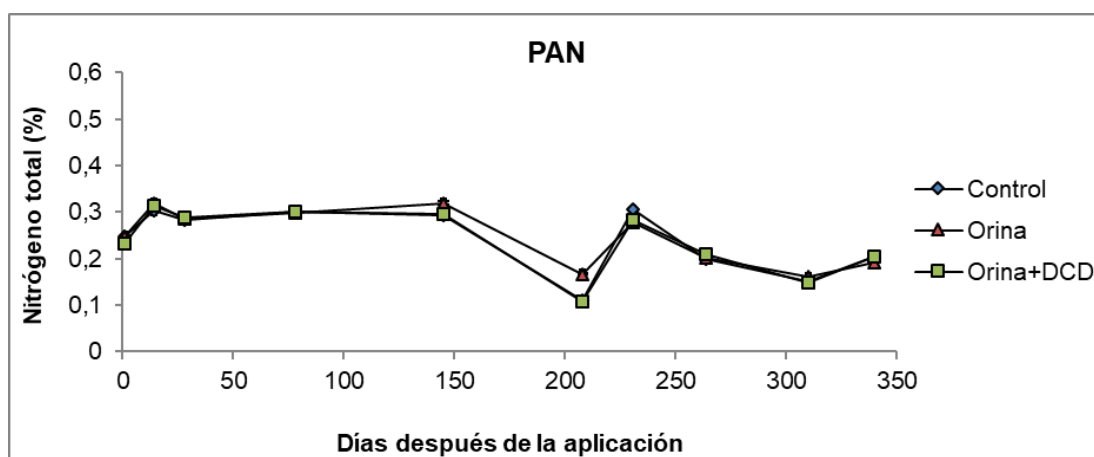


Figura 16. Nitrógeno total (%) del suelo de PAN tratados con Orina y Orina + DCD. Cada punto representa la media de cuatro replicas para cada muestreo y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

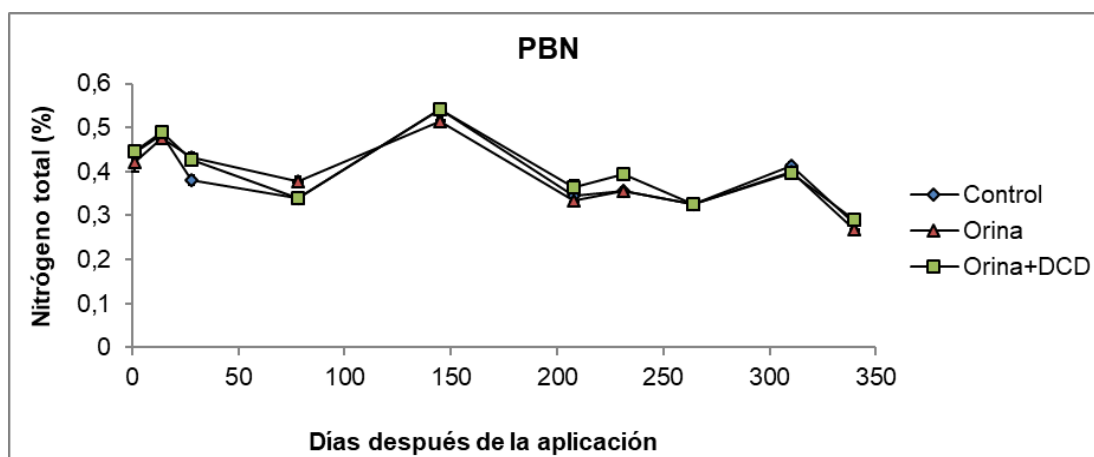


Figura 17. Nitrógeno total (%) del suelo de PBN tratados con Orina y Orina + DCD. Cada punto representa la media de cuatro replicas para cada muestreo y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

3.3. CONTENIDO DE NITRÓGENO Y RENDIMIENTO DE LA PASTURA

El contenido de N de la pastura de los sitios experimentales PAN y PBN se observa en la figura 18 y 19, respectivamente. El contenido promedio inicial de N en PAN, fue 3,4 %. La aplicación de Orina y Orina+DCD produjeron un aumento en el contenido de N% de la pastura. El contenido inicial de la PAN fue de 2,9 % de N en el tratamiento Orina y la aplicación de esta provoco que aumentara a un 3,5 % de N al día 14, llegando a su máximo el día 28 con un contenido de 4,4% N. La aplicación de Orina+DCD en la PAN produjo una disminución en el contenido de N de la pastura, la PAN tuvo un contenido inicial de N de 3,4%, y después de la aplicación de la Orina+DCD disminuyo a 2,7% de N. A partir del día 14 comenzó a aumentar el contenido de N, llegando a su máximo el día 28, con un contenido de N de 4,4%. En la PAN fueron estadísticamente distintos ($P>0,05$), el tratamiento Control a los tratamientos Orina y Orina+DCD el día 28 después de ampliación de los tratamientos.

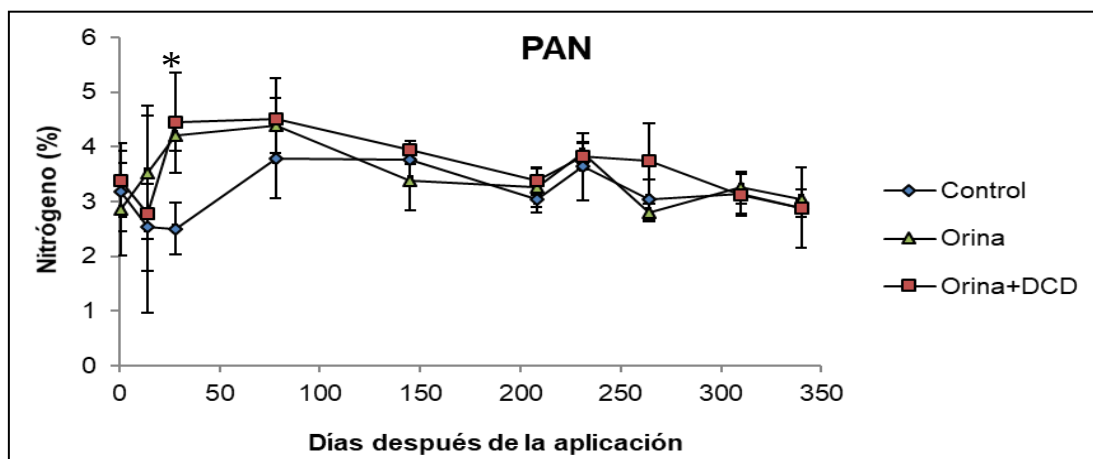


Figura 18. Nitrógeno (%) de la pastura del sitio PAN tratadas con Orina y orina + DCD. Cada punto representa la media de cuatro replicas para cada muestreo y las barras de error corresponden a la desviación estándar. * indica diferencias estadísticas entre los tratamientos según test de LSD Fisher ($p<0,05$).

El contenido de N (%) promedio al inicio del ensayo de la PBN, la cual se encontraba dominada por *Cynodon dactylon*, fue de un 1,5 %. En el día 14 después de la aplicación de los tratamientos se observó un aumento en el contenido de N % en los tres tratamientos, el mayor contenido de N (%) se observó en el tratamiento Orina+DCD, con un valor de 3,1 %, el cual fue estadísticamente diferente ($P>0,05$) al tratamiento Orina, quien fue el que presentó un menor contenido de N con un 2,2 %. Los mayores contenidos de N en la PBN se observaron en el día 78 con una concentración de 4,17% y 4,16% para los tratamientos Orina+DCD y Orina respectivamente, siendo estadísticamente diferentes al tratamiento Control ($P>0,05$), que presentó un contenido de N de 3,2%. Aproximadamente después de 4 meses el contenido de N de la PBN de los tratamientos Orina y Orina+DCD regresaron a valores similares al del tratamiento Control.

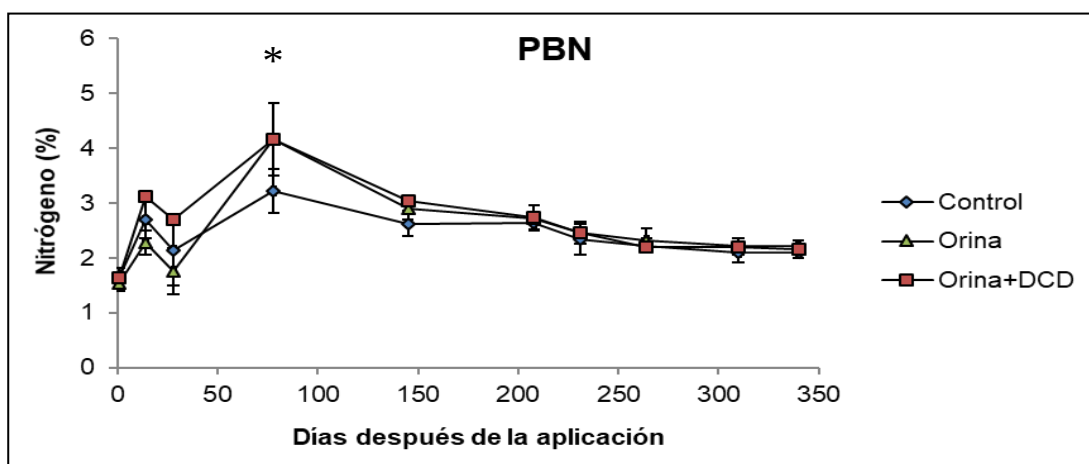


Figura 19. Nitrógeno (%) de la pastura del sitio PBN tratadas con Orina y Orina+DCD. Cada punto representa la media de cuatro replicas para cada muestreo y las barras de error corresponden a la desviación estándar. * indica diferencias estadísticas entre los tratamientos según test de LSD Fisher ($p<0,05$).

El efecto de la aplicación de Orina con y sin la aplicación del inhibidor de la nitrificación sobre el rendimiento de la PAN y la PBN se observa en la figura 20 y 21 respectivamente. No se observó una respuesta de la aplicación de Orina y Orina+DCD sobre el rendimiento ($\text{kg MS}^* \text{ ha}^{-1}$) tanto en la PBN como en la PAN. El rendimiento de la PAN fue más variable que en la PBN, el máximo rendimiento para la PAN fue a los 78 días, y sus rendimientos variaron entre 492 a $616 \text{ kg MS}^* \text{ ha}^{-1}$, en cambio en la PBN durante los primeros 78 días el rendimiento se mantuvo más constante, variando entre 315 a $386 \text{ kg MS}^* \text{ ha}^{-1}$. El rendimiento máximo de la PAN fue en un 37,7% mayor que el rendimiento máximo de la PBN.

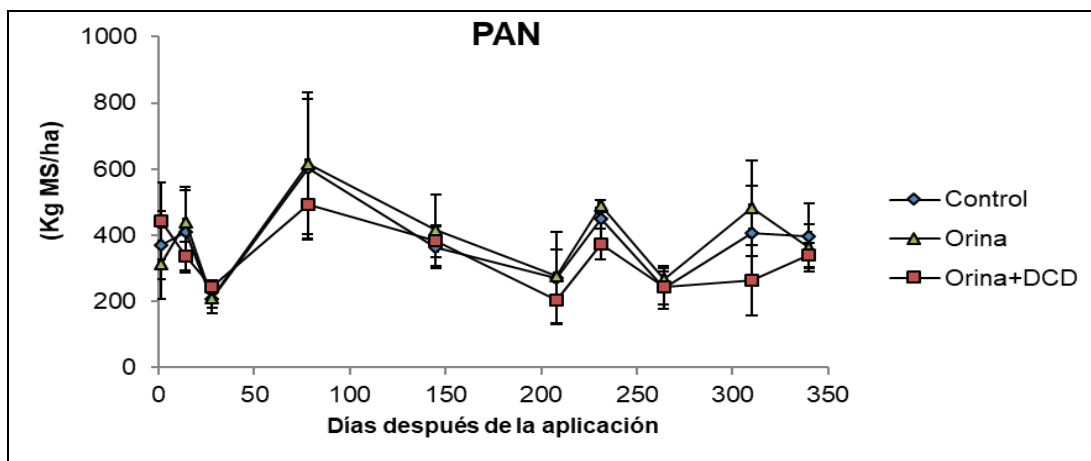


Figura 20. Rendimiento (kg MS/ha) de la PAN para los tratamientos Control, Orina y Orina+DCD. Cada punto representa la media de cuatro replicas para cada muestreo y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

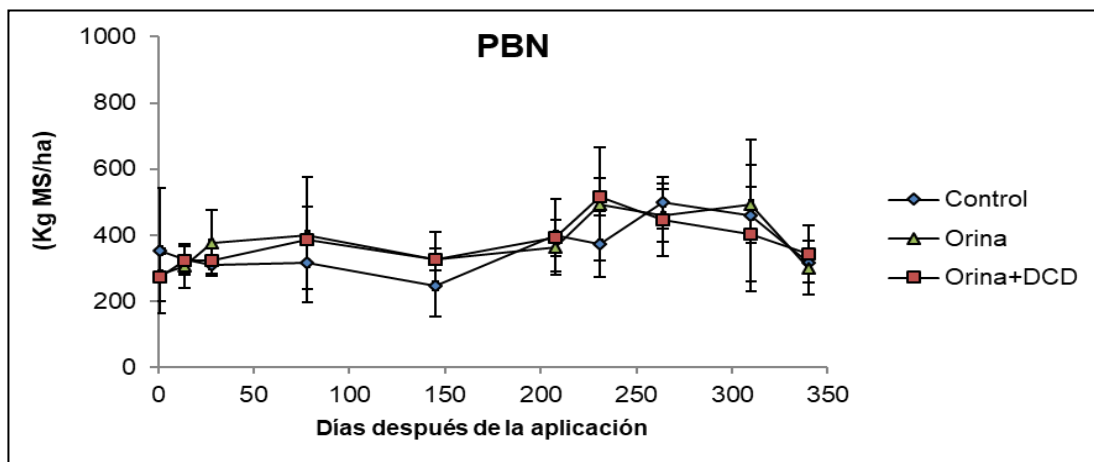


Figura 21. Rendimiento (kg MS/ha) de la PBN para los tratamientos Control, Orina y Orina+DCD. Cada punto representa la media de cuatro replicas para cada muestreo y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

3.4. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LAS VARIABLES DEL SUELO Y DE LA PASTURA

Las relaciones entre las variables de suelo (NO_3^- , NH_4^+ ; pH y nitrógeno), y de la pastura (nitrógeno y materia seca, MS) asociadas a cada tratamiento (C; Control, O; Orina y O+DCD) se compararon mediante un análisis de componentes principales (ACP) en cada sitio experimental y para cada día de medición.

Para la PBN (Figura 22) el componente principal 1 (CP1) y el componente principal 2 (CP2) permitieron visualizar un 65 % de la variabilidad de los datos.

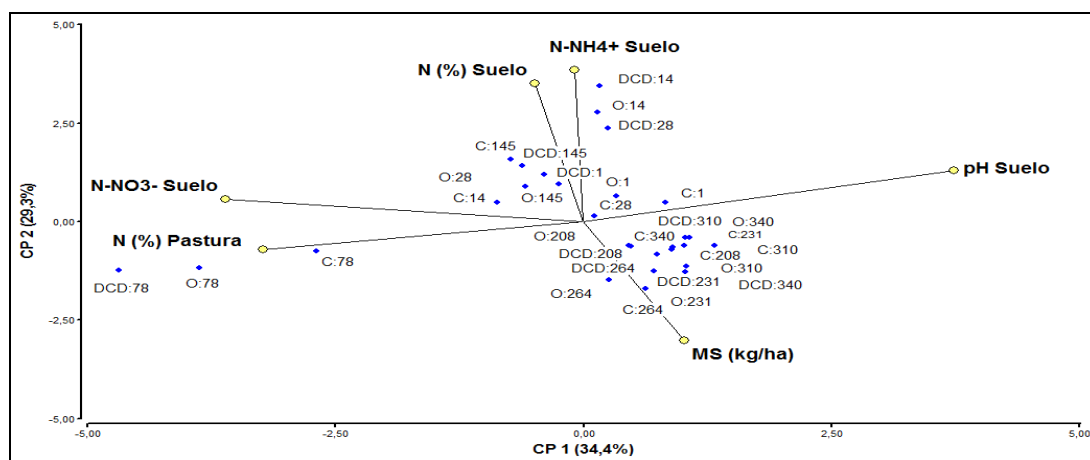


Figura 22. Análisis de componentes principales para variables del suelo y la pastura en el sitio experimental PBN. Variables del suelo son el contenido de N-NO₃⁻ y N-NH₄⁺; pH del suelo; N: nitrógeno (%), las variables de la pastura: MS: materia seca (kg/ha), N: nitrógeno (%). Muestras: representan los tratamientos, C; Control, O; Orina y O+DCD, cada tratamiento se encuentra asociado a un día de muestreo.

En el CP1 (34,4%) se observó una correlación entre la concentración de N-NO₃⁻ del suelo y el contenido de N (%) de la pastura, y estas dos variables se asociaron negativamente al pH del suelo. Además, el CP1 permitió agrupar a los tres tratamientos (C, O, O+DCD) en el día 78 después de la aplicación de la orina y el inhibidor de la nitrificación separándolos del resto de las mediciones. El CP2 (29,3%) asoció las variables N-NH₄⁺ y N (%) del suelo y las asoció a la MS (kg/ha) de la pradera. Además, el CP2 permitió agrupar los datos de los 3 tratamientos desde el día 1 hasta el día 145 de medición (con excepción del día 78) después de la aplicación de los tratamientos. El CP2, además, permitió agrupar los datos de los tratamientos para mediciones posteriores a los 145 días.

En el sitio experimental PAN (Figura 23) tanto el CP1 como el CP2 permiten explicar el 69,5 % de la variabilidad de los datos. El CP1 (44,3%) permitió asociar positivamente el N (%) y el contenido de NO₃⁻ del suelo con el contenido de N y la MS de la pastura, mientras que las asoció negativamente al pH del suelo. Además, el CP1 permitió agrupar a los tres

tratamientos (C, O, O+DCD) en el día 78. El ACP permitió agrupar los datos de los 3 tratamientos desde el día 14 hasta el día 145 de medición en el CP1, con excepción de los datos de los tratamientos del día 231 y el tratamiento O+DCD del día 1. El CP2 (25,2%) del ACP de la PAN asoció el N y la MS de la pastura, y las asoció al pH y a la concentración de NH_4^+ del suelo. Además, permitió separar el punto del tratamiento O+DCD del día 14 del resto de las mediciones.

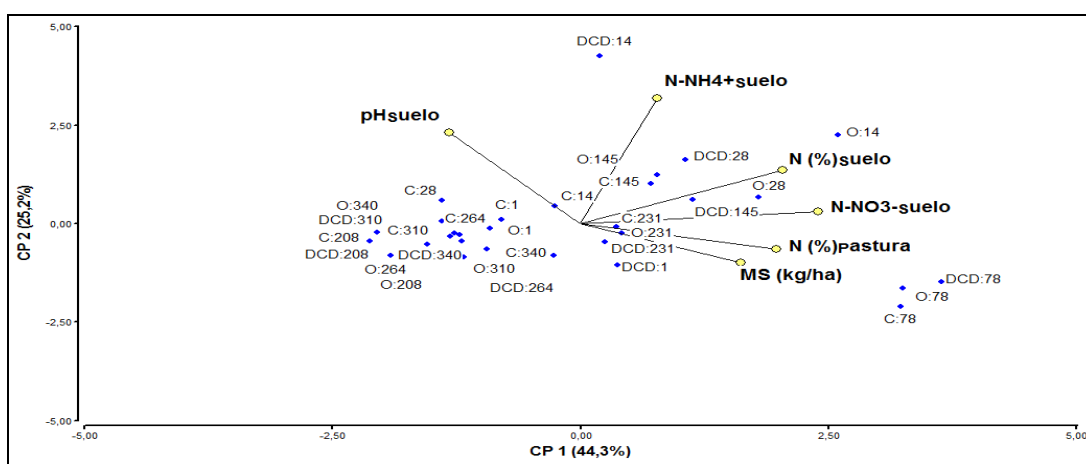


Figura 23. Análisis de componentes principales para variables del suelo y la pastura en el sitio experimental PAN. Variables del suelo son el contenido de N-NO_3^- y N-NH_4^+ ; pH del suelo; N: nitrógeno (%), las variables de la pastura: MS: materia seca (kg/ha), N: nitrógeno (%). Muestras: representan los tratamientos, C; Control, O; Orina y DCD; Orina+DCD, cada tratamiento se encuentra asociado a un día de muestreo.

3.5. EMISIONES DE N_2O

El efecto de la aplicación de Orina y de Orina+DCD sobre la emisión de N_2O en los sitios experimentales PAN y PBN se pueden observar en las Figura 24 y 25, respectivamente. Solo se observó un pico de emisión para el ensayo PAN asociado a la aplicación de Orina, en el día 26 después de la aplicación de los tratamientos, con flujos que alcanzaron $177,9 \text{ g N-N}_2\text{O ha}^{-1}$

día⁻¹ para el tratamiento Orina y 79,52 g N-N₂O ha⁻¹ día⁻¹ para el tratamiento Orina+DCD. La aplicación de Orina, con y sin el inhibidor de la nitrificación significó un aumento en el flujo de N₂O desde el suelo, pero el uso del inhibidor permitió disminuir las emisiones con respecto al tratamiento orina en un 55.3 % el flujo de N₂O en el día 26 para el ensayo PAN. No se observaron picos de emisión para el tratamiento control en la PAN, las emisiones desde el tratamiento Control fueron un 94,5% y 93,3% menor respectivamente que los tratamientos Orina y Orina+DCD para el día 28 de muestreo, que fue el día donde observó el máximo flujo de N₂O en la PAN.

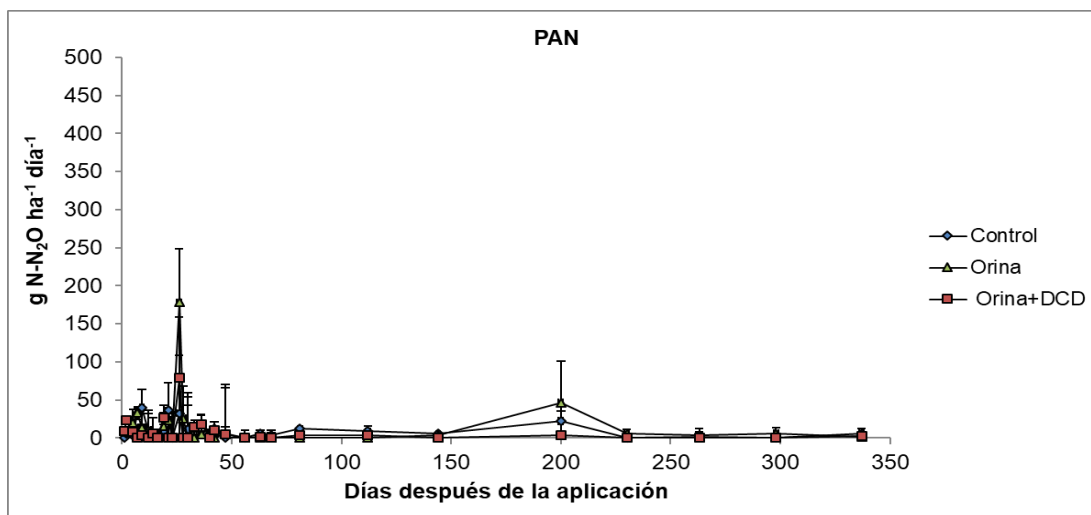


Figura 24. Emisiones de N₂O desde el sitio experimental PAN para los tratamientos Control, Orina y Orina+DCD. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

A partir de los flujos de N₂O obtenidos desde la PBN, se observaron 3 picos de emisión asociados a la aplicación de Orina y Orina+DCD, que corresponden a los días 9, 28 y 47 después de la aplicación de los tratamientos, los flujos de N₂O el día 9 alcanzaron valores de 66,6 g N-N₂O ha⁻¹ día⁻¹ para el tratamiento Orina y 100,9 g N-N₂O ha⁻¹ día⁻¹ para el tratamiento Orina+DCD, el segundo pico de emisión (día 28) los flujos de N₂O alcanzaron valores de 400,6 g N-N₂O ha⁻¹ día⁻¹ para el tratamiento Orina

y de 332,4 g N-N₂O ha⁻¹ día⁻¹ para el tratamiento Orina+DCD, y el tercer pico de emisión de N₂O (día 47) registro flujos que alcanzaron 252,23 g N-N₂O ha⁻¹ día⁻¹ para el tratamiento Orina y de 206,67 g N-N₂O ha⁻¹ día⁻¹ para el tratamiento Orina+DCD. La aplicación de Orina, con y sin el inhibidor de la nitrificación significó un aumento en el flujo de N₂O desde el suelo, pero el uso del inhibidor en el ensayo PBN permitió disminuir las emisiones con respecto al tratamiento Orina en un 18% y 18,3% los días 28 y 47 respectivamente, después de la aplicación de los tratamientos. No se observaron picos de emisión para el tratamiento Control en la PBN, las emisiones de N₂O del tratamiento control desde la PBN fueron 87,1% y 84,2% menor que los tratamientos Orina y Orina+DCD respectivamente para el día de máximo flujo de N₂O (día 28).

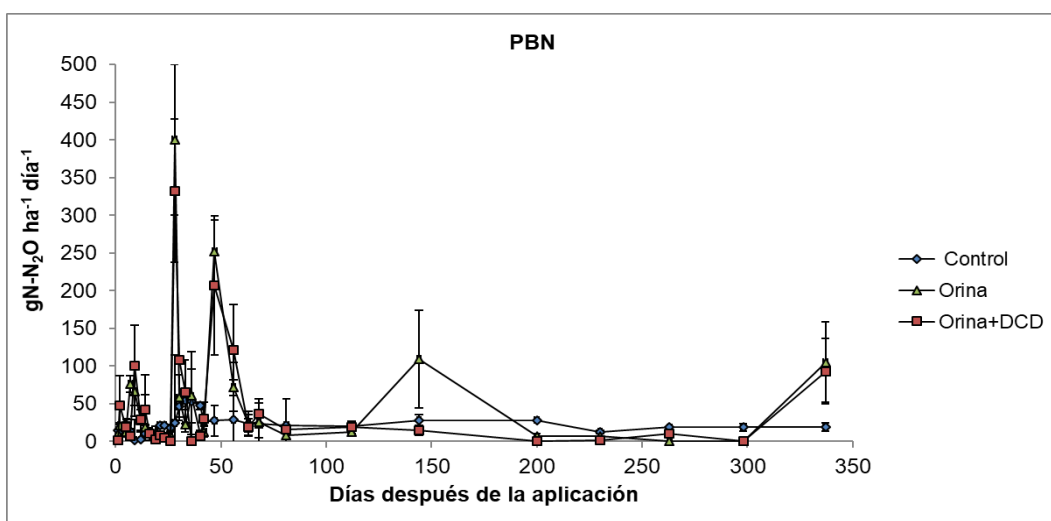


Figura 25. Emisiones de N₂O desde la PBN tratada con Orina y Orina + DCD. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

El flujo acumulado de N₂O calculado a partir de los datos de las emisiones de N₂O obtenidos durante un año de mediciones tanto para la PBN y PAN se observan en la figura 26 y 27 respectivamente. De los resultados obtenidos del cálculo del flujo acumulado de N₂O, se puede observar que el flujo de N₂O desde la PBN y la PAN fue mayor en el

tratamiento Orina, lo que indica que la aplicación de orina produce un aumento del flujo acumulado de un 24,2% para la PAN y de un 31,2% en el PBN.

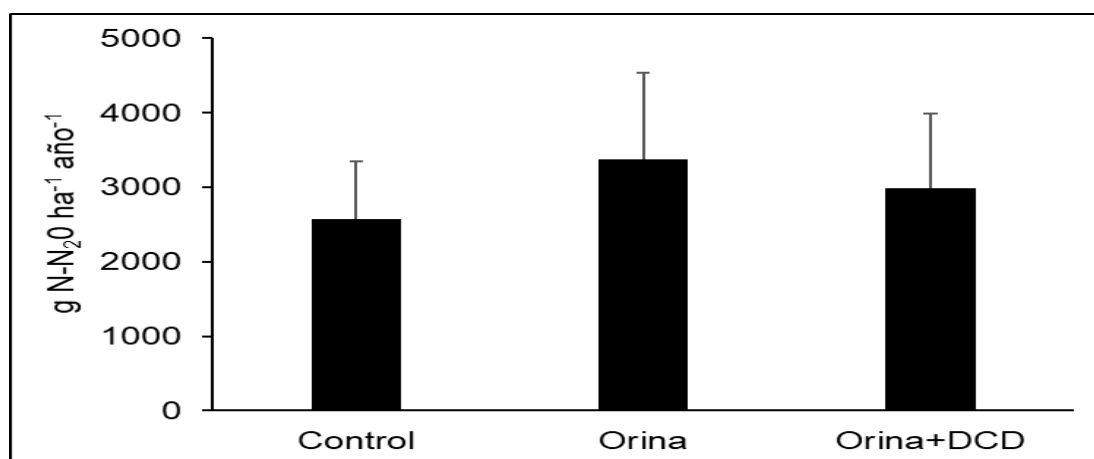


Figura 26. Flujo Acumulado de N₂O durante un periodo de 60 días en la PBN tratados con Orina y Orina+DCD. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

La aplicación del inhibidor de la nitrificación (DCD) junto a la orina produjo una disminución del flujo acumulado de N₂O de un 31% para la PAN y de un 32% en la PBN. En ambos ensayos (PBN y PAN) no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos.

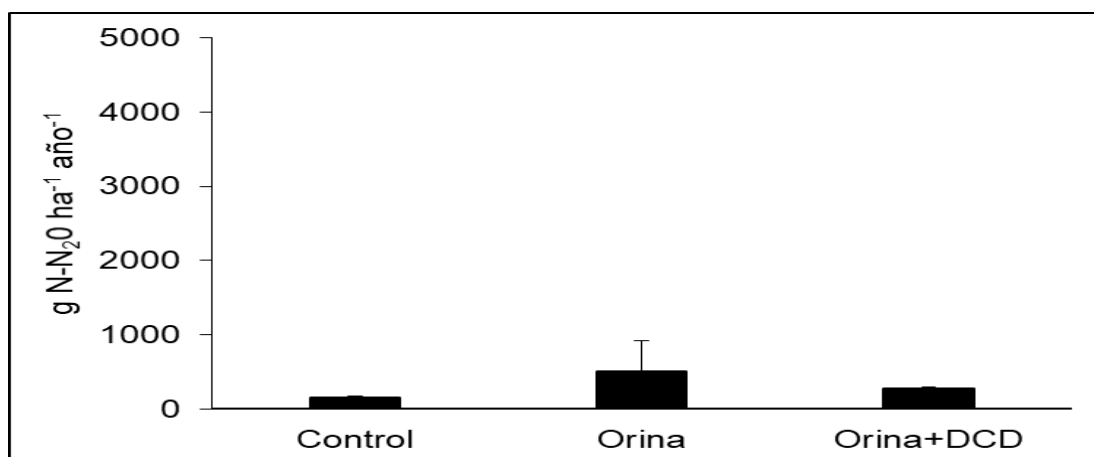


Figura 27. Flujo Acumulado de N₂O durante un periodo de 60 días en la PAN tratados con Orina y Orina+DCD. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

El factor de emisión calculado para los sitios PBN y PAN se observan en la Figura 28. Los resultados fueron obtenidos a partir de los datos del flujo acumulado a los 60 días, el factor de emisión del tratamiento Orina del sitio PBN fue mayor al factor de emisión del tratamiento Orina+DCD. Al igual al sitio PAN el factor de emisión del tratamiento Orina fue mayor al tratamiento Orina+DCD. Sin embargo, los factores de emisión de los tratamientos Orina y Orina+DCD del sitio PAN fueron menores a los tratamientos Orina y Orina+DCD del sitio PBN.

	Factor de emisión N-N ₂ O (%)	
	Orina	Orina+DCD
PBN	0,19	0,10
PAN	0,11	0,04

Figura 28. Factor de emisión del N₂O para el sitio PBN y PAN después de la aplicación de Orina y Orina+DCD a los 60 días después de la aplicación de los tratamientos.

3.6. ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD BACTERIANA DEL SUELO

El efecto de la aplicación de Orina y Orina+DCD al suelo sobre la estructura de la comunidad de bacterias del suelo durante 45 días, se puede observar en el dendograma y análisis de coordenadas principales generados a partir de los patrones de bandas observados en el DGGE, tanto para la PAN y la PBN en las figuras 29 y 30, respectivamente. El dendograma basado en los perfiles del DGGE para el sitio experimental PAN permitió analizar la estructura de la comunidad de bacterias. Los tratamientos Control, Orina y Orina+DCD para los tiempos T1 y T2, que corresponden a los días 1 y 15 respectivamente, se agruparon en un clúster con un porcentaje de similitud de $< 75\%$, y que además incluyó al tratamiento Orina T3 (30 días). El mismo efecto se observó en el análisis de coordenadas principales, que también permitió agrupar a todos los tratamientos pertenecientes a los tiempos T1 y T2 y los separó de todos los tratamientos que pertenecían a los tiempos T3 y T4, correspondientes a los días 30 y 45 respectivamente, con excepción del tratamiento Orina del T3.

Para el suelo de la PBN, se analizó también el efecto de los tratamientos sobre la estructura de la comunidad de bacterias a partir del dendograma generado analizando los perfiles obtenidos con la técnica DGGE. En este se observó un clúster con un % de similitud < 75 en que agrupa los tratamientos Control de los tiempos T1, T2 y T3 que corresponden a los días 1, 15 y 30 respectivamente, al tratamiento Orina en los tiempos T1 y T2, y al tratamiento Orina+DCD en el T1.

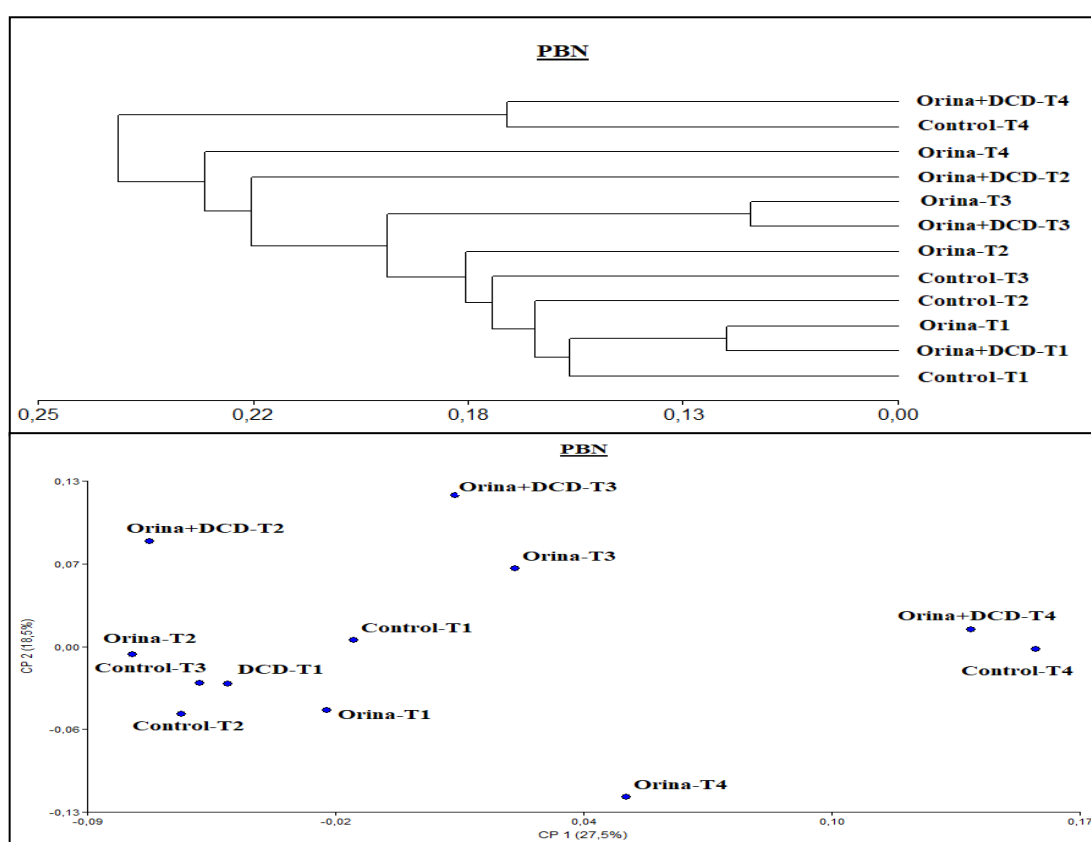


Figura 29. Efecto de la aplicación de Orina y DCD sobre la estructura de bacterias del suelo en la PAN visualizadas como un análisis de coordenadas principales y dendograma a partir del análisis de los perfiles del DGGE (gen 16S rRNA). Cada punto representa un tratamiento: Control, Orina y O+DCD, cada tratamiento se encuentra asociado a un día de muestreo (T): T1, T2, T3, T4, que corresponden a los días 1, 15, 30 y 45 respectivamente.

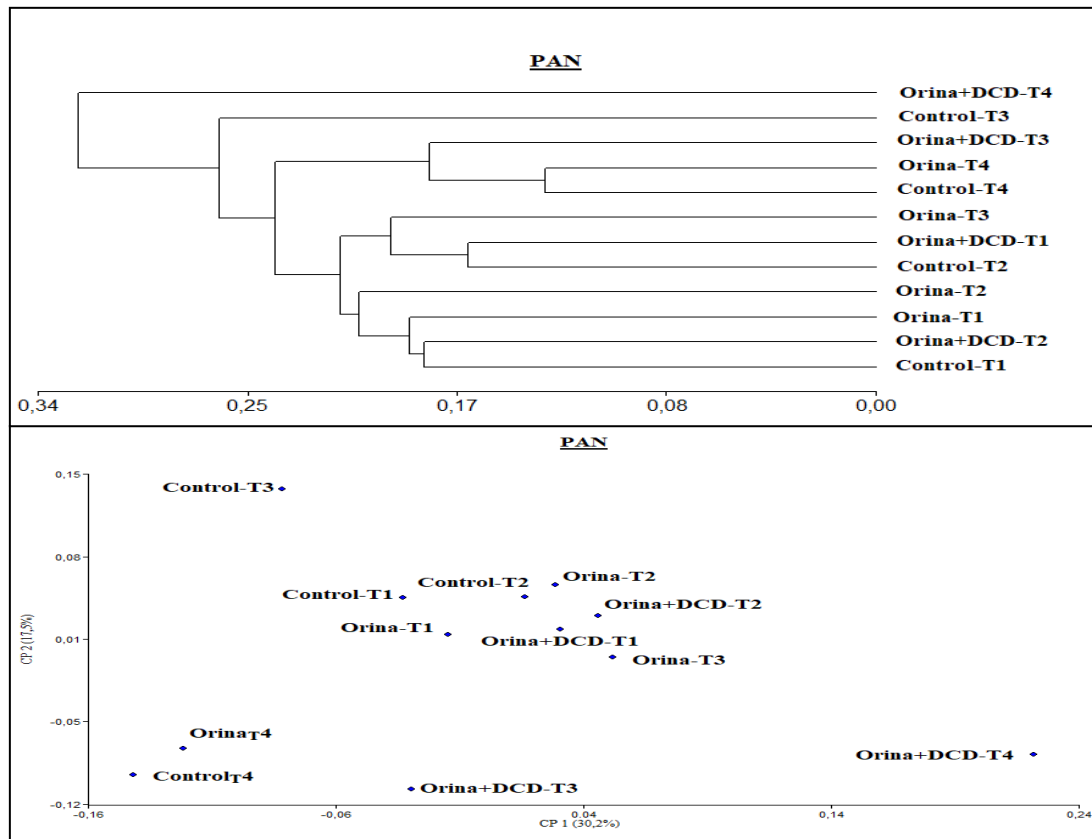


Figura 30. Efecto de la aplicación de Orina y DCD sobre la estructura de bacterias del suelo en la PBN visualizadas como un análisis de coordenadas principales y dendrograma a partir del análisis de los perfiles del DGGE (gen 16S rRNA). Cada punto representa un tratamiento: Control, Orina y O+DCD, cada tratamiento se encuentra asociado a un día de muestreo (T): T1, T2, T3, T4, que corresponden a los días 1, 15, 30 y 45 respectivamente.

Por otro lado, se agruparon en otro clúster los tratamientos Orina y Orina+DCD correspondientes al tiempo T3, que se separaron de los T4 de los tres tratamientos. En el análisis de coordenadas principales para PBN se observó el mismo efecto que en el dendrograma, donde se separan los T4 de los tres tratamientos del resto de las mediciones.

El efecto de la aplicación de Orina y de Orina más el inhibidor de la nitrificación (DCD) sobre la diversidad bacteriana del suelo fue determinada mediante los índices de dominancia de Simpson y el índice de diversidad de Shannon-Weiner, tanto para la PAN y la PBN (Cuadro 6).

Cuadro 6. Índice de Shannon-Wiener calculado desde la matriz obtenida en los análisis de los perfiles generados en el DGGE

Sitio	Tiempo	Tratamiento	Shannon_H
PAN	I	Control	3,62 a
		Orina	3,66 a
		Orina+DCD	3,69 a
	II	Control	3,64 a
		Orina	3,65 a
		Orina+DCD	3,57 a
	III	Control	3,40 a
		Orina	3,47 a
		Orina+DCD	3,48 a
	IV	Control	3,52 b
		Orina	3,53 b
		Orina+DCD	3,16 a
PBN	I	Control	3,51 a
		Orina	3,67 a
		Orina+DCD	3,63 a
	II	Control	3,60 a
		Orina	3,39 a
		Orina+DCD	3,43 a
	III	Control	3,29 a
		Orina	3,56 b
		Orina+DCD	3,57 b
	IV	Control	3,23 a
		Orina	3,47 a
		Orina+DCD	3,41 a

Letras distintas en cada sitio, PAN y PBN, indican diferencias estadísticas entre los tratamientos según test de LSD Fisher ($p < 0,05$). T1, T2, T3, T4, que corresponden a los días 1, 15, 30 y 45 respectivamente.

En la PAN no se observaron diferencia en los índices de diversidad durante los primeros 30 días entre los distintos tratamientos, sin embargo, en el tiempo 4 (45 días), se observó que el índice de diversidad para el

tratamiento Orina+DCD fue estadísticamente menor ($P<0,05$) a los tratamientos Orina y Control. Para la PBN el índice de diversidad de Shannon permitió observar diferencias entre los tratamientos, en el T3 (30 días), donde el tratamiento Control fue estadísticamente menor a los tratamientos Orina y Orina+DCD.

4. DISCUSIÓN

Las deposiciones de orina en suelos bajo pastoreo bovino tienen un importante rol sobre los flujos diarios de N_2O , y estas se encuentran muy influenciadas por factores ambientales, afectando la actividad de los microorganismos y el transporte de gases en el suelo (Cardenas et al., 2016). En suelos pastoriles el proceso de desnitrificación se considera la fuente más importante en la emisión de N_2O (Luo et al., 2016). Los factores que afectan más rápidamente a la comunidad de desnitrificantes del suelo son la concentración de NO_3^- , la humedad, la disponibilidad de carbono, la concentración de O_2 y la temperatura del suelo (Braker et al., 2010). El límite para que la desnitrificación pueda ser una fuente en el proceso de producción de N_2O es de un 60% WFPS, sin embargo, la mayor parte del nitrógeno de la orina se encuentra como urea (fuente de NH_4^+), por lo tanto, cuando la humedad del suelo es menor a un 60% WFPS, la nitrificación puede ser una importante fuente de N_2O (Carter, 2007).

En la PBN se observaron múltiples picos de emisión de N_2O , a los días 9, 28 y 47, después de la aplicación de Orina y Orina+DCD, a diferencia de la PAN donde solo se observó un pico de emisión el día 28. La posibilidad de múltiples picos de emisión de N_2O después de la aplicación de orina ha sido observado por otros autores (Barneze et al., 2015, Cardenas et al., 2016), además, ha sido reportado después de la aplicación de fertilizaciones nitrogenados (Krol et al., 2016, Saggar et al., 2004). En otros estudios, Marsden et al. (2016), planteo que se puede producir un flujo inicial de N_2O después de la aplicación de la orina como producto de la nitrificación, lo que posteriormente generaría varios picos de emisión de N_2O . Además, Luo et al. (2016), sugieren que la nitrificación puede tener un importante rol como fuente de emisión de N_2O desde suelos bajo pastoreo bovino. En el caso de la PBN el primer pico de emisión de N_2O se observó a los 9 días después de la aplicación de los tratamientos, este pudo estar asociado principalmente al proceso de nitrificación en el suelo, debido a que las concentraciones de

NO_3^- en el suelo todavía no se incrementaban después de la aplicación de orina, a la alta concentración inicial de NH_4^+ en el suelo en la PBN y al aporte de NH_4^+ producto de la hidrólisis de la urea que se encuentra en la orina. Además, estos resultados concuerdan lo visualizado en el ACP para la PBN, donde se observó una relación entre los distintos tratamientos y las variables N (%) y N- NH_4^+ del suelo, por lo tanto, en este caso el ACP sería una buena herramienta como método descriptivo de los factores que se encuentran influyendo en las emisiones de N_2O desde el suelo.

Los mayores flujos de N_2O obtenidos en este estudio se obtuvieron en el tratamiento Orina, tanto en la PAN (177,7 g N- N_2O ha⁻¹ día⁻¹) como en la PBN (400,4 g N- N_2O ha⁻¹ día⁻¹). En otra investigación realizada, Zaman y Blennerhassett (2010) determinaron que las máximas emisiones de N_2O asociadas a las manchas de orina fluctuaron entre 380 g N- N_2O ha⁻¹ día⁻¹ en mediciones realizadas en primavera y fueron de 950 g N- N_2O ha⁻¹ día⁻¹ en mediciones realizadas en otoño, además De Klein et al. (2011) determinó que los flujos máximos de N_2O asociadas a las manchas de orina durante el otoño fueron de 670 g N- N_2O ha⁻¹ día⁻¹. Los flujos máximos de N_2O se observaron en el segundo pico de emisión en la PBN (día 28), y que además coinciden con el pico de emisión de la PAN. El flujo de N_2O para este día, tanto para el PBN como PAN, estaría asociado a un patrón de precipitaciones (22,3 mm) y a un aumento en la concentración de NO_3^- del suelo principalmente en el tratamiento donde se aplicó orina sin el inhibidor de la nitrificación, estas dos condiciones favorecieron las mayores emisiones de N_2O para este día. Sin embargo, la emisión de N_2O de la PAN desde el tratamiento orina fue un 155,6% menor a la emisión de N_2O desde la PBN, las mayores emisiones desde el PBN pueden estar dadas por el mayor contenido volumétrico de agua y la mayor temperatura del suelo de acuerdo con los datos obtenidos en la PAN desde los sensores de humedad y temperatura del suelo. Otro factor que estaría contribuyendo a las mayores emisiones de N_2O desde el PBN son las grandes diferencias observados en el análisis suelo realizado para describir las condiciones iniciales de cada

sitio (PBN y PAN), donde el contenido de materia orgánica y la concentración de N-NO_3^- y N-NH_4^+ del suelo de la PBN, fueron aproximadamente 100 % mayores a la PAN. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para cada sitio experimental, Luo et al. (2010) sugieren que las emisiones de N_2O desde pasturas bajo pastoreo se podrían mitigar a través de un programa de manejo donde se intente evitar o disminuir el pastoreo en suelos donde exista un alto contenido de agua. Esto podría reducir las deposiciones de orina sobre suelos con un alto contenido de humedad, lo que ayudaría disminuir las emisiones de N_2O . Un aumento en la humedad del suelo produce un aumento de los sitios con condiciones anaeróbicas del suelo, por lo tanto, aumentan las emisiones de N_2O . Sin embargo, si el suelo presenta condiciones completamente anaeróbicas, se puede producir una desnitrificación completa del N, donde la mayoría del NO_3^- del suelo se transforma hasta N_2 (Smith et al., 1998). Por lo tanto, las fluctuaciones diarias de las emisiones de N_2O , después de la aplicación de la Orina y la Orina+DCD, están asociadas principalmente a los procesos de transformación el N en el suelo (hidrólisis de la urea, transformación del NH_4^+ y NO_3^-) los cuales se encuentran afectados principalmente por la humedad y la temperatura del suelo (Dalal et al., 2003; Saggar et al., 2004; Zaman et al., 2009).

La persistencia del DCD en el suelo varía según la concentración del DCD aplicado al suelo y las condiciones ambientales presentes en el sitio donde se aplicó, siendo la temperatura y la humedad los factores que más influyen en su persistencia (Kelliher et al., 2008), además de la actividad de los microorganismos del suelo, los cuales pueden metabolizar el DCD como una fuente de N (Schwarzer y Haselwandler, 1991). El DCD generalmente se considera activo como un inhibidor de la nitrificación por aproximadamente 4 meses (O'Callaghan et al., 2010) y el efecto del DCD sobre las emisiones de N_2O no disminuye con su uso repetido. En un estudio realizado por De Klein et al. (2011), observó que el DCD fue igual de

eficiente en reducir las emisiones de N_2O después de 4-5 años de uso consecutivo.

En ambos ensayos se observó un efecto de la aplicación del DCD sobre las emisiones de N_2O provenientes desde las manchas de orina. Los resultados de este estudio muestran que el DCD aplicado a una dosis de 10 kg ha^{-1} puede retrasar la transformación de NH_4^+ bajo los parches de orina en condiciones de campo. Un resultado directo del inhibidor de la nitrificación fue que los niveles de NH_4^+ en el tratamiento Orina+DCD tanto para el PBN y la PAN, fueron considerablemente mayores, y se mantuvieron altos por aproximadamente 14-30 días después de la aplicación de la orina más el inhibidor. Morales et al. (2015), encontraron que en los parches de orina a los que se le aplicó DCD, una alta proporción del N-urinario fue retenido en el suelo como N-NH_4^+ , a diferencia de los parches de orina en los que no se aplicó el DCD, que presentaron altos niveles de N-NO_3^- . Sin embargo, la capacidad que tuvo el DCD en disminuir las emisiones de N_2O , fue de un 55% en la PAN y un 18 % en el PBN según los datos de los flujos para el día de máxima de emisión de N_2O (día 28) y entre un 30-34% según los datos obtenidos a partir del cálculo del flujo acumulado tanto para la PAN y el PBN respectivamente, pero no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos, estos resultados son similares a lo observado por Berneze et al (2015), donde no observaron diferencias significativas ($P>0,05$) a partir de los datos del flujo acumulado entre el tratamiento Orina y Orina+DCD.

El factor de emisión por defecto que reporta el IPCC para las emisiones de N_2O desde parches de orina es de un 2% (Simon et al., 2018). En este estudio los factores de emisión fueron bajos tanto en el sitio PBN y PAN, en relación con lo reportado por el IPCC, lo cual podría estar relacionado a las condiciones climáticas y características del suelo del sitio en estudio. Factores de emisión mas bajos que lo reportado por el IPCC fueron obtenidos en otros estudios (De Klein et al., 2003, van der Weerden et al., 2011). Por ejemplo, en Nueva Zelanda estos resultados permitieron adoptar un factor emisión específico para el país para las emisiones de N_2O desde

las manchas de orina de un 1% (van der Weerden et al., 2011). Las diferencias en los factores de emisión reportados desde diferentes suelos, en parte, puede ser atribuido a las características del suelo para drenar el exceso de agua (De Klein et al., 2003). Por ejemplo, De Klein et al. (2003) observaron que un suelo franco-arenoso con buen drenaje el WFPS del suelo bajo rápidamente después de un periodo de lluvias, en cambio, un suelo arcilloso con mal drenaje, el WFPS del suelo llegó a valor inferior al 65% después de un periodo más largo sin lluvias. Si bien, en este trabajo ambos sitios (PBN y PAN) se encontraban bajo el mismo suelo (Brunosol éutrico), el contenido volumétrico de agua durante los primeros 80 días fue distinto, siendo mayor en el sitio PBN, con un valor promedio de 41 %, y con un factor de emisión de 0,19% para el tratamiento Orina y de 0,1% para el tratamiento Orina+DCD. En cambio, en el sitio PAN el contenido volumétrico de agua fue menor, con un promedio de un 29% durante los primeros 80 días, con un factor de emisión de 0,11% para el tratamiento orina y de 0,01% para el tratamiento Orina+DCD. Por lo tanto, en suelos con un buen drenaje de agua, asociados a un buen manejo del pastoreo y de la cobertura de la pastura sobre el suelo, se podrían disminuir los “hot spot” de emisión de N_2O desde los primeros centímetros del suelo asociado al exceso de N de las manchas de orina bovina (Simon et al., 2018).

La capacidad del DCD de reducir las emisiones de N_2O fue menor a lo observado en otros estudios. Por ejemplo, en Nueva Zelanda y Australia observaron que la aplicación de DCD al suelo puede reducir las emisiones directas de N_2O desde parches de orina hasta en un 90% (De Klein y Eckard, 2008), además, Zaman et al. (2008) y Di et al. (2007) observaron una reducción entre un 65-73% en las emisiones de N_2O desde el suelo después de la aplicación de DCD. Sin embargo, de acuerdo con valores reportados por De Klein et al. (2011), la eficiencia del DCD para reducir las emisiones de N_2O desde parches de orina, puede ir desde un 0 a un 86%, con un promedio de 57%.

Uno de los factores que pudo incidir en la baja capacidad del DCD de reducir las emisiones de N_2O es la humedad del suelo. Di et al. (2014) estimaron que se puede reducir entre un 44%-65% las emisiones de N_2O con la aplicación de DCD en un suelo que se encuentran a un 100% y 130% de su capacidad de campo (CC). Sin embargo, a un 60% de CC, las emisiones de N_2O son muy bajas y por lo tanto el DCD no tiene un impacto significativo sobre las emisiones de N_2O . En este trabajo el contenido volumétrico de agua en el suelo, en el periodo donde se produjeron los picos de emisión, oscilo entre un 27% y 48% para la PBN y entre un 13% y 41% en la PAN, lo que podría explicar el bajo efecto inhibitorio del DCD.

La temperatura del suelo parece ser unos de los factores claves de la capacidad inhibitoria de la nitrificación del DCD en nuestras condiciones. Zaman y Nguyen (2012) reportaron que la eficiencia del DCD retardando la nitrificación varia con la estación del año (verano o invierno), observando que la efectividad del DCD fue mayor cuando se aplicó en invierno (38 días) que en el verano (21 días) principalmente debido a la temperatura que presentaba el suelo. Además, Di y Cameron (2004) observaron que la vida media del DCD disminuye con el aumento de la temperatura del suelo. De acuerdo con lo descrito por Kelliher et al. (2014), existe una relación lineal entre la temperatura media del suelo y la vida media del DCD (vida media $DCD=54-1,8 \cdot T$), en este experimento la temperatura media del suelo durante los primeros 80 días fue de 16,2°C para el PBN y de 12,1° C para la PAN. Extrapolando la relación de Kelliher et al. (2014) la vida media del DCD para el PBN sería de 25 días y para la PAN sería de 32 días, lo cual coincide con lo observado en los cambios de la concentración de NH_4^+ en el suelo. De acuerdo con Schwarzer y Haselwandler (1991), la degradación del DCD ocurre a temperaturas que varían entre 10-33°C con una mayor tasa de degradación a 25°C. Además, Barneze et al. (2015) observo que, a temperaturas de aproximadamente 15 °C, se produjo una rápida degradación del DCD en el suelo, y por lo tanto disminuyo la eficiencia del

DCD. Adicionalmente, Welten et al. (2013) estimó que la vida media del DCD en estudios con suelo incubados a 20°C, fue inferior a 19 días.

Otro factor que pudo influir sobre el bajo efecto inhibitorio del DCD sobre las emisiones de N_2O desde el tratamiento Orina+DCD, principalmente en la PBN, es la descomposición temprana del DCD en el suelo (Mazzetto et al., 2015). Después de la aplicación del DCD al suelo, puede ocurrir la degradación del DCD por los microorganismos (Kelliher et al., 2008), que pueden metabolizar el DCD como una fuente de N (Schwarzer y Haselwandler, 1991). Además, Barneze et al. (2015) observaron que un alto contenido de materia orgánica del suelo (MOS) estuvo asociado con un incremento en la actividad de los microorganismos del suelo, y por lo tanto en la degradación más rápida del DCD. En este trabajo se observó que en la PBN el contenido de C del suelo fue un 44 % mayor que en la PAN, lo que podría estar explicando el bajo efecto inhibitorio del DCD en este sitio experimental.

La hidrólisis de la urea proveniente de la orina produce amonio, lo cual produce un incremento en el pH del suelo en periodos cortos de tiempo bajo condiciones de campo normales (Bolan et al., 2004). El aumento en el pH después de la aplicación de orina es normal debido a la producción de iones hidroxilos (OH^-) durante la hidrólisis de la urea, mientras que la disminución posterior en el pH del suelo está relacionado a la producción de hidrogeno (H^+) durante la nitrificación (Zaman et al., 2009). En condiciones normales el NH_4^+ es convertido a NO_2^- por bacterias nitrificantes, lo cual produce una disminución en el pH y de la concentración de NH_4^+ en el suelo como se observó en los tratamientos donde solo se aplicó orina, tanto en la PAN como en el PBN. Sin embargo, el DCD, al inhibir la nitrificación provoca la acumulación de NH_4^+ , y por lo tanto favorece que el pH del suelo se mantenga alto, en este experimento el pH del suelo se mantuvo sobre 6 durante un periodo de 28 días en el tratamiento Orina+DCD. Estos cambios en el suelo son consistentes con otros estudios. Por ejemplo, Cookson y Cornforth (2002) en un estudio de campo observaron que el pH del suelo se

mantuvo alto hasta 35 días después de la aplicación del tratamiento con DCD. Además, Zaman et al. (2009) reportaron una tendencia similar en un ensayo a campo, donde el pH del suelo seguido a la aplicación de orina con inhibidores de la nitrificación produjo un aumento en el pH del suelo, sin embargo, el periodo en que el pH del suelo se mantuvo alto, varió de acuerdo con la época del año. Cambios en el pH del suelo son más extremos en verano o primavera comparado con otoño e invierno, esto probablemente es debido a una mayor temperatura, ya que existe mayor actividad de los microorganismos del suelo en climas más cálidos (O'Callaghan et al., 2010).

La concentración de N de la orina para el sitio PAN fue menor a lo observado por Berger et al. (2011), quienes observaron que la concentración de N (%) de la orina de animales que fueron asignados a una pastura compuesta de festuca-alfalfa fue de un 2,1% en otoño y de 0,97% en primavera. El rápido incremento en la concentración de NH_4^+ después de la aplicación de la orina, tanto para la PAN y el PBN, fue observado por otros autores (O'Callaghan et al., 2010, Cardenas et al., 2016) lo que refleja la rápida hidrólisis de la urea proveniente de la orina. La mayoría del N de la orina es urea (80%) que es fácilmente mineralizable. Se debe considerar que el DCD no tiene un efecto sobre la hidrólisis de la urea y por lo tanto se puede observar un aumento en la concentración de NH_4^+ en el suelo comparado con el tratamiento control. La disminución gradual de la concentración de NH_4^+ en el suelo observado tanto en PAN como en el PBN, puede ser debido al proceso de nitrificación, al consumo de N por la pastura, pérdidas por volatilización de NH_3 y la inmovilización por parte de los microorganismos del suelo (Zaman et al., 2008).

La concentración NO_3^- en el tratamiento que solo se le aplicó orina, aumentó inmediatamente, con respecto al tratamiento Orina+DCD, donde el aumento de la concentración de NO_3^- en el suelo comenzó a partir del día 28 después del inicio del ensayo, que coincide con la disminución en la concentración de NH_4^+ en el suelo. La disminución gradual de la

concentración de NO_3^- en el suelo en todos los tratamientos comenzó después de 78 días, lo cual se vio reflejado en una limitada disponibilidad de NH_4^+ en el suelo, además de posibles pérdidas de NO_3^- por lixiviación, el consumo de NO_3^- por la pastura, por el proceso de desnitrificación y en una menor medida por la reducción des asimilatoria de NO_3^- a NH_4^+ (Silver et al., 2001).

Suelos con pasturas bajo pastoreo tratadas con inhibidores de la nitrificación, como el DCD, además de reducir las pérdidas de NO_3^- por lixiviación y reducir las emisiones de N_2O , pueden incrementar la eficiencia en el uso de N y el rendimiento de la pastura (Di et al., 2007). Además, el DCD, puede ser considerado un fertilizante nitrogenado de liberación lenta (contiene un 65% de N) (Di y Cameron, 2004). Por ejemplo, Di et al. (2007) reportaron un incremento en la eficiencia en el uso del N de un 37% y un incremento del 25% en rendimiento de la pastura como resultado de la aplicación de Orina más DCD. Sin embargo, se ha reportado que la respuesta de una pastura a la aplicación de DCD puede ser más variable que el efecto del DCD sobre las pérdidas de NO_3^- por lixiviación y las emisiones de N_2O (De Klein et al., 2014). Esto puede estar relacionado a que el crecimiento de la pastura puede estar afectada por muchas variables, que incluyen la disponibilidad de N y otros nutrientes, la humedad del suelo, la temperatura del suelo y las características físicas del suelo, como además la época del año. Sin embargo, en este experimento no se observó un efecto de la aplicación de orina sobre el rendimiento de la pastura tanto en la PAN y el PBN, pero si se observó un efecto sobre el contenido de N (%) en la planta en ambos sitios.

La asimilación de NH_4^+ es energéticamente más eficiente que la de NO_3^- (Pasda et al., 2001), y las plantas absorben preferentemente NH_4^+ . El NH_4^+ puede ser usada directamente por la planta para la síntesis de proteínas, en cambio el NO_3^- necesita una etapa extra para su reducción a NH_4^+ para la síntesis de proteínas. Además, la nutrición basada en él NH_4^+ está asociada con un incremento en la concentración de fitohormonas como

citoquininas y giberelinas que promueven el crecimiento vegetal (Pasda et al., 2001). Varios estudios desde diferentes sistemas de producción reportaron que la aplicación de fertilizantes nitrogenados junto a inhibidores de la nitrificación mejoraría la biodisponibilidad del N, produciendo un incremento en el rendimiento del cultivo y el consumo de N (Xu et al., 2002, Zaman et al., 2008).

En este trabajo el aumento en la concentración de NH_4^+ en el suelo producto de la aplicación orina en la PAN se tradujo en un incremento en el contenido de N (%) de la pastura, pero no en su rendimiento, a diferencia a lo observado por Di y Cameron (2007) que reporto un incremento de un 25% en el rendimiento de una pastura que fue tratada con orina y DCD. Igualmente, Moir et al. (2007) observaron que pasturas bajo un parche de orina al cual se le aplico DCD incrementaron su rendimiento en un 37%. Además, encontraron que el consumo de N aumentó en un 37%. La máxima concentración de N (%) se encontró en los tratamientos donde se aplicó orina, pero el efecto fue independiente del uso del DCD, ya que la mayor concentración de NH_4^+ en este tratamiento no produjo un aumento en la concentración de N de la pastura. La mayor concentración de N (%) en la PBN se observó a los 78 días después de la aplicación de los tratamientos, pero las diferencias encontradas entre los tratamientos donde se aplicó orina y el tratamiento control no fueron tan importantes como en la PAN. En la PBN la máxima concentración de N de la pastura se relaciona con la máxima concentración de NO_3^- en el suelo, según lo observado en el análisis de componentes principales. Una alta concentración de NO_3^- de la pastura, especialmente durante el periodo de invierno y primavera, puede tener un riesgo potencial para los animales en pastoreo. Concentraciones de nitrato en el rango de 1500-2000 mg NO_3^- -N kg^{-1} MS son considerados un riesgo para los animales (Di y Cameron, 2016). Las concentraciones de NO_3^- pueden ser considerablemente altas bajo los parches de orina, debido a la alta carga de N que poseen. Sin embargo, esto puede disminuir significativamente a 800 mg NO_3^- -N kg^{-1} MS, por el uso del DCD,

representando una reducción de más del 80% (Moir et al., 2012). Un incremento en el consumo de N de la pastura es un efecto positivo de la aplicación de DCD, con cual se podrían evitar pérdidas de N, ya sea por la lixiviación de nitratos o por la emisión de N_2O desde el suelo, sin embargo, el efecto del inhibidor de la nitrificación sobre la biodisponibilidad del N en el suelo va a estar limitado por la época del año y la tasa de crecimiento de la pastura (Moir et al., 2007).

Varios estudios han reportado cambios en la estructura de la comunidad de bacterias del suelo posterior a la aplicación de orina, real o sintética, al suelo (Petersen et al., 2004b; Nunan et al., 2006; Rooney et al., 2006; Singh et al., 2009). Los parches de orina en pasturas bajos pastoreo representan un cambio en las condiciones ambientales para los microorganismos del suelo, el cual varía dependiendo de la tasa de deposición de orina, el contenido de urea de la orina, las especies presentes en la pastura y la época del año (Rooney et al., 2006), por lo tanto, la estructura de la comunidad de bacterias del suelo en sistemas pastoriles bajo pastoreo bovino tiene un alto grado de variabilidad espacial (Ritz et al., 2004)

Estudios previos realizados por O'Callaghan et al. (2010), determinaron, a partir de datos generados desde los perfiles del DGGE del gen ADNr 16S, cambios significativos en la estructura de la comunidad de bacterias después de 21 días desde la aplicación de Orina+DCD, sin embargo, no encontraron cambios en la comunidad de bacterias del suelo donde solo se aplicó DCD al suelo. Además, observaron que la comunidad de bacterias del suelo a los 56 días vuelve a ser similar al tratamiento sin aplicación de Orina+DCD. En este trabajo, a partir de los resultados de los análisis de patrones bandas obtenidos usando la técnica DGGE no se observó un efecto de la aplicación de Orina y Orina+DCD sobre la estructura de la comunidad de bacterias del suelo tanto en la PAN como en la PBN, sin embargo si fue observado un cambio asociado al tiempo de muestreo, donde la estructura de bacterias en los tres tratamientos (Control, Orina,

Orina+DCD) correspondiente al día 45 se pudo diferenciar de los tiempos T1, T2, T3, correspondientes a los días 1, 15 y 30 respectivamente.

Los cambios en la estructura de las comunidades de bacterias del suelo pueden estar relacionados a cambios en el pH del suelo, se ha observado que el pH del suelo es un factor importante que determina la diversidad y la estructura de la comunidad del suelo (Fierer y Jackson, 2006). En otro estudio, Singh et al. (2009) observaron que el pH tiene un efecto importante sobre la estructura de las comunidades de bacterias del suelo, en un experimento realizado con muestras de suelos incubadas en el laboratorio, concluyendo que la comunidad de bacterias cambia en respuesta a la aplicación de orina de ovinos y cambios en el pH de suelos. Además, en este trabajo reportaron diferencias en la comunidad de bacterias después de la aplicación de orina y a cambios en el pH del suelo, estos resultados fueron observados a partir de los perfiles generados en el DGGE, observando que el tratamiento control, no cambio durante el periodo de incubación, pero la intensidad relativa de algunas bandas cambió significativamente en los tratamientos donde se aplicó Orina ovina. Estos resultados son similares a los sugeridos por Nunan et al. (2006) quien observó que cambios en la estructura de las comunidades de bacterias del suelo debido a la aplicación de Orina bovina se ven reflejados en la intensidad de algunas bandas en los geles del DGGE, no así por la presencia o ausencia de bandas en cada posición en el gel. En nuestro trabajo, solo se puede observar un efecto de los tratamientos en el índice de diversidad de Shannon, el cual disminuye en el tratamiento Orina+DCD del T4 de la PAN, mientras que aumenta en los tratamientos Orina y Orina+DCD del tiempo T3 de la PBN.

Di et al. (2009) observaron que las bacterias amonio-oxidadoras (AOB) son las responsables de la oxidación del amonio bajo los parches de orina y que los factores más importantes que afectan a las AOB son el pH y la concentración de NH_4^+ del suelo (O'Callaghan et al., 2010). El crecimiento de AOB disminuye en suelos ácidos, pudiendo afectar potencialmente el contenido de NH_4^+ en el suelo (Morales et al., 2015). En otro estudio

realizado por O Callaghan et al. (2010), donde estudiaron la estructura de bacterias del suelo utilizando los perfiles generados en el DGGE, observaron que el aumento en el pH del suelo del tratamiento donde aplicó Orina+DCD tiene un efecto sobre las comunidades de bacterias oxidadoras de amonio después de 7 días mientras que no observaron cambios en la estructura de las comunidades de bacterias oxidadoras de amonio en el tratamiento donde solo se aplicó Orina.

El uso de inhibidores artificiales que alteran los procesos naturales del suelo inicialmente parece ir en contra de conceptos ecológicos de calidad del suelo y de conservación biológica. Sin embargo, es necesario el uso de alternativas de manejo que eviten un aumento de la degradación del medioambiente, producto del aumento de la intensificación de la ganadería y el uso de fertilizantes N. Dada la importancia que tienen la calidad y las funciones del suelo sobre la productividad de los sistemas pastoriles, el uso de los inhibidores de la nitrificación, como el DCD, representa una alternativa para evitar pérdidas de N. Asimismo, este inhibidor parece no tener un impacto significativo sobre las comunidades de bacterias del suelo, al menos bajo las condiciones observados en este trabajo.

5. CONCLUSIONES

Los resultados de esta tesis permitieron determinar que la aplicación de orina con y sin el inhibidor de la nitrificación (DCD) producen un aumento de las emisiones de N_2O desde el suelo. Además, se logró determinar que los máximos flujos de N_2O asociados a la aplicación de orina, ocurren dentro de los 50 días después de la aplicación de los tratamientos.

En este trabajo el uso de dos dietas pastoriles de niveles proteicos contrastantes no tuvo un efecto sobre las emisiones de N_2O . Los mayores flujos de N_2O se obtuvieron desde el sitio PBN, por lo tanto, se puede concluir que los flujos diarios de N_2O desde las manchas de orina, para cada sitio experimental, se encuentran más influenciados por las condiciones iniciales del suelo, como la concentración de NO_3^- , NH_4^+ , C orgánico, además de los niveles de humedad y temperatura del suelo durante el periodo del ensayo, que por el nivel proteico de la dieta y su efecto sobre la concentración de N de la orina.

Si bien las diferencias no fueron significativas, la aplicación de DCD mostró valores en el flujo acumulado de N_2O un 32 % inferiores en la PAN y un 31 % en el PNB, respecto a la aplicación de orina sin inhibidor. Sin embargo, los resultados sugieren que el uso del DCD a una dosis de 10 kg ha^{-1} , permitiría mitigar efectivamente los efectos del exceso N en las manchas de orina bovina tanto para la PBN como en la PAN, el DCD pudo reducir la concentración de NO_3^- bajo los parches de orina en condiciones de campo, debido a que este permitió retrasar el proceso de transformación del $N-NH_4^+$ a $N-NO_3^-$ hasta los 78 días después de su aplicación al suelo. Por lo tanto, el uso de inhibidores de la nitrificación, como el DCD, en estas condiciones, podría ser una estrategia vinculadas aumentar la eficiencia en el uso del N y disminuir las emisiones de N_2O .

En este trabajo no se observó un efecto de la aplicación de Orina y de Orina+DCD sobre el rendimiento de la pastura en ambos sitios experimentales, además el uso de un inhibidor de la nitrificación (DCD) al suelo no produjo un cambio en la estructura de la comunidad de bacterias del suelo.

6.BIBLIOGRAFÍA

- Aboim M, Coutinho H, Peixoto R., Barbosa J, Rosado A. 2008. Soil Bacterial Community Structure and Soil Quality in a Slash-and-Burn Cultivation System in Southeastern Brazil. *Applied Soil Ecology*, 38 (2): 100 - 108.
- Akiyama H, Uchida Y, Tago K, Hoshino YT, Shimomura Y, Wang Y, Hayatsu M 2015. Effect of dicyandiamide and polymer coated urea applications on N₂O, NO and CH₄ fluxes from Andosol and Fluvisol fields. *Soil science and plant nutrition*, 61: 541 - 551.
- Arp DJ, Stein LY. (2003). Metabolism of inorganic N compounds by ammonia- oxidizing bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 38: 471 - 495.
- Baggs EM. 2011. Soil microbial sources of nitrous oxide: Recent advances in knowledge, emerging challenges and future direction. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 3(5): 321 - 327.
- Bardgett RD, Hobbs PJ, Frostegard A. 1996. Changes in soil fungal:bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biology and Fertility of Soils*, 22: 261 - 264.
- Barneze AS, Minet EP, Cerri CC, Misselbrook T. 2015. The Effect of Nitrification Inhibitors on Nitrous Oxide Emissions from Cattle Urine Depositions to Grassland under Summer Conditions in the UK. *Chemosphere*, 119: 122 - 29.
- Bateman EJ, Baggs EM. 2005. Contributions of nitrification and denitrification to N₂O emissions from soils at different water-filled pore space. *Biology and Fertility of Soils*, 41: 379 - 388.
- Berger L. 2011. Emisiones de óxido nitroso producidas por la actividad ganadera en el Uruguay en condiciones de pastoreo. Tesis. Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 38p.
- Bolan NS, Saggar S, Luo J, Bhandral R, Singh J. 2004. Gaseous emissions of nitrogen from grazed pastures: processes, measurements and modelling, environmental implications and mitigation. *Advances in*

- Agronomy, 84: 37 - 120.
- Bollmann A, Conrad R. 1998. Influence of O₂ availability on NO and N₂O release by nitrification and denitrification in soils. *Global Change Biology*, 4(4): 387 - 396.
- Boon N, Windt WD, Verstraete W, Top EM. 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*. 39: 101 - 112.
- Braker G, Schwarz J, Conrad R. 2010. Denitrifying soil communities. *FEMS Microbiol Ecology*. 73: 134 - 148.
- Bremer C, Braker G, Matthies D, Reuter A, Engels C, Conrad R. 2007. Impact of plant functional group, plant species, and sampling time on the composition of nirK-type denitrifier communities in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 6876 - 6884.
- Bristow AW, Whitehead DC, Cockburn JE. 1992. Nitrogenous constituents in the urine of cattle, sheep and goats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59:387 - 394.
- Bronson KF, Mosier AR, Bishnoi SR. 1992. Nitrous oxide emissions in irrigated corn as affected by nitrification inhibitors. *Soil Science Society of America Journal*, 56: 161 - 165.
- Bussink DW, Oenema O. 1998. Ammonia volatilization from dairy farming systems in temperate areas: a review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 51: 19 - 33.
- Cardenas LM, Misselbrook TM, Hodgson C, Donovan N, Gilhespy S, Smith MS, Dhanoa KA, Chadwick D. 2016. Effect of the Application of Cattle Urine with or without the Nitrification Inhibitor DCD, and Dung on Greenhouse Gas Emissions from a UK Grassland Soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 235: 229 - 41.
- Carter MS. 2007. Contribution of nitrification and denitrification to N₂O emissions from urine patches. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 2091 -

102.

- Clegg CD, Lovell RDL, Hobbs PJ. 2003. The impact of grassland management regime on the community structure of selected bacterial groups in soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 263 - 270.
- Clough TJ, Di HJ, Cameron KC, Sherlock RR, Metherell AK, Clark H, Rys G. 2007. Accounting for the utilization of a N₂O mitigation tool in the IPCC inventory methodology for agricultural soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 78: 1 - 14.
- Clough TJ, Ledgard SF, Sprosen MS, Kear MJ. 1998. Fate of N-15 labelled urine on four soil types. *Plant and Soil*, 199: 195 - 203.
- Conrad, R. 1996. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiological Reviews*, 60(4): 609 - 640.
- Cookson WR, Cornforth IS. 2002. Dicyanamide slows nitrification in dairy cattle urine patches: effects on soil solution composition, soil pH and pasture yield. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 1461 - 1465.
- Dalal RC, Wang W, Robertson GP, Parton WJ. 2003. Nitrous oxide emissions from Australian agricultural lands and mitigation options. *Australian Journal of Soil Research*, 41: 165 - 195.
- Dalal RC. 1998. Soil microbial biomass - what do the numbers really mean? *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 38: 649 - 665.
- Davidson EA, Kanter D. 2014. Inventories and scenarios of nitrous oxide emissions. *Environmental Research Letters*, 9(10): 143 - 171.
- De Klein CAM, Shepherd MA, Van der Weerden TJ. 2014. Nitrous oxide emissions from grazed grasslands: Interactions between the N cycle and climate change - a New Zealand case study. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 9 - 10: 131 - 139.
- De Klein CAM, Harvey M. 2012. Nitrous oxide chamber methodology guidelines. Wellington (New Zealand): Global Research Alliance on Agricultural Greenhouse Gases, Ministry for Primary Industries.
- De Klein CAM, Cameron KC, Di HJ, Rys G, Monaghan RM, Sherlock RR.

2011. Repeated Annual Use of the Nitrification Inhibitor Dicyandiamide (DCD) Does Not Alter Its Effectiveness in Reducing N₂O Emissions from Cow Urine. *Animal Feed Science and Technology*, 166 - 167: 480 - 91.
- De Klein CAM, Eckard RJ. 2008. Targeted technologies for nitrous oxide abatement from animal agriculture. *Australian Journal of Soil Research*, 48: 14 - 20.
- De Klein, CAM, Barton L, Sherlock RR, Li Z, Littlejohn RP. 2003. Estimating a nitrous oxide emission factor for animal urine from some New Zealand pastoral soils. *Australian Journal of Soil Research*. 41: 381 – 399.
- Delgado JA, Mosier AR. 1996. Mitigation alternatives to decrease nitrous oxides emissions and urea-nitrogen loss and their effect on methane flux. *Journal of Environmental Quality*, 25: 1105 - 1111.
- Di HJ, Cameron KC. 2016. Inhibition of Nitrification to Mitigate Nitrate Leaching and Nitrous Oxide Emissions in Grazed Grassland: A Review. *Journal of Soils and Sediments*, 16 (5): 1401 - 1420.
- Di HJ, Cameron KC, Podolyan A, Robinson A. 2014. Effect of Soil Moisture Status and a Nitrification Inhibitor, Dicyandiamide, on Ammonia Oxidizer and Denitrifier Growth and Nitrous Oxide Emissions in a Grassland Soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 73(2): 59 - 68.
- Di HJ, Cameron KC, Shen JP, Winefield CS, O'Callaghan, M, Bowatte, S, He JZ. 2009. Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grass- land soils. *Nature Geoscience*, 2: 621 - 624.
- Di HJ, Cameron KC. 2007. Nitrate leaching losses and pasture yields as affected by different rates of animal urine nitrogen returns and application of a nitrification inhibitor-a lysimeter study. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 79: 281 - 290
- Di HJ, Cameron KC, Sherlock RR. 2007. Comparison of the effectiveness of a nitrification inhibitor, dicyandiamide, in reducing nitrous oxide emissions in four different soils under different climatic and management conditions. *Soil Use and Management*, 23:1 - 9.

- Di HJ, Cameron KC. 2004. Effects of temperature and application rate of a nitrification inhibitor, dicyandiamide (DCD), on nitrification rate and microbial biomass in a grazed pasture soil. *Australian Journal of Soil Research*, 42, 927 - 932.
- Dijkstra J, Oenema O, Van Groenigen JW, Spek JW, Van Vuuren AM, Bannink, A. 2013. Diet effects on urine composition of cattle and N₂O emissions. *Animal*, 7 (2): 292 - 302.
- Ellis JL, Dijkstra J, France J, Parsons AJ, Edwards GR, Rasmussen S, Kebreab E, Bannink A. 2012. Effect of High-Sugar Grasses on Methane Emissions Simulated Using a Dynamic Model. *Journal of Dairy Science*, 95 (1): 272 - 85.
- Fierer N, Jackson RB. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(3): 626 - 623.
- Fraser PM, Cameron KC, Sherlock RR. 1994. Lysimeter study of the fate of nitrogen in animal urine returns to irrigated pasture. *European Journal of Soil Science*, 45: 439 - 447.
- Gardiner CA, Clough TJ, Cameron KC, Di HJ, Edwards GR, De Klein CAM. 2016. Potential for forage diet manipulation in New Zealand pasture ecosystems to mitigate ruminant urine derived N₂O emissions: a review. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 59: 301 - 317.
- Godde M, Conrad R. 2000. Influence of soil properties on the turnover of nitric oxide and nitrous oxide by nitrification and denitrification at constant temperature and moisture. *Biology and Fertility of Soils*, 32(2): 120 - 128.
- Graedel TE, Keene WC. 1995. Tropospheric budget of reactive chlorine. *Global Biogeochemical Cycles*, 9: 47 - 77.
- GRAS (Unidad de Agro-Clima y Sistemas de Información). 2016. [En línea]. En: Banco datos climáticos. 2016. Montevideo: INIA (Instituto de investigación agropecuaria). Consultado 13 marzo 2016: Disponible en: <http://www.inia.uy/gras/Clima/Banco-datos-agroclimatico>.

- Grayston SJ, Campbell CD, Bardgett RD, Mawdsley JL, Clegg CD, Ritz K, Griffiths BS, Rodwell JS, Edwards SJ, Davies WJ, Elston DJ, Millard P. 2004. Assessing shifts in microbial community structure across a range of grasslands of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques. *Applied Soil Ecology*, 25: 63 - 84.
- Grayston SJ, Griffith GS, Mawdsley JL, Campbell CD, Bardgett RD. 2001. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 533 - 551.
- Guo J, Peng Y, Wang S, Ma B, Ge S, Wang Z, Zhang L. 2013. Pathways and organisms involved in ammonia oxidation and nitrous oxide emission. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(21): 2213 - 2296.
- Haynes RJ, Williams PH. 1993. Nutrient cycling and soil fertility in the grazed pasture ecosystem. *Advances in Agronomy*, 49: 119 - 199.
- Haynes RJ, Williams PH. 1992. Changes in soil solution composition and pH in urine- affected areas of pasture. *Journal of Soil Science*, 43: 323 - 334.
- Hutchinson GL, Mosier AR. 1981. Improved soil cover method for field measurement of nitrous oxide fluxes. *Soil Science Society of America Journal*, 45: 311 - 316.
- IPCC. 2013. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. En: Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (Eds.). Cambridge, United Kingdom and New York, USA. Cambridge University Press. 1535 p.
- Kebreab E, France J, Beever DE, Castillo AR. 2001. Nitrogen pollution by dairy cows and its mitigation by dietary manipulation. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 60: 275 - 285.
- Kelliher FM, van Koten C, Kear M, Sprosen M, Ledgard S, De Klein C, Letica

- SA, Luo J, Rys GJ. 2014. Effect on temperature of dicyandiamide (DCD) longevity in pastoral soils under field conditions. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 186: 201 - 204.
- Kelliher FM, Clough TJ, Clark H, Rys G Sedcole JR. 2008. The temperature dependence of dicyandiamide (DCD) degradation in soils: A data synthesis. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(7): 1878 - 1882.
- Kiehl JT, Trenberth KE. 1997. Earth's annual global mean energy budget. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 78(2): 197 - 208.
- Kool DM, Hoffland E, Hummelink EWJ, van Groenigen JW. 2006. Increased hippuric acid content of urine can reduce soil N₂O fluxes. *Soil Biology y Biochemistry*, 38: 1021 - 1027.
- Krol DJ, Jones MB, Williams M, Richards KG, Bourdin F, Lanigan GJ. 2016. The effect of renovation of long-term temperate grassland on N₂O emissions and N leaching from contrasting soils. *Science of the Total Environment*, 560: 233 - 240.
- Ledgard SF, Steele KW, Saunders WHM. 1982. Effects of cow urine and its major constituents on pasture properties. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 25: 61 - 68.
- Leterme P, Barre C, Vertes F. 2003. The fate of 15N from dairy cow urine under pasture receiving different rates of N fertilizer. *Agronomie*, 23: 609 - 616.
- Lovell RD, Jarvis SC. 1996. Effects of urine on soil microbial biomass, methanogenesis, nitrification and denitrification in grassland soils. *Plant and Soil*, 186: 265 - 273.
- Luo J, Ledgard S, Wise B, Lindsey S. 2016. Effect of Dicyandiamide (DCD) on Nitrous Oxide Emissions from Cow Urine Deposited on a Pasture Soil, as Influenced by DCD Application Method and Rate. *Animal Production Science*, 56 (3): 350 - 54.
- Luo J, De Klein CAM, Ledgard SF, Saggarr S. 2010. Management options to reduce nitrous oxide emissions from intensively grazed pastures: a review. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 136: 282 - 91.

- Marschner P, Kandeler E, Marschner B. 2003. Structure and Function of the Soil Microbial Community in a Long-Term Fertilizer Experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(3): 453 - 61.
- Marsden KA, Jones DL, Chadwick DR. 2016. The urine patch diffusional area: an important N₂O source?. *Soil Biology and Biochemistry*. 92: 161 - 170.
- Mazzetto AM, Barneze AS, Feigl BJ, Van Groenigen JW, Oenema O, De Klein CAM, Cerri CC. 2015. Use of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) does not mitigate N₂O emission from bovine urine patches under Oxisol in Northwest Brazil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 101: 83 - 92.
- McCarty GW, Bremner JM. 1989. Laboratory evaluation of dicyandiamide as a soil nitrification inhibitor. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 20: 2049 - 2065.
- McTaggart IP, Clayton H, Parker J, Swan L, Smith KA. 1997. Nitrous oxide emissions from grassland and spring barley, following N fertiliser application with and without nitrification inhibitors. *Biology and Fertility of Soils*, 25: 261 - 268.
- Merino P, Estavillo JM, Gracioli LA, Pinto M, Lacuesta M, Munoz-Rueda A, Gonzalez-Murua C. 2002. Mitigation of N₂O emissions from grassland by nitrification inhibitor and Actilith F2 applied with fertilizer and cattle slurry. *Soil Use and Management*, 18: 135 - 141.
- Moir JL, McColm BJ, Cameron KC, Di HJ. 2012. The effect of dicyandiamide on pasture nitrate concentration, yield and N offtake under high N loading in winter and spring. *Grass and Forage Science*, 67: 391 - 402.
- Moir JL, Cameron KC, Di HJ. 2007. Effects of the nitrification inhibitor dicyandiamide on soil mineral N, pasture yield, nutrient uptake and pasture quality in a grazed pasture system. *Soil Use and Management*, 23: 111 - 120.
- Molodovskaya M, Singurindy O, Richards BK, Warland J, Johnson MS, Steenhuis, TS. 2012. Temporal variability of nitrous oxide from fertilized

- croplands: Hot moment analysis. *Soil Science Society of America Journal*, 76: 1728 - 1740.
- Morales SE, Jha N, Sagggar S. 2015. Impact of Urine and the Application of the Nitrification Inhibitor DCD on Microbial Communities in Dairy-Grazed Pasture Soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 88: 344 - 53.
- MVOTMA (Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente). 2017. Segundo Informe Bienal de Actualización a la Conferencia de las Partes en la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. Montevideo: MVOTMA. 68p. Consultado 20 agosto 2018. Disponible en : <https://www.mvotma.gub.uy/component/k2/item/10010205-segundo-informe-bienal-de-actualizacion-a-la-conferencia-de-las-partes-en-la-convencion-marco-de-las-naciones-unidas-sobre-el-cambio-climatico-2017-uruguay>.
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, Renella G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54: 655 - 670.
- Niklaus PA, Wardle DA, Tate KR. 2006. Effects of plant species diversity and composition on nitrogen cycling and the trace gas balance of soils. *Plant Soil*, 282: 83 - 98.
- Nunan N, Singh B, Reid E, Ord B, Papert A, Squires J, Millard P. 2006. Sheep-urine-induced changes in soil microbial community structure. *FEMS Microbiology Ecology*, 56(2): 310 - 320.
- O'Callaghan M, Gerard EM, Carter PE, Lardner R., Sarathchandra U, Burch G, Bell N. 2010. Effect of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) on microbial communities in a pasture soil amended with bovine urine. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(9): 1425 - 1436.
- Panek JA, Matson PA, Ortiz-Monasterio I, Brooks P. 2000. Distinguishing nitrification and denitrification sources of N₂O in a Mexican wheat system using ¹⁵N. *Ecological Applications*, 10: 506 - 514.

- Pasda G, Hähndel R, Zerulla W. 2001. Effect of fertilizers with the new nitrification inhibitor DMPP (3,4-dimethylpyrazole phosphate) on yield and quality of agricultural and horticultural crops. *Biology and Fertility of Soils*, 34: 85 - 97.
- Pedersen AR, Petersen SO, Schelde K. 2010. A comprehensive approach to soil-atmosphere trace gas flux estimation with static chambers. *European Journal of Soil Science*, 61: 888 - 902.
- Petersen SO, Roslev P, Bol R. 2004a. Dynamics of a pasture soil microbial community after deposition of cattle urine amended with [13C] urea. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 6363 - 6369.
- Petersen SO, Stamatiadis S, Christofides C. 2004b. Short-term nitrous oxide emissions from pasture soil as influenced by urea level and soil nitrate. *Plant Soil*, 267: 117 - 127.
- Philippot L, Bru D, Saby NPA, Čuhel J, Arrouays D, Šimek M, Hallin S. 2009. Spatial patterns of bacterial taxa in nature reflect ecological traits of deep branches of the 16S rRNA bacterial tree. *Environmental Microbiology*, 11(12): 3096 - 3104.
- Prather MJ, Hsu J. 2010. Coupling of nitrous oxide and methane by global atmospheric chemistry. *Science*, 330: 952 - 954.
- Ravishankara AR, Daniel JS, Portmann RW. 2009. Nitrous Oxide (N₂O): The Dominant Ozone-Depleting Substance Emitted in the 21st Century. *Science*, 326(5949): 123 - 125.
- Reay DS, Davidson EA, Smith KA, Smith P, Melillo JM, Dentener F, Crutzen PJ. 2012. Global agriculture and nitrous oxide emissions. *Nature Climate Change*, 2(6): 410 - 416.
- Ritchey KD, Boyer DG, Turner KE, Snuffer JD. 2003. Surface limestone application increases ammonia volatilization from goat urine in abandoned pastures. *Journal of Sustainable Agriculture*, 23: 111 - 125.
- Ritz K, McNicol JW, Nunan N, Grayston S, Millard P, Atkinson D, Gollotte A, Habeshaw D, Boag B, Clegg CD, Griffiths BS, Wheatley RE, Glover LA, McCaig AE, Prosser JL. 2004. Spatial structure in soil chemical and

- microbiological properties in an upland grassland. *FEMS Microbiology Ecology*, 49: 191 - 205.
- Rochette P, Eriksen-Hamel NS. 2008. Chamber measurements of soil nitrous oxide flux: are absolute values reliable?. *Soil Science Society of America Journal*, 72: 331 - 342.
- Rooney D, Kennedy N, Deering L, Gleeson D, Clipson N. 2006. Effect of sheep urine deposition on the bacterial community structure in an acidic upland grassland soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 7231 - 7237.
- Saggar S, Jha N, Deslippe J, Bolan NS, Luo J, Giltrap DL, Kim DG, Zaman M, Tillman RW. 2013. Denitrification and $N_2O:N_2$ production in temperate grasslands: Processes, measurements, modelling and mitigating negative impacts. *Science of the Total Environment*, 465: 173 - 195.
- Saggar S, Andrew R, Tate KR, Rodda N, Hedley CB, Townsend JA. 2004. Modelling Nitrous Oxide Emissions from New Zealand Grazed Pastures. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 68: 243 - 55.
- Schutter M, Dick R. 2001. Shifts in substrate utilization potential and structure of soil microbial communities in response to carbon substrates. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 1481 - 1491.
- Schwarzer C, Haselwandter K. 1991. Enzymatic degradation of the nitrification inhibitor dicyandiamide by a soil bacterium. *Soil Biology and Biochemistry*, 23: 309 - 310.
- Selbie DR, Cameron KC, Di HJ, Moir JL, Lanigan GJ, Richards KG. 2014. The effect of urinary nitrogen loading rate and a nitrification inhibitor on nitrous oxide emissions from a temperate grassland soil. *Journal of Agricultural Science*, 152: 159 - 171.
- Senbayram M, Dixon L, Goulding KW, Bol R. 2008. Long-term influence of manure and mineral nitrogen applications on plant and soil ^{15}N and ^{13}C values from the Broadbalk Wheat Experiment. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 22: 1735 - 1740.

- Shand CA, Williams BL, Dawson LA, Smith S, Young ME. 2002. Sheep urine affects soil solution nutrient composition and roots: Differences between field and sward box soils and the effects of synthetic and natural sheep urine. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(2): 163 - 171.
- Siciliano SD, Palmer AS, Winsley T, Lamb E, Bissett A, Brown M V, Snape I. 2014. Soil fertility is associated with fungal and bacterial richness, whereas pH is associated with community composition in polar soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 78: 10 - 20.
- Silver WL, Herman DJ, Firestone MK. 2001. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium in upland tropical forest soils. *Ecology*, 82(9): 2410 - 2416.
- Singh B K, Nunan N, Millard P. 2009. Response of fungal, bacterial and ureolytic communities to synthetic sheep urine deposition in a grassland soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 70(1): 109 - 117.
- Smith KA, McTaggart IP, Dobbie KE, Conen F. 1998. Emissions of N₂O from Scottish agricultural soils, as a function of fertilizer N. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 52: 123 - 130.
- Smith KA, McTaggart IP, Tsuruta H. 1997. Emissions of N₂O and NO associated with nitrogen fertilization in intensive agriculture, and the potential for mitigation. *Soil Use Management*, 13(4): 296 - 304.
- Smith P, Goulding KW, Smith KA, Powlson DS, Smith JU, Falloon P, Coleman K. 2001. Enhancing the carbon sink in European agricultural soils: including trace gas fluxes in estimates of carbon mitigation potential. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 60(1-3): 237 - 252.
- Soder KJ, Stout WL. 2003. Effect of soil type and fertilization level on mineral concentration of pasture: Potential relationships to ruminant performance and health. *Journal of Animal Science*, 81: 1603 - 1610.
- Somda C, Mark P, Bationo A. 1997. Soil pH and nitrogen changes following cattle and sheep urine deposition. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 28: 1253 - 1268.
- Sørensen P, Jensen ES. 1996. The fate of fresh and stored 15N-labelled sheep urine and urea applied to a sandy and a sandy loam soil using

- different application strategies. *Plant and Soil*, 183: 213 - 220.
- Subbarao GV, Ito O, Sahrawat KL, Berry WL, Nakahara K, Ishikawa T, Watanabe T, Suenaga K, Rondon M, Rao IM. 2006. Scope and strategies for regulation of nitrification in agricultural systems challenges and opportunities. *Critical reviews in plant sciences*, 25: 303 - 335.
- Torsvik V, Øvreas L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5: 240 - 245.
- Totty VK, Greenwood SL, Bryant RH, Edwards GR. 2013. Nitrogen partitioning and milk production of dairy cows grazing simple and diverse pastures. *Journal of Dairy Science*, 96: 141 - 149.
- Van Bergen PF, Nott CJ, Bull ID, Poulton PR, Evershed RP. 1998. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted Classical Experiments. IV. Preliminary results from a study of the effect of soil pH on organic matter decay. *Organic Geochemistry*, 29: 1779 - 1795.
- Van der Weerden TJ, Luo JF, De Klein CAM, Hoogendoorn CJ, Littlejohn RP, Rys GJ. 2011. Disaggregating nitrous oxide emission factors for ruminant urine and dung deposited onto pastoral soils. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 141: 426–436.
- Wakelin SA, Clough TJ, Gerard EM, O'Callaghan M. 2013. Impact of Short-Interval, Repeat Application of Dicyandiamide on Soil N Transformation in Urine Patches. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 167(3): 60 - 70.
- Weiske A, Benckiser G, Herbert T, Ottow JCG. 2001. Influence of nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate DMPP in comparison to dicyandiamide DCD on nitrous oxide emissions, carbon dioxide fluxes and methane oxidation during 3 years of repeated application in field experiments. *Biology and Fertility of Soils*, 34: 109 - 117.
- Welten BG, Ledgard SF, Schipper LA, Judge AA. 2013. Effect of amending cattle urine with dicyandiamide on soil nitrogen dynamics and leaching of urinary-nitrogen. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 167: 12 - 22.

- Williams BL, Shand CA, Sellers S, Young ME. 1999a. Impact of synthetic sheep urine on N and P in two pastures in the Scottish uplands. *Plant and Soil*, 214: 93 - 103
- Williams PH, Haynes RJ. 1994. Comparison of initial wetting pattern, nutrient concentrations in soil solution and the fate of N-15-labelled urine in sheep and cattle urine patch areas of pasture soil. *Plant Soil*, 162: 49 - 59.
- Williams DL, Ineson P, Coward PA. 1999b. Temporal variations in nitrous oxide fluxes from urine-affected grassland. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 779 - 788.
- Wolf I, Brumme R. 2002. Contribution of nitrification and denitrification sources for seasonal N₂O emissions in an acid German forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 741 - 744.
- Xu X, Boeckx P, Cleemput OV, Zhou L. 2002. Urease and nitrification inhibitors to reduce emissions of CH₄ and N₂O in rice production. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 64: 203 - 211.
- Zahn JA, Arciero DM, Hooper AB, DiSpirito AA. 1996. Evidence for an iron center in the ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. *FEBS Letters*, 397: 35 - 38.
- Zaman M, Nguyen ML. 2012. How application timings of urease and nitrification inhibitors affect N losses from urine patches in pastoral system. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 156: 37 - 48.
- Zaman M, Blennerhassett JD. 2010. Effects of the different rates of urease and nitrification inhibitors on gaseous emissions of ammonia and nitrous oxide, nitrate leaching and pasture production from urine patches in an intensive grazed pasture system. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 136(3-4), 236 - 246.
- Zaman M, Saggar S, Blennerhassett JD, Singh J. 2009. Effect of Urease and Nitrification Inhibitors on N Transformation, Gaseous Emissions of Ammonia and Nitrous Oxide, Pasture Yield and N Uptake in Grazed Pasture System. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(6): 1270 - 80.

Zaman M, Nguyen ML, Blennerhassett JD, Quin FQ. 2008. Reducing NH_3 , N_2O and NO_3^- -N Losses from a Pasture Soil with Urease or Nitrification Inhibitors and Elemental S-Amended Nitrogenous Fertilizers. *Biology and Fertility of Soils*, 44(5): 693 - 705.

7. Efecto del DCD (Diciandiamida) sobre las emisiones de óxido nitroso (N₂O) desde suelos en condiciones de pastoreo¹

Pablo Torres¹, María Federici¹, Verónica Ciganda¹

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA, Uruguay.

. Correo electrónico: ptorres@inia.org.uy

Resumen

En sistemas de producción pastoril, las deposiciones de orina de los rumiantes son la principal fuente de N mineral en la generación de N₂O desde el suelo. Este estudio tiene como objetivo cuantificar el efecto de un inhibidor de la nitrificación, Diciandiamida (DCD) sobre las emisiones de N₂O provenientes de la orina de bovinos en condiciones de pastoreo. El trabajo se llevó a cabo en la estación experimental de INIA-La Estanzuela, Colonia, Uruguay. Se instalaron dos experimentos a campo, uno sobre una pastura nativa degradada de bajo contenido proteico (PBN) y otro sobre una mezcla de festuca y alfalfa, de alto contenido proteico (PAN). El diseño experimental utilizado fue de bloques completos al azar con cuatro repeticiones y tres tratamientos utilizando la metodología de cámaras estáticas de flujo cerrado. Los tres tratamientos fueron: Control, sin aplicación de orina (Control), aplicación de orina bovina (Orina), y orina con el inhibidor de la nitrificación (Orina+DCD). Los resultados indican que los máximos flujos de N₂O ocurrieron dentro de los 50 días después de la aplicación de la orina, siendo mayores en la PBN. Si bien las diferencias no fueron significativas, la aplicación de DCD mostró valores de emisiones de N₂O un 32 % inferiores en la PAN y un 31 % en el PNB, respecto a la aplicación de orina sin inhibidor. Los resultados

¹ Este artículo se publicará en la revista **Agrociencia, Uruguay**

sugieren que el uso del DCD permitiría mitigar las emisiones de N₂O originadas en las manchas de orina bovina en condiciones de pastoreo.

Palabras clave: Óxido nitroso, Orina bovina, Dicyandiamida

Effect of DCD (Dicyandiamide) on nitrous oxide (N₂O) emission from soil under grazing condition

SUMMARY

In pastoral production system, the ruminant urine depositions are the main source of mineral N in the generation of N₂O from the soil. The aim of this study was to determine the effect of a nitrification inhibitor, dicyandiamide (DCD), on N₂O emissions from bovine urine patches under grazing conditions. The experiment was conducted at the experimental station INIA-La Estanzuela, Colonia, Uruguay. Two field experiments were installed, one over a degraded native pasture of low protein content (PBN), and another over a cultivated pasture (Fescue-Lucerne), of high protein content (PAN). The experimental design used was a randomized completes blocks with four replications and three treatments using the methodology of closed flow static cameras. The three treatments were: Control, without application of urine (Control), application of bovine urine (Urine) and urine with the nitrification inhibitor (Urine+DCD). The results indicate that the maximum flows of N₂O occurred within 50 days after the application of urine, being older in the PBN. Although the differences were not significant, the application of DCD showed values of N₂O emissions 32% lower in the PAN and 31% in the PBN, with respect to the application of urine without the inhibitor. The results suggest that the use of DCD would mitigate the N₂O emissions originated in bovine urine stains under grazing conditions.

Keywords: Nitrous oxide, Bovine urine, Dicyandiamide

Introducción

El calentamiento global del planeta causado por las emisiones de gases efecto invernadero (GEI), y sus efectos sobre el cambio y la variabilidad climática, se ha constituido en una de las preocupaciones ambientales más importantes de la actualidad. La presencia de GEI representa menos del 1 % del volumen total del aire seco en la atmósfera. Sin embargo, estos tienen un importante rol en la cantidad de energía que la tierra puede absorber y re-emitir como radiación infrarroja (IR) desde la superficie, previniendo su pérdida hacia la atmósfera ⁽¹⁾.

La actividad agropecuaria mundial es responsable del 14 % de las emisiones globales de GEI, siendo el dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O) los principales gases emitidos ⁽¹⁾. En el caso del N₂O, la actividad agropecuaria mundial es responsable del 60% de la emisión global de este gas ⁽²⁾. Sin embargo, en Uruguay el N₂O es producido casi en su totalidad por la actividad agropecuaria (90,1%), contribuyendo la ganadería en más del 80 % ⁽³⁾.

En sistemas de producción ganadera de base pastoril, como en Uruguay, se estima que > 80 % del nitrógeno (N) ingerido de la pastura retorna al suelo a través de la deposición de orina y heces, mientras que el restante 20% es retenido y utilizado por el animal ⁽⁴⁾. Además, se ha reportado una relación lineal y directa entre el N consumido en la dieta y el contenido de N en las excreciones, encontrándose mayoritariamente en la orina en forma de urea (CO(NH₂)₂) ⁽⁵⁾. Una vez que la urea es depositada en el suelo, puede ser una fuente importante de emisión de N₂O a través de los procesos microbianos de nitrificación y desnitrificación ⁽⁶⁾. La

desnitrificación es el proceso que se considera como una fuente mucho más potente de N_2O que la nitrificación desde suelos bajo praderas ⁽⁷⁾.

El uso de inhibidores de la nitrificación (IN), como la diciandamida (DCD), se ha visto como una técnica útil para reducir las emisiones de N_2O desde los parches de orina depositados en el suelo por animales en pastoreo y promover un uso eficiente del nitrógeno en el suelo ⁽⁸⁾. Un gran número de estudios, particularmente en Nueva Zelanda, han observado que los IN pueden reducir las emisiones de N_2O entre 30-80% ^{(7) (9) (10) (11)}. Además, los IN pueden incrementar la eficiencia en la aplicación de fertilizantes reduciendo pérdidas de N derivados de la desnitrificación, y previniendo pérdidas por lixiviación ⁽¹²⁾.

El presente trabajo se realizó con tres objetivos: 1) Cuantificar el efecto de dos dietas pastoriles de niveles proteicos contrastante sobre las emisiones de N_2O derivadas de las deposiciones de orina bovina, 2) Cuantificar el efecto de inhibidores del proceso de nitrificación sobre emisiones de N_2O derivadas de deposiciones de orina bovina y 3) Identificar el efecto de variables fisicoquímicas del suelo (pH, humedad, temperatura, NO_3^- y NH_4^+) en las emisiones de N_2O .

Materiales y métodos

El trabajo experimental se llevó a cabo desde julio 2013 hasta julio 2014 en la estación experimental de INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay, sobre suelos del tipo Brunosol éutrico. Se instalaron dos sitios experimentales: una pastura nativa degradada de bajo contenido proteico (PBN), dominado por gramilla (*Cynodon dactylon*) y otra sobre una mezcla de Festuca (*Festuca arundinacea* Pers.) y Alfalfa (*medicago sativa* L.), de alto contenido proteico

(PAN). Los análisis iniciales de suelo para los sitios experimentales (PBN y PAN) se observan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Análisis de suelo de los sitios

Sitio	PBN	PAN
pH (H ₂ O)	5,9	5,8
N (%)	0,4	0,2
C.Org (%)	4,8	2,7
N-NO ₃ (µg N/g)	20,7	8,0
N-NH ₄ (µg N/g)	22,1	14,9
Bray I (µg P/g)	40,4	38,9

En cada experimento se utilizó un diseño estadístico de bloques completos al azar con cuatro repeticiones y tres tratamientos. Los tratamientos aplicados fueron: Control sin aplicación de orina (Control), aplicación de orina colectada de bovinos bajo pastoreo (Orina), y aplicación de orina colectada con el agregado del inhibidor de la nitrificación, dicianidamida (Orina+DCD) a una dosis de 10 kg ha⁻¹. Para las mediciones de N₂O se utilizó la metodología de cámaras estáticas de flujo cerrado ⁽¹³⁾. En ambos sitios se monitoreó el suelo utilizando un sensor de temperatura (ECT- Decagon Service) y humedad (Ec-5, Decagon Service).

La orina se colectó de vacas hembras de raza carnífera, las cuales fueron asignadas previamente a pastoreo en ambos sitios experimentales, PBN y PAN. Se tomaron submuestras de orina de cada sitio y se analizó su contenido de N por el método de Kjedahl (Cuadro 2). En cada cámara se agregó 1 L de orina asegurando cubrir toda la superficie.

Cuadro 2. Contenido de N de la orina colectada de cada sitio experimental.

Sitio	N (%)
Orina PBN	0.52
Orina PAN	0.44

La colecta de muestras gaseosas en las cámaras comenzaron el día 25 de julio, inmediatamente luego de aplicados los tratamientos. En cada evento de muestreo, se

colectaron tres muestras en cada cámara: al tiempo 0, a los 20 minutos y a los 40 minutos. Durante el primer mes las muestras se colectaron tres veces por semana, durante las siguientes tres semanas se realizaron dos muestreos por semana, para luego continuar con un muestreo mensual hasta completar el año.

La concentración de N₂O de las muestras gaseosas obtenidas en ambos ensayos fueron determinadas en un cromatógrafo de gases (Agilent, modelo 7890), equipado con un detector de captura electrónica (ECD).

El flujo de emisión de N₂O para cada día de muestreo se calculó utilizando el paquete HMR ⁽¹⁴⁾, en el software R ⁽¹⁵⁾, basada en la ecuación de flujo desarrollada por ⁽¹⁶⁾, utilizando la siguiente relación para calcular el flujo de N₂O desde el suelo.

$$F_0 = V \times (C_1 - C_0)^2 \div [A \times T_1 \times (2 \times C_1 - C_2 - C_3)] \times \ln[(C_1 - C_0) \div (C_2 - C_1)]$$

Donde F₀ es el flujo al tiempo 0, V es el volumen de la cámara (L), A es la superficie de la cámara (m²); C₀, C₁, C₂ son las concentraciones de gas de la cámara (ppm (V)) en el tiempo 1, 2, 3 respectivamente, y T₁ es el intervalo entre los puntos de muestreo (minutos).

$$\text{Condición; } [(C_1 - C_0) \div (C_2 - C_1)] > 1$$

Los muestreos de suelos se realizaron en las parcelas contiguas a cada cámara a una profundidad de 15 cm, se analizó la concentración de NH₄⁺, NO₃⁻ y el pH. Además, de cada parcela se obtuvo una muestra de la pastura y se cuantificó su contenido de materia seca y de N de la pastura. Tanto para los análisis de suelo y de pasturas se muestrearon los días: 1, 14, 28, 78, 145, 208, 230, 264, 310, 340. Los análisis fueron realizados por el laboratorio de análisis de suelos, plantas y agua de INIA La Estanzuela.

Cada sitio experimental fue analizado independientemente. Los efectos de los tratamientos en cada sitio sobre el NH₄⁺, NO₃⁻ y pH del suelo, contenido de N y materia seca

vegetal se compararon realizando un ANOVA. Las comparaciones de medias de los tratamientos se realizaron a través de un análisis post-hoc (LSD Fischer) ($p>0,05$) utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2017 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>).

Resultados

Precipitación y temperatura

Durante el año en que se realizaron los muestreos de gases las precipitaciones alcanzaron un total de 1250 mm y la temperatura promedio fue de 18,3 °C (Figura 1). En los primeros 80 días, la lluvia acumulada fue de 266 mm, registrándose dos episodios de lluvias superiores a 40 mm durante los días experimentales 49 y 58. La temperatura promedio de esta primera etapa fue de 12,1 °C.

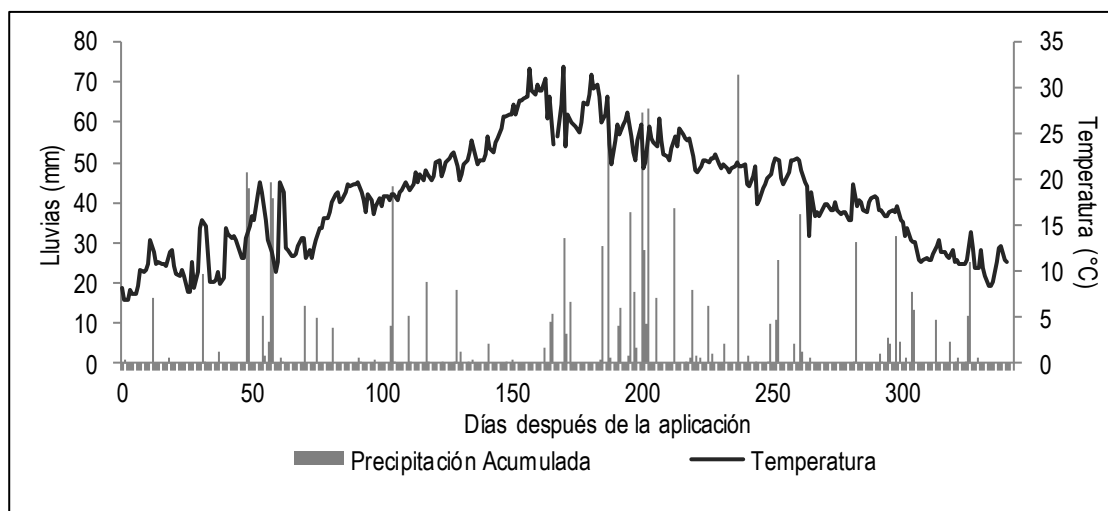


Figura 1. Temperatura y precipitaciones (Fuente. GRAS-INIA, 2016)

Contenido volumétrico de agua y temperatura del suelo

EL valor promedio del contenido volumétrico de agua del suelo para el sitio PBN durante los primeros 80 días fue de 41%, con un máximo de 47% y un mínimo de 33%, mientras que la temperatura promedio del suelo fue de 16,2°C y varió entre 9,6°C y 24°C (Figura 2).

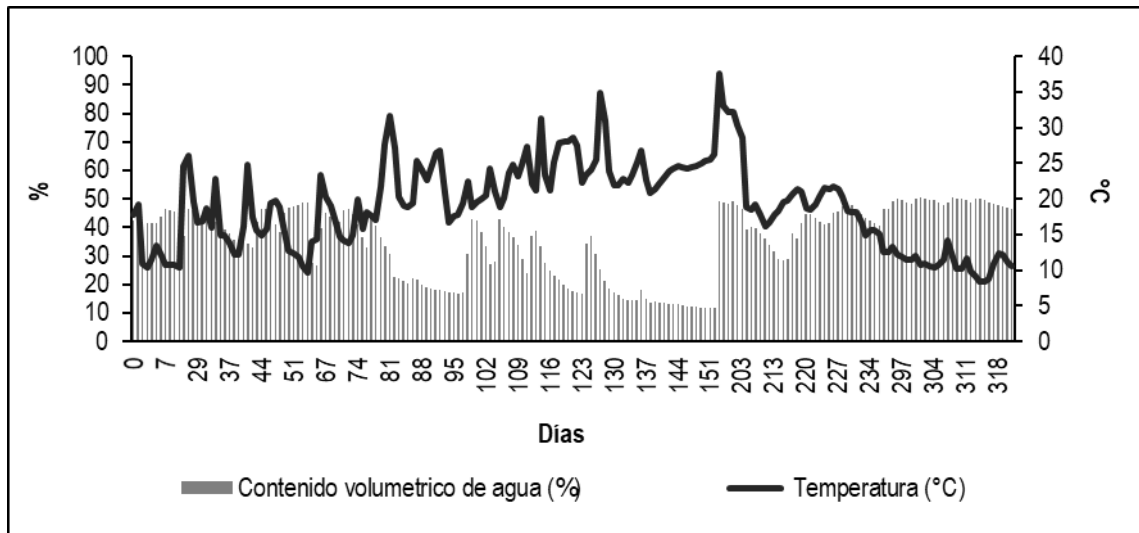


Figura 2. Evolución del contenido de agua volumétrico y temperatura del suelo durante el período experimental para PBN.

En el sitio PAN (Figura 3) el contenido volumétrico de agua del suelo fue de 29% con un máximo de 40,2% y mínimo de 19,7%. La temperatura promedio del suelo fue de 16,2°C y varió entre 6,4°C y 19°C.

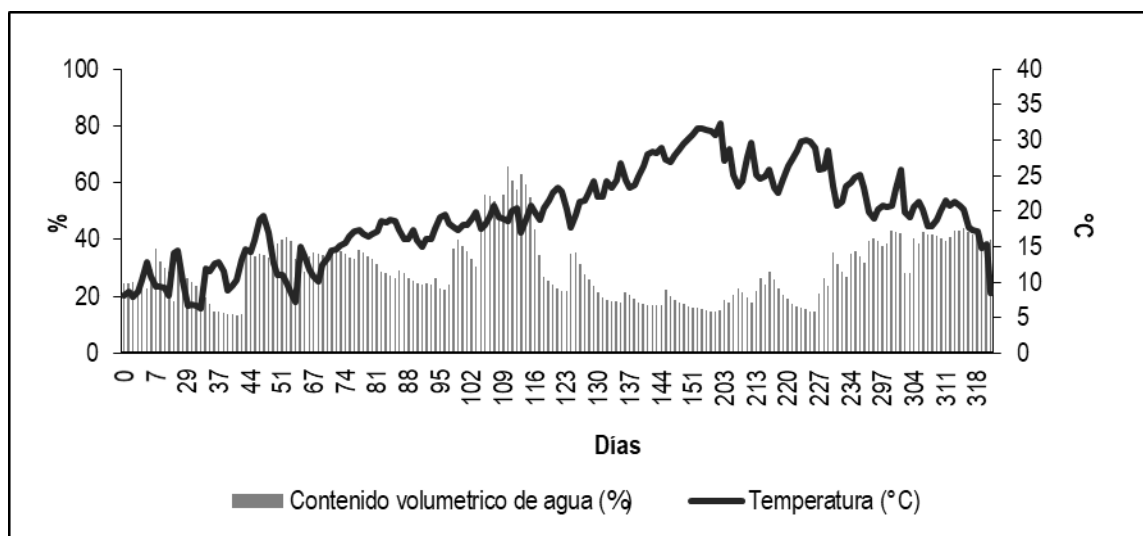


Figura 3. Evolución del contenido de agua volumétrico y temperatura del suelo durante el período experimental para PAN.

NH_4^+ , NO_3^- , N total y pH del suelo

Los cambios en la concentración de $N-NH_4^+$ del suelo en los sitios experimentales PAN y PBN se observan en las figuras 4 y 5, respectivamente. En el experimento PAN y PBN, la aplicación de orina como la aplicación de Orina+DCD produjeron un incremento en las concentraciones de $N-NH_4^+$ en el suelo.

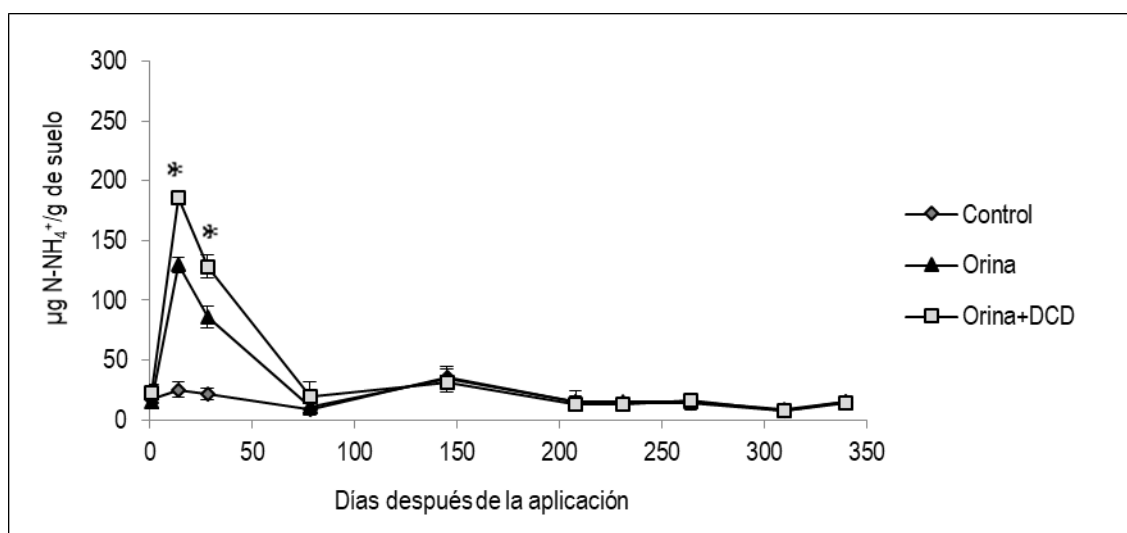


Figura 4. Concentración de $N-NH_4^+$ en suelo de la PAN para los tratamientos Control, Orina y Orina + DCD. Barras de error corresponden a la desviación estándar. * indica diferencias estadísticas entre los tratamientos según test de LSD Fisher ($p < 0,05$).

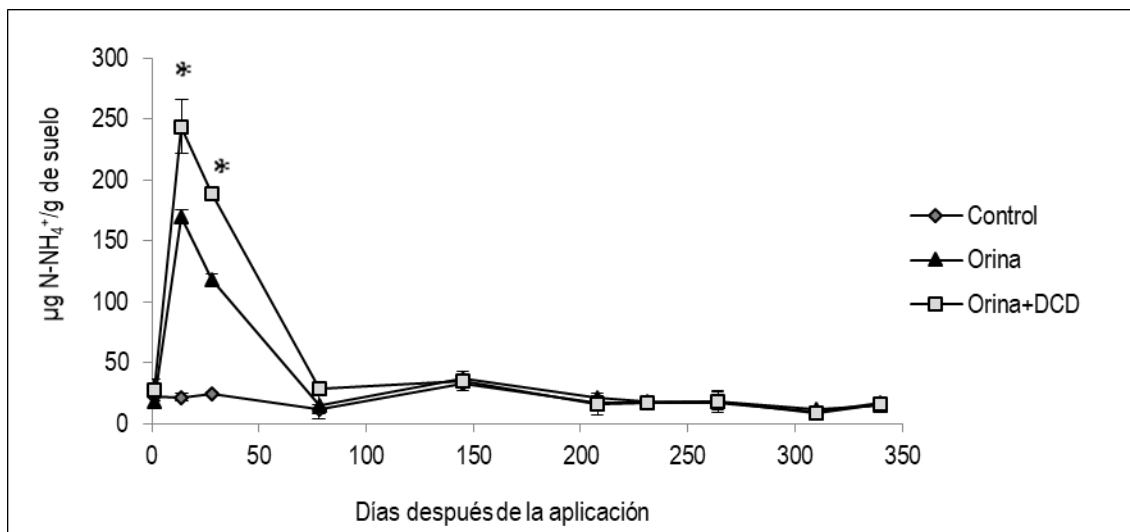


Figura 5. Concentración de NH_4^+ del suelo de la PBN tratados con Control, Orina y Orina + DCD. Barras de error corresponden a la desviación estándar. * indica diferencias estadísticas entre los tratamientos según test de LSD Fisher ($p < 0,05$).

La máxima concentración de N-NH_4^+ en el tratamiento Orina se observó en el día 14 y fue de 129,5 $\mu\text{g N-NH}_4^+/\text{g}$ de suelo para la PAN y de 169,5 $\mu\text{g N-NH}_4^+/\text{g}$ de suelo en la PBN. En el tratamiento Orina+DCD la máxima concentración N-NH_4^+ se observó en el día 14 y fue de 185 $\mu\text{g N-NH}_4^+/\text{g}$ de suelo en la PAN y de 243,7 $\mu\text{g N-NH}_4^+/\text{g}$ para la PBN. No se observaron cambios en la concentración de N-NH_4^+ en el suelo en el tratamiento Control tanto en la PAN como en la PBN. En el sitio PAN se observaron diferencias estadísticas ($P < 0,05$) entre los tratamientos Orina y Orina+DCD y el tratamiento Control en el día 14 y entre el tratamiento Orina+DCD y el tratamiento control en el día 28. Además, se observó en el ensayo PBN que en el día 14 los tres tratamientos fueron estadísticamente diferentes ($P < 0,05$) y en el día 28 los tratamientos Orina+DCD y el Control fueron estadísticamente diferentes. ($P < 0,05$). En el sitio PAN como PBN el efecto inhibitorio sobre la nitrificación del DCD favoreció el aumento de la concentración NH_4^+ en el suelo en un 30,1 % respecto al tratamiento en que solo se aplicó orina. La concentración de N-NH_4^+ en el ensayo PAN y PBN de los tratamientos Orina y

Orina+DCD regresaron a valores similares al tratamiento Control aproximadamente a los 78 días después del inicio del ensayo.

Los cambios en la concentración de N-NO_3^- en los sitios experimentales PAN y PBN se observan en las figuras 6 y 7, respectivamente. A partir de los resultados obtenidos en el sitio PAN y de PBN, se pudo observar que la aplicación de la orina sin el inhibidor de la nitrificación produjo que la concentración de N-NO_3^- en el suelo aumentara antes que en el tratamiento donde se aplicó Orina+DCD.

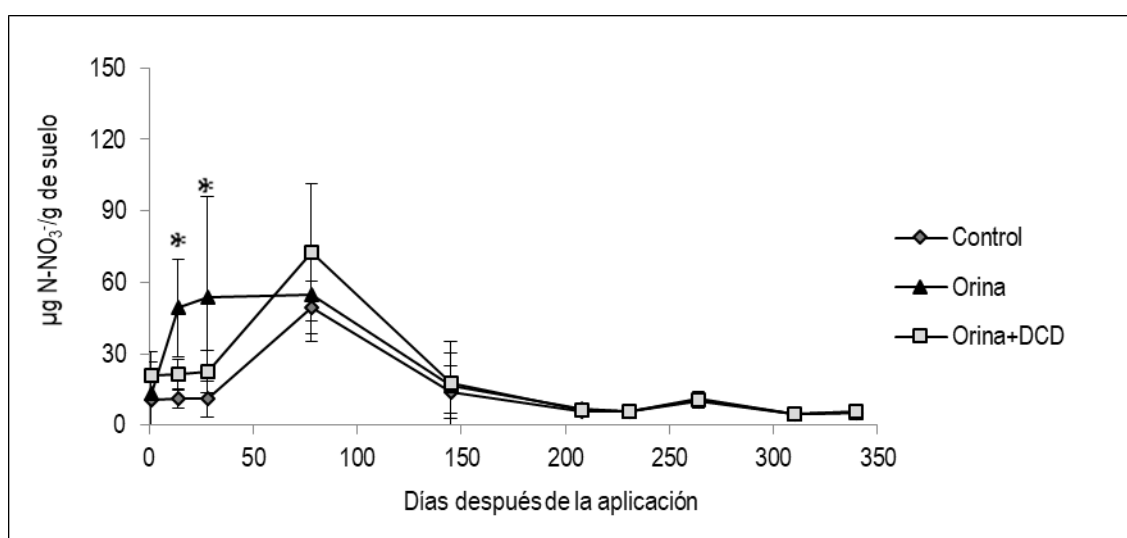


Figura 6. Concentración de NO_3^- para los suelos de PAN tratados con Orina y Orina+DCD. Barras de error corresponden a la desviación estándar. * indica diferencias estadísticas entre los tratamientos según test de LSD Fisher ($p < 0,05$).

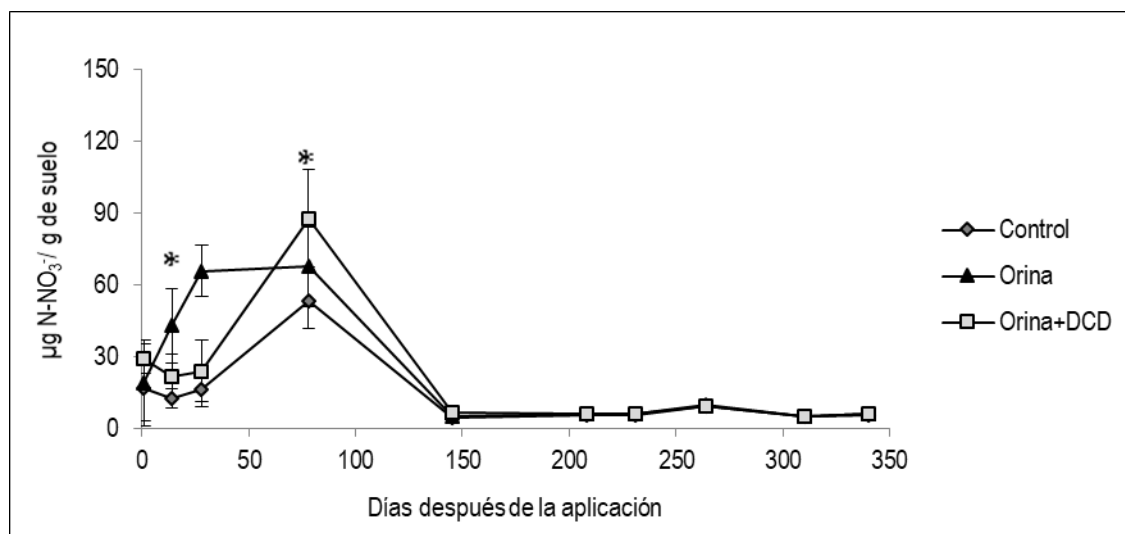


Figura 7. Concentración de NO_3^- para los suelos PBN tratados con Orina y Orina+DCD. Barras de error corresponden a la desviación estándar. * indica diferencias estadísticas entre los tratamientos según test de LSD Fisher ($p < 0,05$).

La concentración de N-NO_3^- en el suelo del tratamiento Orina aumento desde el día 0 al día 14 de 13,11 a 49,20 $\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{g}$ de suelo en la PAN y de 18,8 a 42,83 $\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{g}$ de en la PBN. En cambio, la aplicación de Orina con inhibidor de la nitrificación (Orina+DCD), retraso la transformación NH_4^+ a NO_3^- en el suelo, observándose que la concentración de N-NO_3^- en el suelo durante los primeros 28 días fue similar al tratamiento control. La mayor concentración de N-NO_3^- en el suelo para el tratamiento Orina+DCD fue a los 78 días, con una concentración de 72,71 $\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{g}$ de suelo en la PAN y de 87,7 $\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{g}$ de suelo en la PBN. En el ensayo PAN se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el tratamiento Orina y los tratamientos Control y Orina+DCD en el día 14 y entre los tratamientos Control y Orina el día 28. En la PBN se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el tratamiento Control y Orina el día 14, y entre el tratamiento Control y Orina+DCD el día 78. Además, se observó que las concentraciones de N-NO_3^- en el suelo de los tratamientos Orina y Orina+DCD en el ensayo PAN y PBN regresaron a valores

similares a los iniciales aproximadamente a los 145 días después de la aplicación de los tratamientos.

El efecto la aplicación de Orina y de Orina+DCD sobre el pH del suelo en el sitio PAN y PBN se observan en las figuras 8 y 9, respectivamente. En el ensayo PAN y PBN la aplicación al suelo de orina con y sin el inhibidor de la nitrificación produjo que el pH del suelo aumentara, a diferencia del tratamiento Control donde el pH disminuyo.

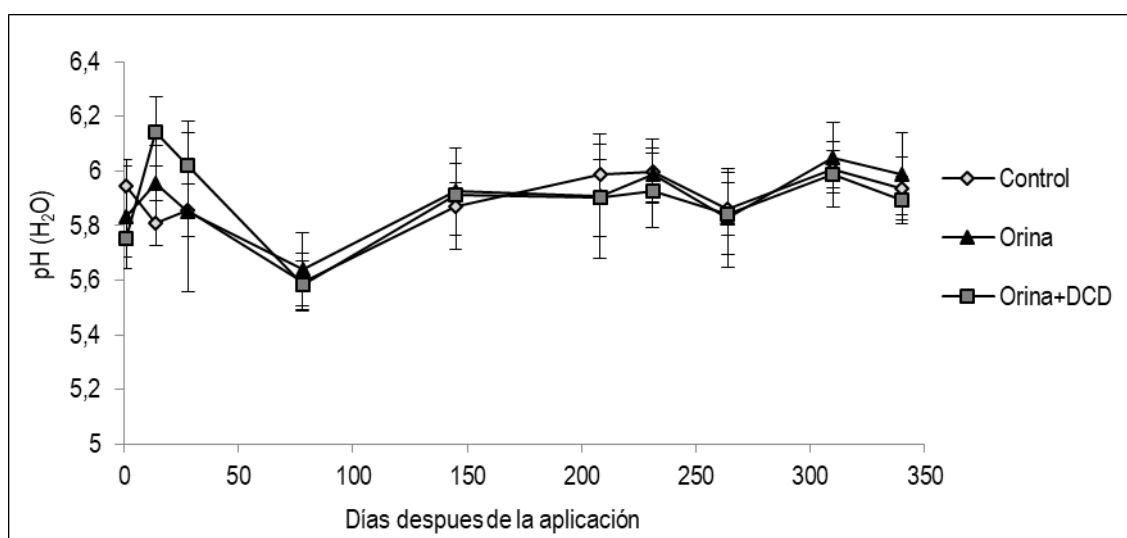


Figura 8. pH del suelo del ensayo PAN tratados con Orina y Orina + DCD. Barras de error corresponden a la desviación estándar. * indica diferencias estadísticas entre los tratamientos según test de LSD Fisher ($p < 0,05$).

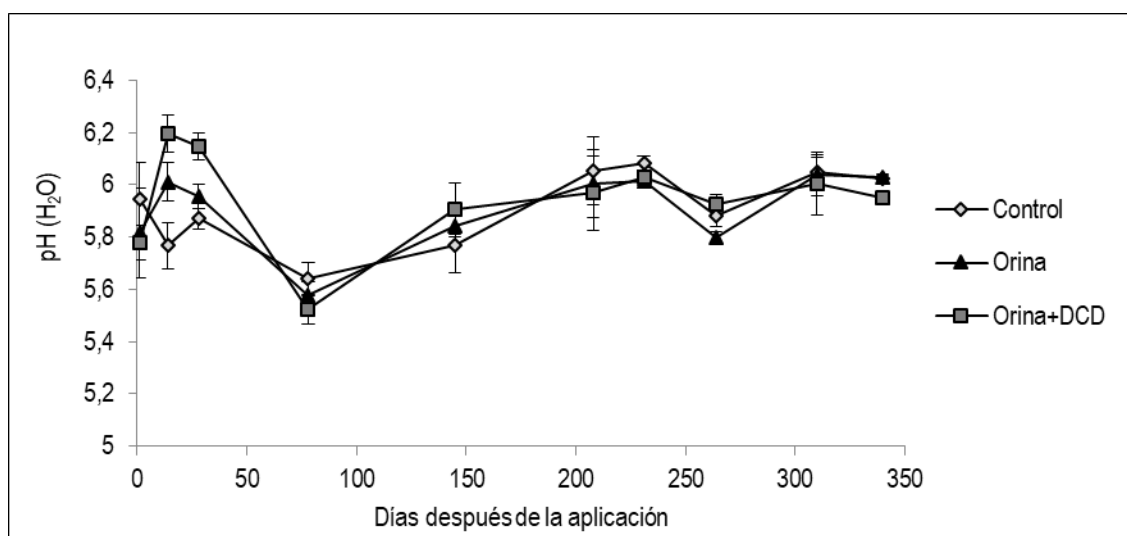


Figura 9. pH del suelo del ensayo PBN tratados con Orina y Orina + DCD. Barras de error corresponden a la desviación estándar. * indica diferencias estadísticas entre los tratamientos según test de LSD Fisher ($p < 0,05$).

En el ensayo PAN el pH del suelo del tratamiento Orina aumento desde el día 0 al 14 de 5,8 a 6,0 y de 5,8 a 6,01 en la PBN, en cambio la aplicación de Orina más el DCD provoco que el pH del suelo aumentara más que en el tratamiento donde solo se aplicó orina, pasando de 5,8 a 6,1 desde el día 0 al 14 y de 5,7 a 6,2 en la PBN. Se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos Control y Orina+DCD el día 14 en la PAN y en el ensayo PBN se observó en el día 14 que los tres tratamientos fueron estadísticamente distintos ($P < 0,05$). El pH del suelo de los tratamientos Orina y Orina+DCD del de los sitios PAN y PBN llegaron a valores similares al tratamiento control después de día 28 desde de la aplicación de los tratamientos al suelo.

Contenido de Nitrógeno y rendimiento de la pastura

El contenido de N de la pastura de los sitios experimentales PAN y PBN se observa en la figura 10 y 11, respectivamente. El contenido inicial de la PAN fue de 2,9 % de N en el tratamiento Orina y la aplicación de esta provoco que aumentara a un 3,5 % de N al día 14, llegando a su máximo el día 28 con un contenido de 4,4% N, en el caso de la PBN, en el día 14 después de la aplicación de los tratamientos se observó un aumento en el contenido de N % en los tres tratamientos, el mayor contenido de N (%) se observó en el tratamiento Orina+DCD, con un valor de 3,1 %, el cual fue estadísticamente diferente ($P > 0,05$) al tratamiento Orina.

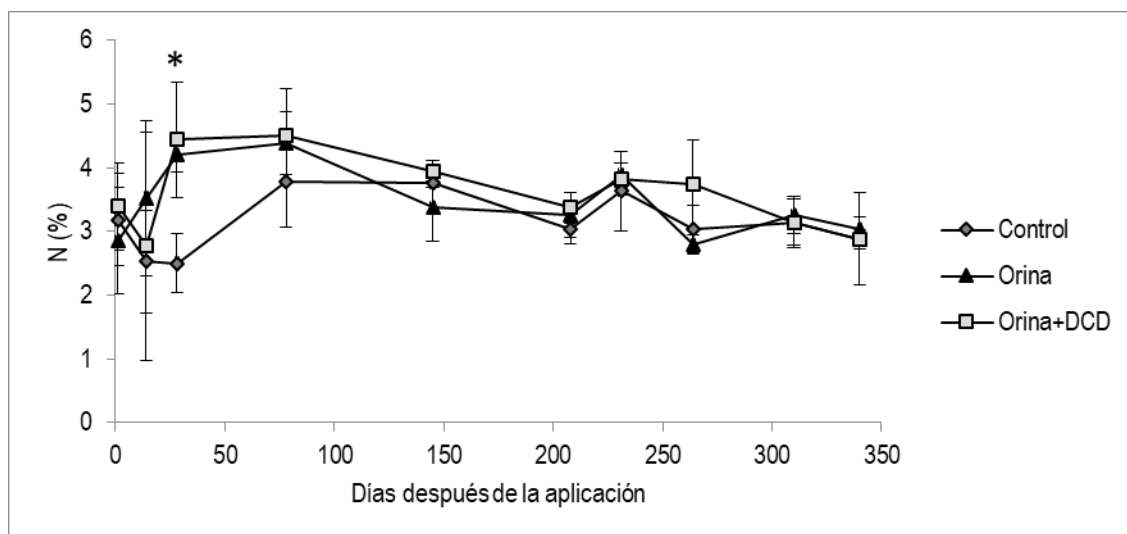


Figura 10. Nitrógeno (%) de la PAN tratadas con Orina y orina + DCD. Barras de error corresponden a la desviación estándar. * indica diferencias estadísticas entre los tratamientos según test de LSD Fisher ($p < 0,05$).

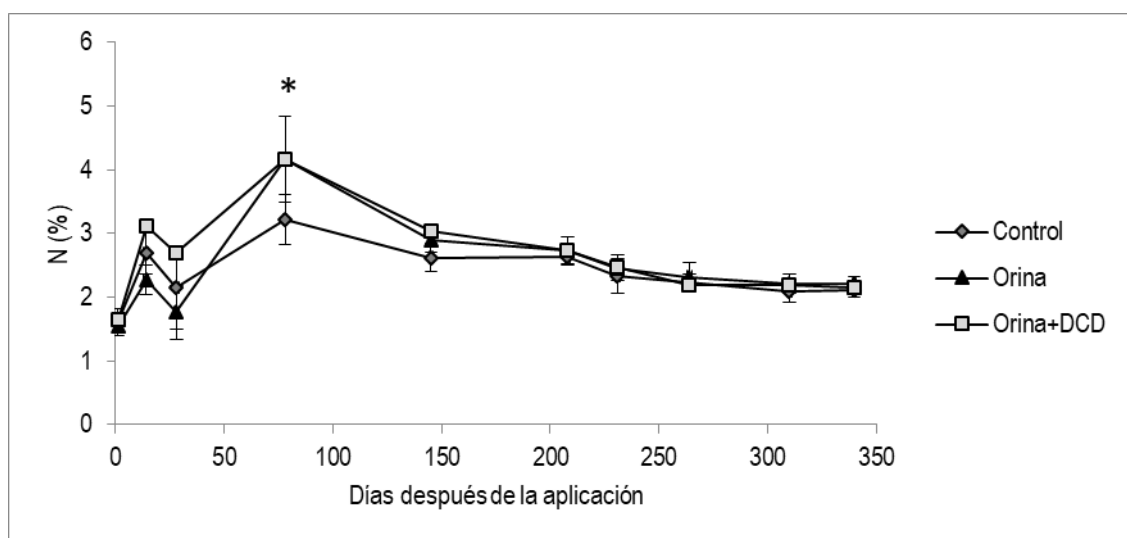


Figura 11. Nitrógeno (%) de la PBN tratadas con Orina y Orina+DCD. Barras de error corresponden a la desviación estándar. * indica diferencias estadísticas entre los tratamientos según test de LSD Fisher ($p < 0,05$).

La aplicación de Orina+DCD en la PAN produjo una disminución en el contenido de N de la pastura, disminuyendo después de la aplicación de la Orina+DCD a 2,7% de N. En la PAN fueron estadísticamente distintos ($P > 0,05$), el tratamiento Control a los tratamientos Orina y Orina+DCD el día 28 después de aplicación de los tratamientos. Los mayores contenidos de

N en la PBN se observaron en el día 78 con una concentración de 4,17% y 4,16% para los tratamientos Orina+DCD y Orina respectivamente, siendo estadísticamente diferentes al tratamiento Control ($P>0,05$), que presentó un contenido de N de 3,2%. Aproximadamente después de 4 meses el contenido de N de la PBN de los tratamientos Orina y Orina+DCD regresaron a valores similares al del tratamiento Control.

El efecto de la aplicación de Orina con y sin la aplicación del inhibidor de la nitrificación sobre el rendimiento de la PAN y la PBN se observa en la figura 12 y 13 respectivamente. No se observó una respuesta de la aplicación de Orina y Orina+DCD sobre el rendimiento ($\text{kg MS}^* \text{ha}^{-1}$) tanto en la PBN como en la PAN. El rendimiento de la PAN fue más variable que en la PBN, el máximo rendimiento para la PAN fue a los 78 días, y sus rendimientos variaron entre 492 a $616 \text{ kg MS}^* \text{ha}^{-1}$, en cambio en la PBN durante los primeros 78 días el rendimiento se mantuvo más constante, variando entre 315 a $386 \text{ kg MS}^* \text{ha}^{-1}$. El rendimiento máximo de la PAN fue en un 37,7% mayor que el rendimiento máximo de la PBN.

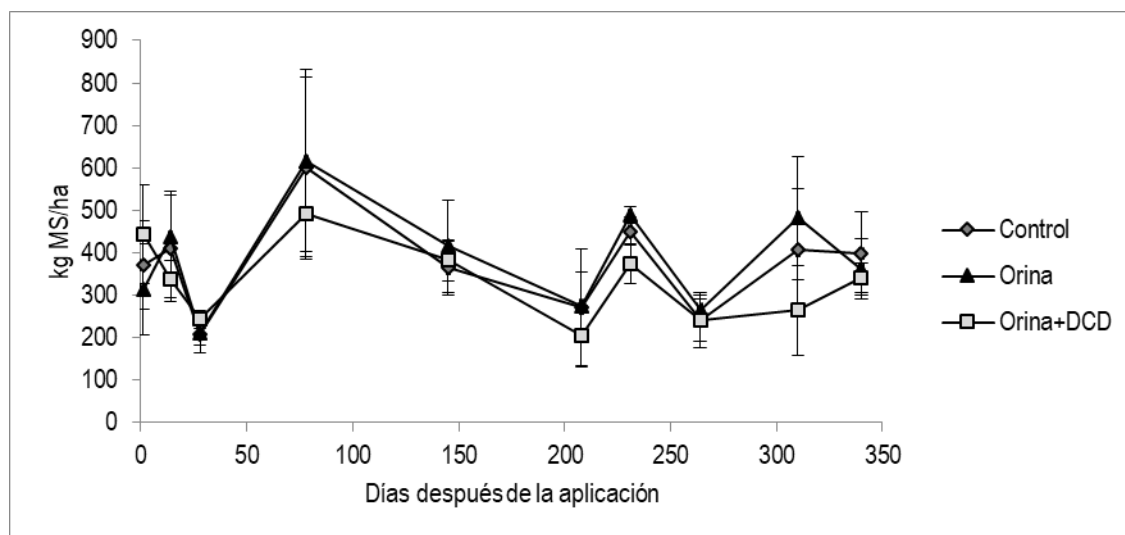


Figura 12. Rendimiento (kg MS/ha) de la PAN para los tratamientos Control, Orina y Orina+DCD. Barras de error corresponden a la desviación estándar.

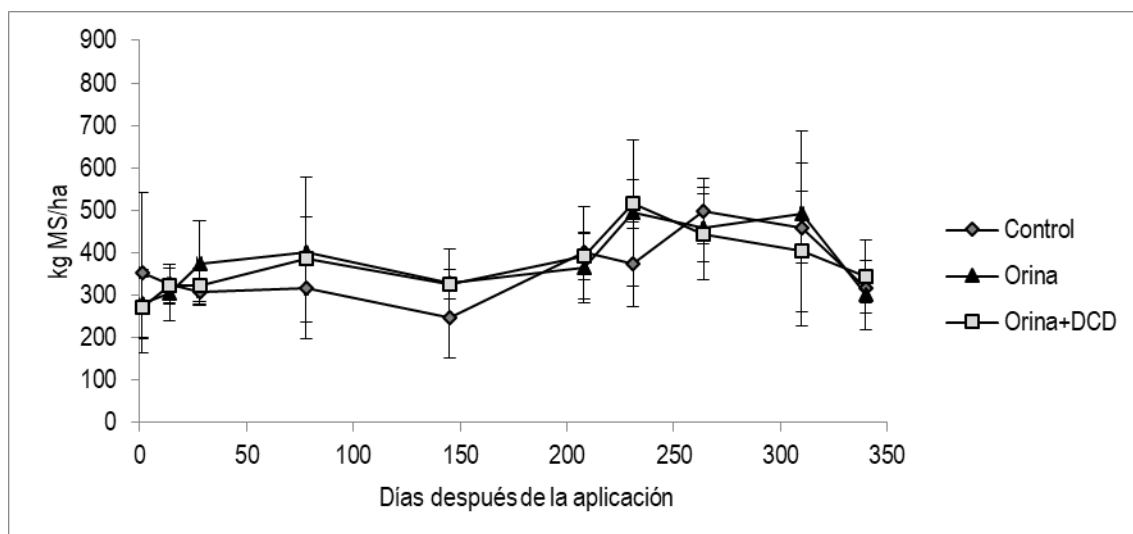


Figura 13. Rendimiento (kg MS/ha) de la PBN para los tratamientos Control, Orina y Orina+DCD. Barras de error corresponden a la desviación estándar.

Emissiones de N₂O

El efecto de la aplicación de Orina y de Orina+DCD sobre la emisión de N₂O en los sitios experimentales PAN y PBN se pueden observar en las Figura 14 y 15, respectivamente. Solo se observó un pico de emisión para el ensayo PAN asociado a la aplicación de Orina, en el día 26 después de la aplicación de los tratamientos, con flujos que alcanzaron 177,9 g N-N₂O ha⁻¹ día⁻¹ para el tratamiento Orina y 79,52 g N-N₂O ha⁻¹ día⁻¹ para el tratamiento Orina+DCD. La aplicación de Orina, con y sin el inhibidor de la nitrificación significó un aumento en el flujo de N₂O desde el suelo, pero el uso del inhibidor permitió disminuir las emisiones con respecto al tratamiento orina en un 55.3 % el flujo de N₂O en el día 26 para el ensayo PAN.

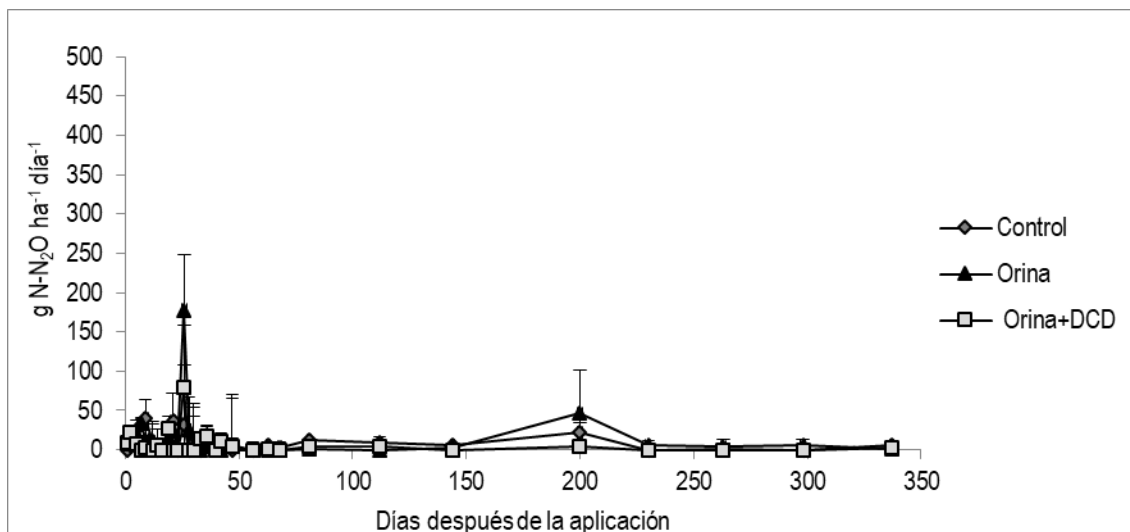


Figura 14. Emisiones de N₂O desde la PAN para los tratamientos Control, Orina y Orina+DCD. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

A partir de los flujos de N₂O obtenidos desde la PBN, se observaron 3 picos de emisión asociados a la aplicación de Orina y Orina+DCD, que corresponden a los días 9, 28 y 47 después de la aplicación de los tratamientos, los flujos de N₂O el día 9 alcanzaron valores de 66,6 g N-N₂O ha⁻¹ día⁻¹ para el tratamiento Orina y 100,9 g N-N₂O ha⁻¹ día⁻¹ para el tratamiento Orina+DCD, el segundo pico de emisión (día 28) los flujos de N₂O alcanzaron valores de 400,6 g N-N₂O ha⁻¹ día⁻¹ para el tratamiento Orina y de 332,4 g N-N₂O ha⁻¹ día⁻¹ para el tratamiento Orina+DCD, y el tercer pico de emisión de N₂O (día 47) registro flujos que alcanzaron 252,23 g N-N₂O ha⁻¹ día⁻¹ para el tratamiento Orina y de 206,67 g N-N₂O ha⁻¹ día⁻¹ para el tratamiento Orina+DCD. La aplicación de Orina, con y sin el inhibidor de la nitrificación significó un aumento en el flujo de N₂O desde el suelo, pero el uso del inhibidor en el ensayo PBN permitió disminuir las emisiones con respecto al tratamiento Orina en un 18% y 18,3% los días 28 y 47 respectivamente. No se observaron picos de emisión para el tratamiento Control en la PBN y PAN.

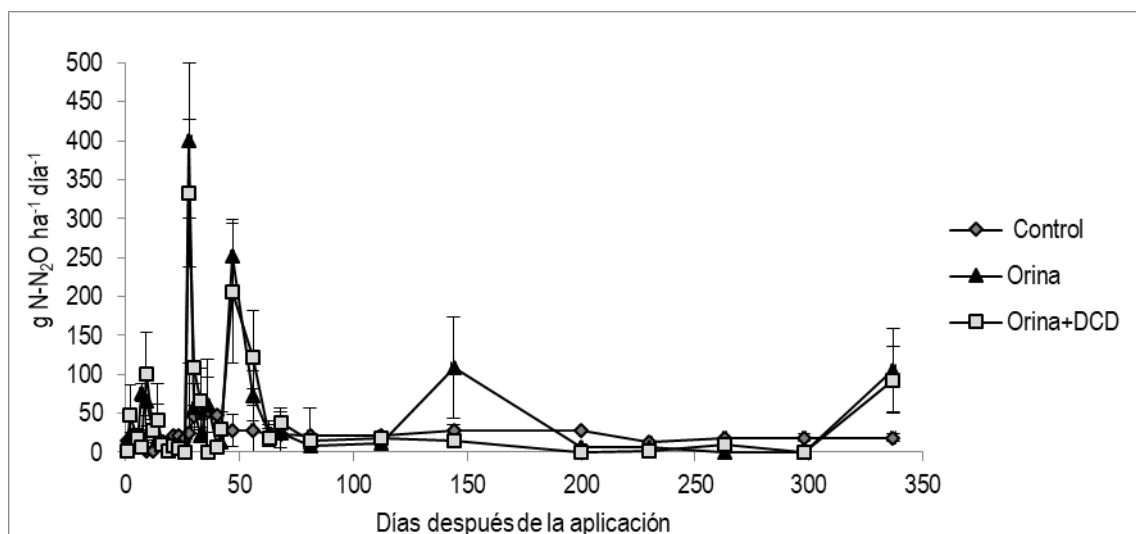


Figura 15. Emisiones de N₂O desde la PBN tratada con Orina y Orina + DCD. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Discusión

En la PBN se observaron múltiples picos de emisión de N₂O, los días 9, 28 y 47, después de la aplicación de Orina y Orina+DCD, a diferencia de la PAN donde solo se observó un pico de emisión el día 28. La posibilidad de múltiples picos de emisión de N₂O después de la aplicación de orina ha sido observado por otros autores ⁽⁸⁾ ⁽¹⁷⁾, además, ha sido reportado después de la aplicación de fertilizaciones nitrogenados ⁽¹⁸⁾ ⁽¹⁹⁾. En otro estudio Marsden et al. (2016) ⁽²⁰⁾, plantearon que se puede producir un flujo inicial de N₂O después de la aplicación de la orina como producto de la nitrificación, lo que posteriormente generaría varios picos de emisión de N₂O. En el caso de la PBN el primer pico de emisión de N₂O se observó a los 9 días después de la aplicación de los tratamientos, este pudo estar asociado principalmente al proceso de nitrificación en el suelo, debido a que las concentraciones de NO₃⁻ en el suelo todavía no se incrementaban después de la aplicación de orina, a la alta concentración inicial de NH₄⁺ en el suelo en la PBN y al aporte de NH₄⁺ producto de la hidrólisis de la urea que se encuentra en la orina ⁽²¹⁾.

Los mayores flujos de N_2O obtenidos en este estudio se obtuvieron en el tratamiento Orina, tanto en la PAN como en la PBN. En otras investigaciones realizadas, Zaman y Blennerhassett (2010) ⁽²¹⁾ determinaron que las máximas emisiones de N_2O asociadas a las manchas de orina fluctuaron entre $380 \text{ g N-N}_2\text{O ha}^{-1} \text{ día}^{-1}$ en mediciones realizadas en primavera y $950 \text{ g N-N}_2\text{O ha}^{-1} \text{ día}^{-1}$ en mediciones realizadas en otoño, además De Klein et al. (2011) ⁽²²⁾ determinó que los flujos máximos de N_2O asociadas a las manchas de orina durante el otoño fueron de $670 \text{ g N-N}_2\text{O ha}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Los flujos máximos de N_2O se observaron en el segundo pico de emisión en la PBN (día 28), y que además coinciden con el pico de emisión de la PAN. El flujo de N_2O para este día, tanto para el PBN como PAN, estaría asociado a un patrón de precipitaciones (22,3 mm) y a un aumento en la concentración de NO_3^- del suelo principalmente en el tratamiento donde se aplicó orina sin el inhibidor de la nitrificación, estas dos condiciones favorecieron las mayores emisiones de N_2O para este día. Sin embargo, la emisión de N_2O de la PAN desde el tratamiento orina fue un 155,6% menor a la emisión de N_2O desde la PBN, las mayores emisiones desde el PBN pueden estar dadas por el mayor contenido volumétrico de agua y la mayor temperatura del suelo de acuerdo con los datos obtenidos en la PAN desde los sensores de humedad y temperatura del suelo. Otro factor que estaría contribuyendo a las mayores emisiones de N_2O desde el PBN son las grandes diferencias observados en el análisis suelo realizado para describir las condiciones iniciales de cada sitio (PBN y PAN), donde el contenido de materia orgánica y la concentración de N-NO_3^- y N-NH_4^+ del suelo de la PBN, fueron aproximadamente un 100 % mayores a la PAN. En situaciones donde suelos presenten condiciones completamente anaeróbicas, se puede producir una desnitrificación completa del N, donde la mayoría del NO_3^- del suelo se transforma hasta N_2 ⁽²³⁾. Por lo tanto, las fluctuaciones diarias de las

emisiones de N_2O , después de la aplicación de la Orina y la Orina+DCD, están asociadas principalmente a los procesos de transformación del N en el suelo (hidrólisis de la urea, transformación del NH_4^+ y NO_3^-) los cuales se encuentran afectados principalmente por la humedad y la temperatura del suelo ^{(10) (19) (24)}.

La persistencia del DCD en el suelo varía según la concentración del DCD aplicado y las condiciones ambientales presentes en el sitio donde se aplicó, siendo la temperatura y la humedad los factores que más influyen en su persistencia ⁽²⁵⁾, además de la actividad de los microorganismos del suelo, los cuales pueden metabolizar el DCD como una fuente de N ⁽²⁶⁾. El DCD generalmente se considera activo como un inhibidor de la nitrificación por aproximadamente 4 meses ⁽²⁷⁾ y el efecto del DCD sobre las emisiones de N_2O no disminuye con su uso repetido.

Un resultado directo del inhibidor de la nitrificación fue que los niveles de NH_4^+ en el tratamiento Orina+DCD tanto para el PBN y la PAN, fueron considerablemente mayores, y se mantuvieron altos por aproximadamente 14-30 días después de la aplicación de la orina más el inhibidor. Sin embargo, la capacidad que tuvo el DCD en disminuir las emisiones de N_2O , fue de un 55% en la PAN y un 18 % en el PBN según los datos de los flujos para el día de máxima de emisión de N_2O (día 28). La capacidad del DCD de reducir las emisiones de N_2O fue menor a lo observado en otros estudios. Por ejemplo, en nueva Zelanda y Australia observaron que la aplicación de DCD al suelo puede reducir las emisiones directas de N_2O desde parches de orina hasta en un 90% ⁽²⁹⁾. Además, Zaman et al. (2008) ⁽²⁹⁾ y Di et al. (2007) ⁽³⁰⁾ observaron una reducción entre un 65-73% en las emisiones de N_2O desde el suelo después de la aplicación de DCD. Sin embargo, de acuerdo con valores reportados por

De Klein et al. (2011) ⁽²²⁾, la eficiencia del DCD para reducir las emisiones de N_2O desde parches de orina, puede ir desde un 0 a un 86%, con un promedio de 57%.

La temperatura del suelo parece ser uno de los factores claves de la capacidad inhibitoria de la nitrificación del DCD en nuestras condiciones. Zaman y Nguyen (2012) ⁽³¹⁾ reportaron que la eficiencia del DCD retardando la nitrificación varia con la estación del año (verano o invierno), observando que la efectividad del DCD fue mayor cuando se aplicó en invierno (38 días) que en el verano (21 días) principalmente debido a la temperatura que presentaba el suelo. Además, Di y Cameron (2004) ⁽³²⁾ observaron que la vida media del DCD disminuye con el aumento de la temperatura del suelo. De acuerdo con Schwarzer y Haselwandler (1991) ⁽²⁶⁾, la degradación del DCD ocurre a temperaturas que varían entre 10-33°C con una mayor tasa de degradación a 25°C. Además, Barneze et al. (2015) ⁽⁸⁾ observó que, a temperaturas de aproximadamente 15 °C, se produjo una rápida degradación del DCD en el suelo, y por lo tanto disminuyó la eficiencia del DCD. Adicionalmente, Welten et al. (2009) ⁽³³⁾ estimó que la vida media del DCD en estudios con suelo incubados a 20°C, fue inferior a 19 días.

El aumento en el pH después de la aplicación de orina es normal debido a la producción de iones hidroxilos (OH^-) durante la hidrólisis de la urea, mientras que la disminución posterior en el pH del suelo está relacionado a la producción de hidrogeno (H^+) durante la nitrificación ⁽¹⁰⁾. En condiciones normales el NH_4^+ es convertido a NO_2^- por bacterias nitrificantes, lo cual produce una disminución en el pH y la concentración de NH_4^+ en el suelo como se observó en los tratamientos donde solo se aplicó orina, tanto en la PAN como en el PBN. Sin embargo, el DCD, al inhibir la nitrificación provoca la acumulación de NH_4^+ , y por lo tanto favorece que el pH del suelo se mantenga alto, en este experimento el pH del suelo se mantuvo sobre 6

durante un periodo de 28 días en el tratamiento Orina+DCD. Estos cambios en el suelo son consistentes con otros estudios. Por ejemplo, Cookson y Cornforth (2002) ⁽³⁴⁾ en un estudio de campo observaron que el pH del suelo se mantuvo alto hasta 35 días después de la aplicación del tratamiento con DCD. Además, Zaman et al. (2009) ⁽¹⁰⁾ reportaron una tendencia similar en un ensayo a campo, donde el pH del suelo seguido a la aplicación de orina e inhibidores de la nitrificación produjo un aumento en el pH del suelo, sin embargo, el periodo en que el pH del suelo se mantuvo alto, varió de acuerdo con la época del año.

El rápido incremento en la concentración de NH_4^+ después de la aplicación de la orina, tanto para la PAN y el PBN, fue observado por otros autores, Cardenas et al (2016) ⁽¹⁷⁾ lo que refleja la rápida hidrólisis de la urea proveniente de la orina. La concentración NO_3^- en el tratamiento que solo se le aplicó orina, coincide con la disminución en la concentración de NH_4^+ en el suelo. La disminución gradual de la concentración de NO_3^- se reflejó en una limitada disponibilidad de NH_4^+ en el suelo, además de posibles pérdidas de NO_3^- por lixiviación, el consumo de NO_3^- por la pastura, por el proceso de desnitrificación y en menor medida por la reducción desasimilatoria de NO_3^- a NH_4^+ ⁽³⁵⁾.

Suelos con pasturas bajo pastoreo tratadas con inhibidores de la nitrificación, como el DCD, además de reducir las pérdidas de NO_3^- por lixiviación y reducir las emisiones de N_2O , pueden incrementar la eficiencia en el uso de N y el rendimiento de la pastura ⁽³⁰⁾. Por ejemplo, Moir et al. (2007) ⁽³⁶⁾ observaron que la aplicación de DCD sobre suelos bajo un pastoreo intensivo, aumentaron su rendimiento en un 21 %. Sin embargo, se ha reportado que la respuesta de una pastura a la aplicación de DCD puede ser más variable que el efecto del DCD sobre las pérdidas de NO_3^- por lixiviación y las emisiones de N_2O ⁽³⁷⁾. Esto puede estar relacionado a que el crecimiento de la pastura puede estar afectada por muchas

variables, que incluyen la disponibilidad de N y otros nutrientes, la humedad del suelo, la temperatura del suelo y las características físicas del suelo, como además la época del año. Sin embargo, en este experimento no se observó un efecto de la aplicación de orina sobre el rendimiento de la pastura tanto en la PAN y el PBN, pero si se observó un efecto sobre el contenido de N (%) en ambos sitios.

Varios estudios desde diferentes sistemas de producción reportaron que la aplicación de fertilizantes nitrogenados junto a inhibidores de la nitrificación mejoraría la biodisponibilidad del N, produciendo un incremento en el rendimiento del cultivo y el consumo de N ⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾. Igualmente, Moir et al. (2007)⁽³⁶⁾ observaron que pasturas bajo un parche de orina al cual se le aplicó DCD incrementaron su rendimiento en un 37%. La máxima concentración de N (%) se encontró en los tratamientos donde se aplicó orina, pero el efecto fue independiente del uso del DCD. Las concentraciones de NO_3^- pueden ser considerablemente altas bajo los parches de orina, debido a la alta carga de N que poseen. Sin embargo, esto puede disminuir significativamente a $800 \text{ mg NO}_3\text{-N kg}^{-1} \text{ MS}$, por el uso del DCD, representando una reducción de más del 80% ⁽³⁹⁾.

Los resultados sugieren que el uso del DCD a una dosis de 10 kg ha^{-1} , permitiría mitigar efectivamente los efectos del exceso N en las manchas de orina bovina tanto para la PBN como en la PAN. Por lo tanto, el uso de inhibidores de la nitrificación, como el DCD, en estas condiciones, podría ser una estrategia vinculadas a aumentar la eficiencia en el uso del N y disminuir las emisiones de N_2O .

Bibliografía

1. IPCC, 2013: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate

- Change [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 p.
2. Smith KA, McTaggart IP, Tsuruta H. 1997. Emissions of N₂O and NO associated with nitrogen fertilization in intensive agriculture, and the potential for mitigation. *Soil Use Management*, 13(4): 296–304.
 3. MVOTMA/UCC (Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente. Unidad de cambio climático). 2010. Tercera Comunicación Nacional de Uruguay a la Conferencia de las Partes en la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático.
 4. Bolan NS, Saggar S, Luo J, Bhandral R, Singh J. 2004. Gaseous emissions of nitrogen from grazed pastures: processes, measurements and modelling, environmental implications and mitigation. *Advances in Agronomy*, 84: 37 – 120.
 5. Dijkstra J, Oenema O, Van Groenigen JW, Spek JW, Van Vuuren AM, Bannink, A. 2013. Diet effects on urine composition of cattle and N₂O emissions. *Animal*, 7 (2): 292 – 302.
 6. Guo J, Peng Y, Wang S, Ma B, Ge S, Wang Z, Zhang L. 2013. Pathways and organisms involved in ammonia oxidation and nitrous oxide emission. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(21): 2213 – 2296.
 7. Luo J, De Klein CAM, Ledgard SF, Saggar S. 2010. Management options to reduce nitrous oxide emissions from intensively grazed pastures: a review. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 136: 282 – 91.
 8. Barneze AS, Minet EP, Cerri CC, Misselbrook T. 2015. The Effect of Nitrification Inhibitors on Nitrous Oxide Emissions from Cattle Urine Depositions to Grassland under Summer

- Conditions in the UK. *Chemosphere*, 119: 122 – 29.
9. Clough TJ, Di HJ, Cameron KC, Sherlock RR, Metherell AK, Clark H, Rys G. 2007. Accounting for the utilization of a N₂O mitigation tool in the IPCC inventory methodology for agricultural soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 78: 1 – 14.
 10. Zaman M, Saggar S, Blennerhassett JD, Singh J. 2009. Effect of Urease and Nitrification Inhibitors on N Transformation, Gaseous Emissions of Ammonia and Nitrous Oxide, Pasture Yield and N Uptake in Grazed Pasture System. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(6): 1270 – 80.
 11. Akiyama H, Uchida Y, Tago K, Hoshino YT, Shimomura Y, Wang Y, Hayatsu M 2015. Effect of dicyandiamide and polymer coated urea applications on N₂O, NO and CH₄ fluxes from Andosol and Fluvisol fields. *Soil science and plant nutrition*, 61: 541 – 551.
 12. Bronson KF, Mosier AR, Bishnoi SR. 1992. Nitrous oxide emissions in irrigated corn as affected by nitrification inhibitors. *Soil Science Society of America Journal*, 56: 161 – 165.
 13. De Klein CAM, Harvey M. 2012. Nitrous oxide chamber methodology guidelines. Wellington (New Zealand): Global Research Alliance on Agricultural Greenhouse Gases, Ministry for Primary Industries.
 14. Pedersen AR, Petersen SO, Schelde K. 2010. A comprehensive approach to soil-atmosphere trace gas flux estimation with static chambers. *European Journal of Soil Science*, 61: 888 - 902.
 15. R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
 16. Hutchinson GL, Mosier AR. 1981. Improved soil cover method for field measurement of

- nitrous oxide fluxes. *Soil Science Society of America Journal*, 45: 311-316.
17. Cardenas LM, Misselbrook TM, Hodgson C, Donovan N, Gilhespy S, Smith MS, Dhanoa KA, Chadwick D. 2016. Effect of the Application of Cattle Urine with or without the Nitrification Inhibitor DCD, and Dung on Greenhouse Gas Emissions from a UK Grassland Soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 235: 229 – 41.
 18. Krol DJ, Jones MB, Williams M, Richards KG, Bourdin F, Lanigan GJ. 2016. The effect of renovation of long-term temperate grassland on N₂O emissions and N leaching from contrasting soils. *Science of the Total Environment*, 560:
 19. Saggar S, Andrew R, Tate KR, Rodda N, Hedley CB, Townsend JA. 2004. Modelling Nitrous Oxide Emissions from New Zealand Grazed Pastures. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 68: 243–55.
 20. Marsden KA, Jones DL, Chadwick DR. 2016. The urine patch diffusional area: an important N₂O source?. *Soil Biology and Biochemistry*. 92: 161 – 170.
 21. Zaman M, Blennerhassett JD. 2010. Effects of the different rates of urease and nitrification inhibitors on gaseous emissions of ammonia and nitrous oxide, nitrate leaching and pasture production from urine patches in an intensive grazed pasture system. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 136(3–4), 236 – 246.
 22. De Klein CAM, Cameron KC, Di HJ, Rys G, Monaghan RM, Sherlock RR. 2011. Repeated Annual Use of the Nitrification Inhibitor Dicyandiamide (DCD) Does Not Alter Its Effectiveness in Reducing N₂O Emissions from Cow Urine. *Animal Feed Science and Technology*, 166 – 167: 480 – 91.
 23. Smith KA, McTaggart IP, Dobbie KE, Conen F. 1998. Emissions of N₂O from Scottish agricultural soils, as a function of fertilizer N. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 52:

24. Dalal RC, Wang W, Robertson GP, Parton WJ. 2003. Nitrous oxide emissions from Australian agricultural lands and mitigation options. *Australian Journal of Soil Research*, 41: 165 – 195.
25. Kelliher FM, Clough TJ, Clark H, Rys G Sedcole JR. 2008. The temperature dependence of dicyandiamide (DCD) degradation in soils: A data synthesis. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(7): 1878 – 1882.
26. Schwarzer C, Haselwandter K. 1991. Enzymatic degradation of the nitrification inhibitor dicyandiamide by a soil bacterium. *Soil Biology and Biochemistry*, 23: 309 – 310.
27. O'Callaghan M, Gerard EM, Carter PE, Lardner R., Sarathchandra U, Burch G, Bell N. 2010. Effect of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) on microbial communities in a pasture soil amended with bovine urine. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(9): 1425–1436.
28. De Klein CAM, Eckard RJ. 2008. Targeted technologies for nitrous oxide abatement from animal agriculture. *Australian Journal of Soil Research*, 48: 14 – 20.
29. Zaman M, Nguyen ML, Blennerhassett JD, Quin FQ. 2008. Reducing NH₃, N₂O and NO₃-N Losses from a Pasture Soil with Urease or Nitrification Inhibitors and Elemental S-Amended Nitrogenous Fertilizers. *Biology and Fertility of Soils*, 44(5): 693 – 705.
30. Di HJ, Cameron KC, Sherlock RR. 2007. Comparison of the effectiveness of a nitrification inhibitor, dicyandiamide, in reducing nitrous oxide emissions in four different soils under different climatic and management conditions. *Soil Use and Management*, 23:1 - 9.
31. Zaman M, Nguyen ML. 2012. How application timings of urease and nitrification inhibitors affect N losses from urine patches in pastoral system. *Agriculture, Ecosystems &*

Environment, 156: 37 – 48.

32. Di HJ, Cameron KC. 2004. Effects of temperature and application rate of a nitrification inhibitor, dicyandiamide (DCD), on nitrification rate and microbial biomass in a grazed pasture soil. *Australian Journal of Soil Research*, 42, 927 – 932.
33. Welten BG, Ledgard SF, Schipper LA, Judge AA. 2013. Effect of amending cattle urine with dicyandiamide on soil nitrogen dynamics and leaching of urinary-nitrogen. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 167: 12 – 22.
34. Cookson WR, Cornforth IS. 2002. Dicyanamide slows nitrification in dairy cattle urine patches: effects on soil solution composition, soil pH and pasture yield. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 1461 – 1465.
35. Silver WL, Herman DJ, Firestone MK. 2001. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium in upland tropical forest soils. *Ecology*, 82(9): 2410 – 2416.
36. Moir JL, Cameron KC, Di HJ. 2007. Effects of the nitrification inhibitor dicyandiamide on soil mineral N, pasture yield, nutrient uptake and pasture quality in a grazed pasture system. *Soil Use and Management*, 23: 111 – 120.
37. De Klein CAM, Shepherd MA, Van der Weerden TJ. 2014. Nitrous oxide emissions from grazed grasslands: Interactions between the N cycle and climate change - a New Zealand case study. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 9 – 10: 131 – 139.
38. Xu X, Boeckx P, Cleemput OV, Zhou L. 2002. Urease and nitrification inhibitors to reduce emissions of CH₄ and N₂O in rice production. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 64: 203-211.
39. Moir JL, Malcolm BJ, Cameron KC, Di HJ. 2012. The effect of dicyandiamide on pasture nitrate concentration, yield and N offtake under high N loading in winter and spring.

Grass and Forage Science, 67: 391 – 402.