

**EMISIONES DE METANO Y ÓXIDO NITROSO EN  
ARROZALES DE LA ZONA ESTE DEL URUGUAY:  
EL MANEJO DE CULTIVO COMO FACTOR  
DETERMINANTE**

Pasantía de grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas.  
Profundización en Biotecnología.

Virginia Pereyra

Orientadora: Dra. Silvana Tarlera

Laboratorio de Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental.

Cátedra de Microbiología. Facultad de Química – Facultad de Ciencias. UdelaR.

2009

## **Agradecimientos**

A Silvana Tarlera, por guiarme en este proceso de aprendizaje constante, por su permanente apoyo y por las instancias de discusión tan enriquecedoras y motivadoras.

A Ana Fernández, por sus valiosos aportes y consejos. A Pilar Irisarri y a Mariana Urraburu, por su útil enfoque agronómico.

Al Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA) por el apoyo económico, el cual permitió la realización de este trabajo.

A Marco Scavino por su valioso y fundamental apoyo en el análisis estadístico. A Gustavo Guerberoff y Lucía Gutiérrez por su disposición y la buena onda.

A Eliana Rodríguez y Javier Menes, por sus útiles aportes a este trabajo.

A Lucía Ferrando, Inés Bellini, Estefanía Geymonat, Inés Loaces y Jorge Wenzel por el tiempo compartido, sus consejos y auxilio en las tardes y noches del laboratorio.

A la Oficina de Asistentes Académicos de la Facultad de Ciencias, en especial a Javier Gorga y Beatriz Sosa, por el aguante y las divertidas discusiones biológicas.

A Anaclara, Andrea y Analía por sus consejos y ayuda en la estadística; a Silvana, Natalia, Néstor, Camila y Daniela por acompañarme en esta etapa que vivimos juntos.

A mi familia y a Diego, por el apoyo incondicional de siempre.

## ÍNDICE

<b>Agradecimientos .....</b>	<b>2</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>3</b>
<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>4</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
2.1 Procesos microbianos productores de CH <sub>4</sub> y N <sub>2</sub> O en suelos cultivados con arroz.....	5
2.2 Determinantes de la producción y emisión de CH <sub>4</sub> y N <sub>2</sub> O en el cultivo de arroz .....	8
2.3 Emisiones de CH <sub>4</sub> y N <sub>2</sub> O por suelos cultivados con arroz en Uruguay .....	10
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
3.1 Objetivo general .....	12
3.2 Objetivos específicos .....	12
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
4.1 Diseño experimental .....	13
4.2 Mediciones de CH <sub>4</sub> y N <sub>2</sub> O.....	14
4.3 Análisis de componentes del suelo.....	16
4.4 Análisis estadístico .....	16
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>18</b>
5.1 Puesta a punto y estandarización del análisis de las muestras de aire.....	18
5.2 Emisiones de CH <sub>4</sub> y N <sub>2</sub> O .....	20
5.3 Componentes del suelo.....	24
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>26</b>
6.1 Conclusiones y perspectivas.....	30
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>32</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>38</b>

## 1. RESUMEN

El cultivo de arroz es considerado una de las principales fuentes de emisión antropogénica de metano ( $\text{CH}_4$ ) en el mundo y una importante fuente de óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ); ambos gases contribuyentes al efecto invernadero. Uruguay es el sexto exportador de arroz en el mundo. Sin embargo, no existe información local acerca de los niveles de emisión de  $\text{CH}_4$  y  $\text{N}_2\text{O}$  durante el período de cultivo de arroz. El objetivo de este trabajo es cuantificar in situ las emisiones de  $\text{CH}_4$  y  $\text{N}_2\text{O}$  en arrozales de la zona Este del Uruguay y evaluar la incidencia del manejo de cultivo sobre ellas. Se realizó un ensayo de invernáculo y un ensayo de campo, con la finalidad de estudiar el efecto de la fertilización nitrogenada, el manejo de agua del cultivo de arroz, y la incidencia de distintos tipos de cobertura invernal sobre las tasas de emisión de  $\text{CH}_4$  y  $\text{N}_2\text{O}$ . Para cuantificar la magnitud y el flujo de  $\text{CH}_4$  y  $\text{N}_2\text{O}$  emitidos por el suelo en cultivo, se utilizó el “método de cámaras cerradas”. El análisis de la concentración de  $\text{CH}_4$  y  $\text{N}_2\text{O}$  en las muestras de aire se realizó mediante técnicas analíticas de cromatografía gaseosa. Los experimentos implementados evidenciaron que la dinámica de las emisiones de ambos gases está determinada en gran medida por el manejo de agua y su incidencia en el potencial redox del suelo. Por otro lado, la fertilización nitrogenada y la presencia de la cobertura invernal Raigrás influyó positivamente en la emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{CH}_4$ .

## 2. INTRODUCCIÓN

El cultivo de arroz es considerado una de las principales fuentes de emisión antropogénica de metano ( $\text{CH}_4$ ) en el mundo y una importante fuente de óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ); ambos gases contribuyentes al efecto invernadero (Jacobson, 2005) y responsables de un 25% del aumento del calentamiento global (Mosier, 1998). De acuerdo al Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC), el  $\text{CH}_4$  contribuye 21 veces más que el  $\text{CO}_2$  al calentamiento del sistema climático (IPCC, 2007). El IPCC tiene como objetivo analizar la información científica necesaria para abordar el problema del cambio climático, evaluar sus consecuencias medioambientales y socioeconómicas, y formular estrategias de respuesta realistas. Las principales fuentes emisoras de  $\text{CH}_4$  incluyen ambientes anaerobios tales como el cultivo de arroz irrigado, la fermentación entérica en animales y los humedales naturales (Jacobson, 2005). Las fuentes naturales de emisión de  $\text{CH}_4$  contribuyen en un 30% a la emisión global de  $\text{CH}_4$  a la atmósfera. Las fuentes de emisión de  $\text{CH}_4$  antropogénicas constituyen aproximadamente un 70% de las emisiones de  $\text{CH}_4$  globales, y se estima que un 20% de éstas proviene del cultivo de arroz irrigado (IPCC, 2001). Por otro lado, a pesar de que los niveles de emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  en cultivos de arroz inundados tienden a ser menores a los niveles de  $\text{CH}_4$  emitidos, el estudio de las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  resulta relevante al considerar que este gas contribuye 310 veces más al cambio climático que el  $\text{CO}_2$  (IPCC, 2007). Además, el  $\text{N}_2\text{O}$  contribuye a la disminución del ozono estratosférico, ya que puede ser fotooxidado a óxido nítrico el cual es capaz de catalizar la destrucción del ozono (Crutzen, 1970). Los suelos agrícolas constituyen la principal fuente antropogénica de emisión de  $\text{N}_2\text{O}$ . Se estima que los procesos microbianos relacionados con la actividad agrícola, contribuyen en un 65% y 70% a las emisiones antropogénicas de  $\text{CH}_4$  y  $\text{N}_2\text{O}$  respectivamente (Thornton & Valente, 1996; Chan & Parkin, 2001).

### 2.1 Procesos microbianos productores de $\text{CH}_4$ y $\text{N}_2\text{O}$ en suelos cultivados con arroz

El  $\text{CH}_4$  y el  $\text{N}_2\text{O}$  son productos del metabolismo de distintas comunidades bacterianas que habitan el suelo. Los cultivos de arroz irrigado constituyen un ambiente propicio para el crecimiento de microorganismos anaerobios estrictos tales como las bacterias metanogénicas pertenecientes al Dominio *Archaea* (García, 1990). La metanogénesis constituye una vía de obtención de energía para estos microorganismos,

quienes desarrollan la última etapa de la cadena trófica bacteriana de descomposición anaeróbica de la materia orgánica en el suelo. Esta degradación de la materia orgánica ocurre por la interacción cooperativa de varios grupos fisiológicos de bacterias (Madsen, 2008). Como consecuencia de la fermentación de polímeros orgánicos hidrolizados y la sucesiva acción de bacterias acetogénicas puede producirse acetato e hidrógeno gaseoso, ambos posibles sustratos de la metanogénesis. En la metanogénesis hidrogenotrófica el hidrógeno es oxidado a la vez que el  $\text{CO}_2$  es reducido, mientras que en la metanogénesis acetotrófica el  $\text{CH}_4$  proviene de la activación del acetato a acetyl-CoA, y la posterior reducción del grupo metilo y oxidación del CO producidos mediante el clivaje de la acetyl-CoA. Ambas vías metabólicas son mediadas por la acción de diversas coenzimas y la catálisis de enzimas, en su mayoría específicas y exclusivas de las bacterias metanogénicas (Müller *et al.*, 1993). Sin embargo, el conjunto de estas reacciones y la consecuente producción de  $\text{CH}_4$  ocurre únicamente luego del consumo de aceptores de electrones más eficientes, de acuerdo al siguiente orden descendente:  $\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Mn}^{4+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , y  $\text{SO}_4^{2-}$  (Patrick, 1981). En el cultivo de arroz, es esperable que la emisión de  $\text{CH}_4$  sea detectable únicamente luego de períodos extensos de inundación del cultivo, ya que es indispensable para la activación del metabolismo metanogénico que el potencial redox del suelo se sitúe por debajo de los -150 mV aproximadamente (Masscheleyn *et al.*, 1993).

Asimismo, el  $\text{CH}_4$  producido en los suelos puede ser oxidado aeróbicamente por la flora metanótrofa a dióxido de carbono, por lo que la emisión neta de  $\text{CH}_4$  a la atmósfera consiste en el resultado del balance entre ambos procesos (Macalady *et al.*, 2002). En los cultivos de arroz bajo inundación, aproximadamente el 80% del  $\text{CH}_4$  producido es consumido por bacterias metanótroficas que habitan la interfase suelo-agua y la rizósfera de la planta de arroz (Gilbert & Frenzel, 1995). En estos microambientes el acceso al oxígeno es posible por difusión a través de la columna de agua o directamente desde las raíces de la planta, a la vez que el acceso al  $\text{CH}_4$  es facilitado por difusión desde las zonas anaerobias circundantes en las cuales puede desarrollarse la metanogénesis.

Por otro lado, en los suelos cultivados con arroz también pueden desarrollarse los procesos de nitrificación y desnitrificación microbiana responsables de la producción de  $\text{N}_2\text{O}$ . La nitrificación es el proceso por el cual bacterias aerobias estrictas oxidan amoníaco a nitrito y luego a nitrato. Los microorganismos nitrificantes pueden ser autótrofos o heterótrofos, aunque la nitrificación autótrofa es la más común en la

mayoría de los suelos (Robertson & Groffman, 2007). La nitrificación autótrofa es desarrollada por dos grupos bacterianos diferentes los cuales obtienen por este medio energía para su metabolismo y crecimiento celular: oxidantes de amoníaco y oxidantes de nitrito. Las enzimas amonio-monooxigenasa e hidroxilamina oxidoreductasa catalizan la oxidación del amoníaco a hidroxilamina y luego a nitrito respectivamente. La nitrificación culmina con la producción de nitrato, la cual es catalizada por la enzima nitrito oxidoreductasa de las bacterias oxidantes de nitrito. En el transcurso de la nitrificación, puede producirse  $N_2O$  como sub-producto incompletamente oxidado (Conrad, 1996). Además, la contribución de la nitrificación a la producción de  $N_2O$  en los suelos ocurre en sitios en los cuales el acceso al oxígeno es restringido, donde algunos oxidantes de amoníaco (nitrificadores desnitrificantes) pueden utilizar nitrito como aceptor final de electrones reduciéndolo a óxido nítrico y luego a  $N_2O$  (Ferguson *et al.*, 2007). Dada la naturaleza estrictamente aerobia de la nitrificación, es esperable que la misma se desarrolle principalmente en los períodos de cultivo de arroz no inundado. Igualmente, las bacterias nitrificantes pueden actuar incluso en los momentos en los que el cultivo de arroz se encuentra inundado; en la interfase suelo-agua y en el microambiente aerobio que rodea a las raíces de la planta. De esta manera, el nitrato producido en estas zonas podría difundir a los sitios anóxicos circundantes, produciéndose  $N_2O$  a través de la desnitrificación desarrollada por las bacterias desnitrificantes de manera acoplada a la nitrificación (Van Cleemput *et al.*, 2007).

La desnitrificación consiste en la reducción de nitrato como aceptor final de electrones de la cadena respiratoria de ciertos microorganismos dando lugar a la formación de óxido nítrico, óxido nitroso o nitrógeno molecular. Esta reacción es llevada a cabo por una gran variedad de bacterias en su mayoría heterótrofas y anaerobias facultativas. Las enzimas nitrato reductasa, nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa sintetizadas por bacterias desnitrificantes actúan secuencialmente en ausencia de oxígeno reduciendo el nitrato a nitrógeno molecular. Cada uno de los compuestos producidos por la acción de estas enzimas constituyen intermediarios de la reacción de desnitrificación, incluido el  $N_2O$  el cual puede ser producido y consumido por un mismo individuo o incluso por distintos individuos desnitrificantes (Zumft, 1997). La emisión de  $N_2O$  a la atmósfera es consecuencia de su producción y consumo netos, y ocurre en mayor medida en condiciones en las cuales el potencial redox del suelo excede los valores necesarios para la reducción completa del nitrato (Hou *et al.*, 2000). Estas condiciones contemplan principalmente a los cultivos

de arroz recientemente inundados, así como a los microambientes anaerobios de suelos no inundados, en los cuales la velocidad de consumo de oxígeno supera la capacidad de difusión desde el exterior de este gas (Robertson & Groffman, 2007).

## **2.2 Determinantes de la producción y emisión de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O en el cultivo de arroz**

Los procesos microbianos determinantes de los niveles de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O en la atmósfera se ven afectados por diversos factores químicos y biológicos tales como el pH, la temperatura, el potencial redox del suelo y su contenido de nitrógeno y carbono orgánico (Smith *et al.*, 1998; Hou *et al.*, 2000; Towprayoon *et al.*, 2005). Estas variables ambientales controlan el metabolismo bacteriano a través de su incidencia en la síntesis y actividad enzimática, o en la proliferación de los microorganismos que habitan el suelo (Conrad, 1996). En particular, la metanogénesis es regulada principalmente por la concentración de oxígeno y el contenido de materia orgánica en suelo, además de por otros factores que determinan su potencial redox. Dada su condición estrictamente anaerobia, las bacterias metanogénicas pueden crecer y producir CH<sub>4</sub> únicamente bajo condiciones de ausencia de oxígeno, además de ser necesaria la ausencia de aceptores de electrones alternativos, para el desarrollo de un ambiente fuertemente reductor. Además, la exposición al oxígeno desencadena una disociación irreversible de los complejos enzimáticos responsables de la metanogénesis, inhibiéndola (Oremland, 1988). El aumento de la materia orgánica disponible en suelos inundados para su posterior descomposición anaerobia estimula la metanogénesis al constituir un sustrato para la producción de acetato e hidrógeno, y al promover la condición reductora del suelo mediante la activación del metabolismo de microorganismos consumidores de oxígeno (Sass *et al.*, 1991). En el cultivo de arroz, la mayor parte de la materia orgánica proviene de la planta, tanto de la exudación de compuestos orgánicos como de la descomposición de las raíces (Waschütza *et al.*, 1992). A su vez, la composición de estos exudados puede variar en función del estado fenológico de la planta (Kerdchoechuen, 2005) y por tanto incidir en la producción de CH<sub>4</sub> diferencialmente durante el transcurso del cultivo.

Por otro lado, dado que la producción de CH<sub>4</sub> en suelos cultivados ocurre principalmente en períodos inundados y debido a la baja tasa de difusión en agua de este gas, el transporte de CH<sub>4</sub> a la atmósfera constituye un factor de especial importancia en la determinación de la magnitud de CH<sub>4</sub> emitido por el suelo. En el cultivo de arroz en

zonas templadas, el transporte de  $\text{CH}_4$  hacia la atmósfera se da mayoritariamente a través de la planta (Holzapfel-Pschorn *et al.*, 1986a). El  $\text{CH}_4$  producido en las zonas cercanas a la planta de arroz ingresa a los espacios intercelulares lisígenos de sus raíces en función del gradiente de concentración entre éstos y el suelo-agua circundante, y es transportado hacia el exterior a través de estos espacios intercelulares y las células del aerénquima (Nouchi *et al.*, 1990).

Las principales variables ambientales que regulan la nitrificación en los suelos son la concentración de amonio y oxígeno, y su consecuente disponibilidad para las bacterias nitrificantes. El aumento en el ingreso de amonio al suelo, ya sea por una mayor mineralización neta de la materia orgánica en el mismo como por la aplicación de fertilización nitrogenada, está directamente vinculado con el aumento en la velocidad de la nitrificación (Robertson & Groffman, 2007). Por esta razón, la calidad y cantidad de materia orgánica en el suelo, además de la presencia de plantas y microorganismos heterótrofos capaces de inmovilizar el nitrógeno soluble adquieren protagonismo en la dinámica de la nitrificación. Asimismo, es esperable que la fertilización del suelo con amonio se asocie con un aumento en la emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  por nitrificación. Por otro lado, debido a que el oxígeno resulta indispensable para las bacterias nitrificantes como aceptor de electrones donados a partir del amonio, la reacción de nitrificación es estimulada en condiciones en las cuales el acceso al mismo es alto.

A su vez, el principal factor que regula la desnitrificación en los suelos es la presión parcial de oxígeno en éstos. La desnitrificación se desarrolla únicamente cuando el acceso al oxígeno por parte de las bacterias desnitrificantes es limitado. En caso contrario, el oxígeno actúa en lugar del nitrato como un aceptor de electrones más eficiente en la respiración bacteriana. Las enzimas que catalizan la desnitrificación son sintetizadas únicamente en ausencia de oxígeno y son inhibidas inmediatamente por un aumento en la presión parcial del mismo (Van Spanning *et al.*, 2007). Además, estas enzimas inician y ven estimulada su actividad en función del nitrato y carbono orgánico disponible en los suelos. La presencia y el aumento de carbono orgánico en el suelo inciden en el metabolismo de las bacterias desnitrificantes heterótrofas al constituir su fuente de energía, además de por su capacidad de regular el contenido de oxígeno (Conrad, 1996). El aporte de nitrato a los suelos depende a su vez de la nitrificación y de la fertilización nitrogenada, entre otros. Por esta razón, estos procesos pueden ser también responsables de la magnitud de la desnitrificación y eventual emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  a la atmósfera.

Las variables ambientales que regulan los procesos microbianos en suelos cultivados están a su vez determinadas por las distintas prácticas agrícolas implementadas. En el cultivo de arroz, el manejo del cultivo puede incidir en gran medida en los procesos biológicos de nitrificación, desnitrificación y metanogénesis, determinando la magnitud y dinámica de emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O. En arrozales bajo inundación cultivados en campo, Hou *et al.* (2000) hallaron una correlación inversa entre las emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O y una dependencia entre estos valores y el potencial redox del suelo, en la cual la emisión de CH<sub>4</sub> ocurre bajo condiciones fuertemente reductoras mientras que la emisión de N<sub>2</sub>O se produce en condiciones más oxidadas. Este hecho se vincula directamente con la influencia del régimen de inundación sobre las emisiones de ambos gases reportada en el cultivo de arroz, habiéndose observado cómo el retiro de agua durante el período de inundación determina una disminución en las emisiones de CH<sub>4</sub>, pero frecuentemente un aumento en la producción de N<sub>2</sub>O (Towprayoon *et al.*, 2005). Sin embargo, a pesar de asociarse frecuentemente a los períodos de secado con altos niveles de emisión de N<sub>2</sub>O, la mayor emisión de N<sub>2</sub>O puede ocurrir luego de inundar el cultivo o de presentarse lluvias mayores a 20 mm, por desnitrificación del nitrato acumulado previamente (Bronson *et al.*, 1997b). En cuanto a la fertilización nitrogenada de los cultivos, varios autores han observado un aumento en la producción de N<sub>2</sub>O ante la aplicación de fertilizante nitrogenado en forma de urea, sales amónicas o sales nítricas; sustratos disponibles para las reacciones de nitrificación y desnitrificación (Cai *et al.*, 1997; Mei *et al.*, 2004). Por otro lado, existen evidencias acerca de cómo el aporte de materia orgánica a los suelos determina un aumento en la producción de CH<sub>4</sub> (Neue *et al.*, 1996; Johnson-Beebout *et al.*, 2009).

Dado su impacto significativo sobre las emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O, estas prácticas agrícolas deberían ser contempladas en su conjunto con el fin de diseñar estrategias de mitigación que minimicen al máximo posible las emisiones de ambos gases. A su vez, estas estrategias deben ser formuladas considerando los efectos que eventualmente pueden tener sobre el rendimiento del cultivo de arroz, intentando interferir en la menor medida posible con el mismo (Majumdar, 2003).

### **2.3 Emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O por suelos cultivados con arroz en Uruguay**

Uruguay es el sexto país exportador de arroz en el mundo (ACA, 2008). Sin embargo, no existe información local acerca de los niveles de emisión de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O

durante el período de cultivo de arroz. Los estudios elaborados hasta el momento se han centrado en análisis de laboratorio de cinéticas de producción de  $N_2O$  (Tarlera *et al.*, 2006) y de  $CH_4$  (Ferrando & Tarlera, 2009) y mediciones a campo de emisiones de  $N_2O$  y el efecto de inhibidores de la nitrificación sobre las tasas de emisión, como posible estrategia para la reducción de estas emisiones (Domínguez *et al.*, 2007). La cuantificación local de las emisiones de  $CH_4$  y  $N_2O$  y su comportamiento frente a los manejos de cultivo habituales en el país es de gran importancia, ya que los procesos microbianos responsables de la producción de estos gases están fuertemente determinados por las condiciones ambientales locales. El objetivo de este estudio es realizar una primera aproximación a la cuantificación de emisiones de  $CH_4$  y  $N_2O$  en sistemas de cultivo de arroz en el Este uruguayo y evaluar el impacto de distintos regímenes de inundación, fertilización nitrogenada y aportes de materia orgánica sobre las tasas de emisión de estos gases. La información generada permitirá avanzar en la determinación de factores de emisión locales asociados a determinados eventos para su potencial aplicación en condiciones similares. A su vez, el hallazgo de una incidencia significativa de distintos tipos de manejo del cultivo sobre los niveles de emisión de  $N_2O$  y  $CH_4$ , podría contribuir al diseño de modelos de producción de arroz que impliquen una disminución en la liberación de estos gases a la atmósfera.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Cuantificar *in situ* las emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O en arrozales de la zona Este del Uruguay y la incidencia de distintos manejos de cultivo sobre ellas.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- 1- Evaluar el efecto del régimen de inundación y fertilización nitrogenada del cultivo de arroz sobre las tasas de emisión de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O, bajo condiciones controladas de invernáculo.
- 2- Obtener y comparar datos de emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O en arrozales cultivados a campo bajo las condiciones de manejo de cultivo más habituales de la zona Este del Uruguay.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Diseño experimental

El ensayo de invernáculo se desarrolló en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) del Departamento de Treinta y Tres. Se sembró la variedad de arroz (*Oryza sativa* L.) “El Paso 144” en macetas con suelo proveniente de la Unidad “Paso de la Laguna” del INIA Treinta y Tres, con las siguientes características: textura franco limoso, pH 5,2; N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 0,3 mmol l<sup>-1</sup>; C orgánico 3,0–3,5% y materia orgánica 5,0–5,5%.

Con la finalidad de estudiar el efecto de la fertilización nitrogenada y el manejo de agua del cultivo de arroz sobre las emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O se aplicaron los siguientes tratamientos a las macetas cultivadas, cada uno con 4 repeticiones: a) inundación del cultivo a los 21 días de la emergencia de la planta de arroz, con fertilización nitrogenada; b) inundación a los 21 días de la emergencia, sin fertilización nitrogenada; y c) inundación a los 45 días de la emergencia, con fertilización nitrogenada. El fertilizante fue aplicado en las macetas correspondientes al momento de la siembra (fosfato de amonio) y en la etapa macollaje de la planta de arroz (urea), la cual tuvo lugar a los 21 días después de la emergencia (DDE). La emergencia ocurrió aproximadamente 9 días luego de la siembra. En las etapas previas a la inundación, se regaron los cultivos en función de su demanda. El nivel de agua durante la inundación se mantuvo en 5-6 cm por encima del suelo, hasta la maduración de la planta de arroz (Gamarra, 1996). La cosecha se realizó a los 134 DDE.

El ensayo de campo fue desarrollado en la Unidad “Paso de la Laguna” del INIA Treinta y Tres. En este ensayo se compararon distintos tipos de cobertura invernal previa a la siembra de arroz en función de su efecto sobre la magnitud de emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O, además de estudiarse la incidencia de la fertilización nitrogenada sobre las mismas.

El experimento consistió en bloques de 10 x 9.2 m con cuatro y dos repeticiones bajo dos tratamientos de cobertura invernal: sin vegetación y Raigrás, respectivamente. A su vez en cada bloque se instalaron dos cámaras y se muestreó una transecta sin fertilización nitrogenada, y otra transecta con fertilización nitrogenada efectuada al momento de la siembra (-23 DDE), en la etapa macollaje de la planta de arroz (21 DDE) y durante la diferenciación del primordio floral (51 DDE). La fertilización nitrogenada

se aplicó en forma de fosfato de amonio al momento de la siembra, y en forma de urea en las restantes aplicaciones. Se cultivó mediante siembra directa la variedad de arroz “INIA Olimar” y todos los bloques permanecieron inundados desde los 21 días de la emergencia de la planta de arroz, hasta su maduración. Además, se realizaron dos aportes de agua en forma de “baños” en las primeras etapas del cultivo para asegurar su implantación, un día y siete días después de la emergencia de la planta. La cosecha tuvo lugar a los 147 DDE y previamente se retiró el agua del cultivo, aproximadamente a los 144 DDE.

#### **4.2 Mediciones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O**

Para cuantificar la magnitud y el flujo de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O emitidos por el suelo en cultivo, se utilizó el “método de cámaras cerradas” (IAEA, 1992). Estas cámaras consisten en cilindros de acrílico transparentes de 60 cm de altura colocadas sobre una base de acero inoxidable de 20 cm de alto inserta 10 cm en el suelo (Fig. 1). Las bases permanecieron enterradas en el suelo durante todo el transcurso del experimento y la parte superior se colocó en el momento de la toma de muestras de aire. La unión de ambas partes se aseguró mediante un cierre de agua para evitar el escape de los gases (Lindau *et al.*, 1991). Las cámaras empleadas cuentan con un ventilador a batería el cual fue encendido 5 minutos antes del inicio de la toma de muestras, con el fin de asegurar la homogeneidad de la atmósfera interior a las cámaras. A su vez, cada cámara cuenta con un “tubo de ventilación” que atraviesa su sección superior, sumergido en su extremo externo en un vial con agua, con el fin de mantener el equilibrio entre la presión externa y la presión interna de la cámara (Hutchinson & Mosier, 1981). Además, cada cámara cuenta con un termómetro interno para la detección y el seguimiento de la temperatura dentro de las mismas.

En el momento del muestreo se tomaron tres duplicados de muestras de aire en viales de 10 ml (vacutainers) con vacío a intervalos regulares de 30 minutos (IAEA, 1992), comenzando con el primer duplicado a los 5 minutos de instaladas las cámaras. Las muestras fueron tomadas cada dos semanas aproximadamente desde la siembra hasta luego de la cosecha y con mayor frecuencia ante eventos asociados a variaciones en los niveles de emisión de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O tales como fertilización, riegos o inundación y etapa de floración de la planta de arroz (Smith *et al.*, 1998; Nicolaisen *et al.*, 2004). La temperatura del aire dentro y fuera de las cámaras de acrílico fue determinada a cada

tiempo de muestreo. Los materiales y procedimientos utilizados en este estudio cumplen en su mayoría con las condiciones de muestreo establecidas por Rochette & Eriksen-Hamel (2008).



**Figura 1.** Detalle de las cámaras empleadas para cuantificar el flujo de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O emitidos por el suelo en cultivo.

El análisis de las concentraciones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O en las muestras de aire se realizó mediante cromatografía gaseosa. Para la determinación de la concentración de N<sub>2</sub>O se utilizó un cromatógrafo de gases Shimadzu ECD-2014 (temperaturas de columna, inyector y detector: 40°C, 90°C y 250°C respectivamente, volumen de inyección: 2 ml, gas carrier: N<sub>2</sub>) equipado con un detector de captura electrónica <sup>63</sup>Ni. El análisis de la concentración de CH<sub>4</sub> se realizó mediante un cromatógrafo de gases Chrompack CP-9001 (temperaturas de columna, inyector y detector 55°C, 105°C y 140°C respectivamente, volumen de inyección: 0.5 ml, gas carrier: N<sub>2</sub>) equipado con un detector de ionización de llama. Sólo una de las muestras duplicadas fue analizada, mientras que el otro duplicado se utilizó ocasionalmente como control de calidad. Los cromatogramas de N<sub>2</sub>O y CH<sub>4</sub> obtenidos fueron analizados mediante el Software GC Solution y el Software PeakSimple, respectivamente.

La tasa de emisión de ambos gases se calculó según Watanabe *et al.* (2000):  $F = \rho \cdot h \cdot (dC/dt)$ ; donde  $F$  corresponde a la tasa de emisión de N-N<sub>2</sub>O o C-CH<sub>4</sub> en g·ha<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>;  $\rho$

es la densidad de N-N<sub>2</sub>O o C-CH<sub>4</sub> corregida por la temperatura existente en el interior de la cámara de muestreo;  $h$  es la altura de la cámara desde el suelo o el nivel de agua, y  $dC/dt$  es el incremento de la concentración de N<sub>2</sub>O o CH<sub>4</sub> dentro de la campana con el tiempo. Previamente al cálculo de tasas de emisión, se confirmó para cada caso la existencia de una relación lineal entre la concentración del gas correspondiente y el tiempo. La tasa de emisión obtenida para las réplicas de cada tratamiento fue promediada para determinar el valor final de emisión por tratamiento.

### **4.3 Análisis de componentes del suelo**

Simultáneamente a los muestreos de aire se tomaron muestras de los suelos bajo estudio (10-15 cm profundidad) para la determinación de pH, concentración de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). La determinación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se realizó mediante el método de reducción con cadmio cuperizado (Wood *et al.*, 1967), mientras que el análisis de la concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en suelo se realizó mediante la reacción de Berthelot (Rhine *et al.*, 1998). El pH se analizó mediante técnicas potenciométricas. Estos análisis fueron realizados en la Cátedra de Fertilidad de Suelos de la Facultad de Agronomía.

### **4.4 Análisis estadístico**

Los datos de emisión obtenidos en los ensayos de invernáculo y campo, considerados como datos longitudinales o medidas repetidas, fueron evaluados en ambos casos ajustando Modelos de Efectos Mixtos mediante el Software R desarrollado por “R Development Core Team” (2009). Los Modelos de Efectos Mixtos incluyen tanto efectos fijos como efectos aleatorios. En los modelos que contemplan únicamente efectos fijos, la única fuente de azar surge por considerar los casos como muestras independientes y aleatorias. Los efectos aleatorios surgen al realizar más de una observación en cada unidad experimental, como ocurre en este estudio (Venables & Ripley, 2002).

Para el análisis de los resultados obtenidos en invernáculo, se consideraron los tratamientos (combinaciones de distintos momentos de inundación y niveles de fertilización nitrogenada), la covariable tiempo y su interacción como efectos fijos, mientras que las repeticiones (unidades experimentales) fueron consideradas como efectos aleatorios. Los datos del ensayo de campo fueron analizados considerando a la

covariable tiempo, las coberturas invernales, el nivel de fertilización nitrogenada y la interacción entre estas dos últimas variables como efectos fijos. Al igual que en el ensayo de invernáculo, las repeticiones fueron consideradas como efectos aleatorios.

Se comparó mediante un análisis de varianza (ANOVA) el ajuste de modelos alternativos a los grupos de datos y se seleccionó el modelo más adecuado. Se aplicó un análisis de varianza ( $\alpha=0.05$ ) a los resultados obtenidos con el modelo finalmente ajustado, con la finalidad de determinar la significancia estadística de los términos del modelo (Pinheiro & Bates, 2000; Davis, 2002). De esta manera fue posible visualizar el efecto de los tratamientos y el tiempo sobre las emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O.

Para medir la intensidad de asociación entre las curvas de emisión de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O y los valores de concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y pH obtenidos a través del tiempo en los tratamientos respectivos, se realizó un análisis de correlación (Sokal & Rohlf, 1979). Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman para cada par de variables, considerando el flujo de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O a los -9, 7, 22, 28, 49 y 64 DDE en invernáculo y a los -9, 34, 78, 93 y 149 DDE en campo, para los cuales existen valores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y pH disponibles.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Puesta a punto y estandarización del análisis de las muestras de aire

Con la finalidad de optimizar el método de muestreo en el campo e invernáculo y asegurar un adecuado manejo en el laboratorio de las muestras obtenidas, se realizó de forma previa al inicio de los experimentos una serie de prácticas que contribuyeron a su vez a la estandarización del procedimiento de muestreo completo.

En primer lugar, se realizó un control del correcto funcionamiento de cada cámara de muestreo. Los puntos de unión de los componentes de las cámaras, considerados potenciales vías de pérdida de los gases en su interior, fueron sellados con distintos tipos de pegamento. Cada una de las cámaras se colocó sobre una superficie con agua para asegurar su aislamiento del exterior, y fue puesta a prueba introduciendo en su interior un determinado volumen de CH<sub>4</sub> (entre 4 y 6 ml, 99.995% pureza), para verificar posteriormente que la concentración del gas recuperado del interior de la cámara no disminuya con el transcurso del tiempo. Las mediciones se realizaron a intervalos de 30 minutos, comenzando a los 40 minutos de introducido el gas. El ventilador de la cámara se mantuvo encendido durante toda la prueba, y el procedimiento de toma de muestras fue el mismo al utilizado en los experimentos en campo e invernáculo.

Para la toma de muestras de aire del interior de las cámaras se utilizó una jeringa de 20 ml y un sistema de válvulas de 3 vías el cual interconecta la cámara, la jeringa y el vial donde se transportará la muestra. En cada muestreo, previamente a la toma del primer duplicado de muestras se procedió a contribuir con la homogeneización de la atmósfera interior de la cámara, aspirando y vaciando el total del contenido de la jeringa 3 veces. Luego se tomó del interior de la cámara un volumen de 18 ml y una vez habilitada la conexión de la jeringa con el vial se corroboró en cada caso que el mismo cuenta con un vacío de 10 ml, para luego inyectar a presión los restantes 8 ml. Este nivel de sobrepresión permitió satisfacer la necesidad de mantener las muestras a presiones mayores a la atmosférica para detectar la presencia del gas y un correcto almacenaje del mismo, y a su vez no constituye una sobrepresión excesiva, lo cual provocaría la apertura de los viales frente a cambios en la temperatura ambiente u otros factores.

Para el análisis de  $N_2O$  mediante cromatografía de gases se tomaron 15 ml de cada vial con una jeringa conectada a una válvula gas-tight. En esta etapa se corroboró en cada caso la presencia de sobrepresión y se confirmó que no hubiese habido pérdidas en la muestra. En caso contrario, se procedió al análisis del duplicado correspondiente. Luego, manteniendo la válvula cerrada se redujo en cada ocasión el volumen de la muestra en la jeringa a 10 ml, para luego abrir la válvula en un recipiente con agua, corroborar la presencia de un exceso de presión y permitir el establecimiento de un equilibrio con la presión atmosférica. Para el análisis de  $CH_4$  se procedió de la misma manera, pero el volumen tomado inicialmente fue de 1.5 ml, inyectando en el cromatógrafo finalmente 1 ml de muestra a presión atmosférica.

Dada la necesidad de detectar con precisión pequeñas concentraciones de  $CH_4$  y  $N_2O$ , incluso en algunos casos concentraciones cercanas a las atmosféricas, la construcción de curvas de calibración y preparación de estándares requirió de cuidados especiales los cuales resultaron fundamentales para la obtención de resultados coherentes. En particular, la utilización de una nueva jeringa en cada uno de los pasos que implica la preparación de los estándares más concentrados y los estándares diluidos a partir de éstos, fue un factor clave para evitar que concentraciones elevadas del gas en cuestión interfieran con la realización de las correspondientes diluciones. Para el análisis mediante cromatografía gaseosa de los estándares con concentraciones cercanas o levemente menores a las atmosféricas del gas correspondiente, se enjuagó en cada caso la jeringa a utilizar en un vial gaseado con  $N_2$  para evitar una posible alteración de los resultados por los gases presentes en el aire. Además, se siguió en cada ocasión la práctica habitual de manipular y analizar en primer lugar los estándares con concentraciones más bajas, procediendo de forma secuencial con el análisis de los estándares sucesivamente más concentrados. Al realizar el análisis diario de las muestras se verificó al inicio y al final al menos dos puntos de la curva de calibración construida previamente. Asimismo, dadas las bajas concentraciones en estudio y la susceptibilidad de los resultados obtenidos a pequeñas variaciones en la sensibilidad del equipo, fue necesario realizar un control de calibración del cromatógrafo durante el transcurso del análisis diario de muestras. Este seguimiento debió realizarse principalmente en el cromatógrafo Shimadzu, mediante un análisis de la concentración de  $N_2O$  de muestras de aire tomadas en el laboratorio aproximadamente cada 5-6 muestras analizadas. En el caso de detectarse una alteración en la reproducibilidad de

los resultados se procedía al análisis de un punto de la curva de calibración, para su posterior ajuste de acuerdo a las condiciones detectadas.

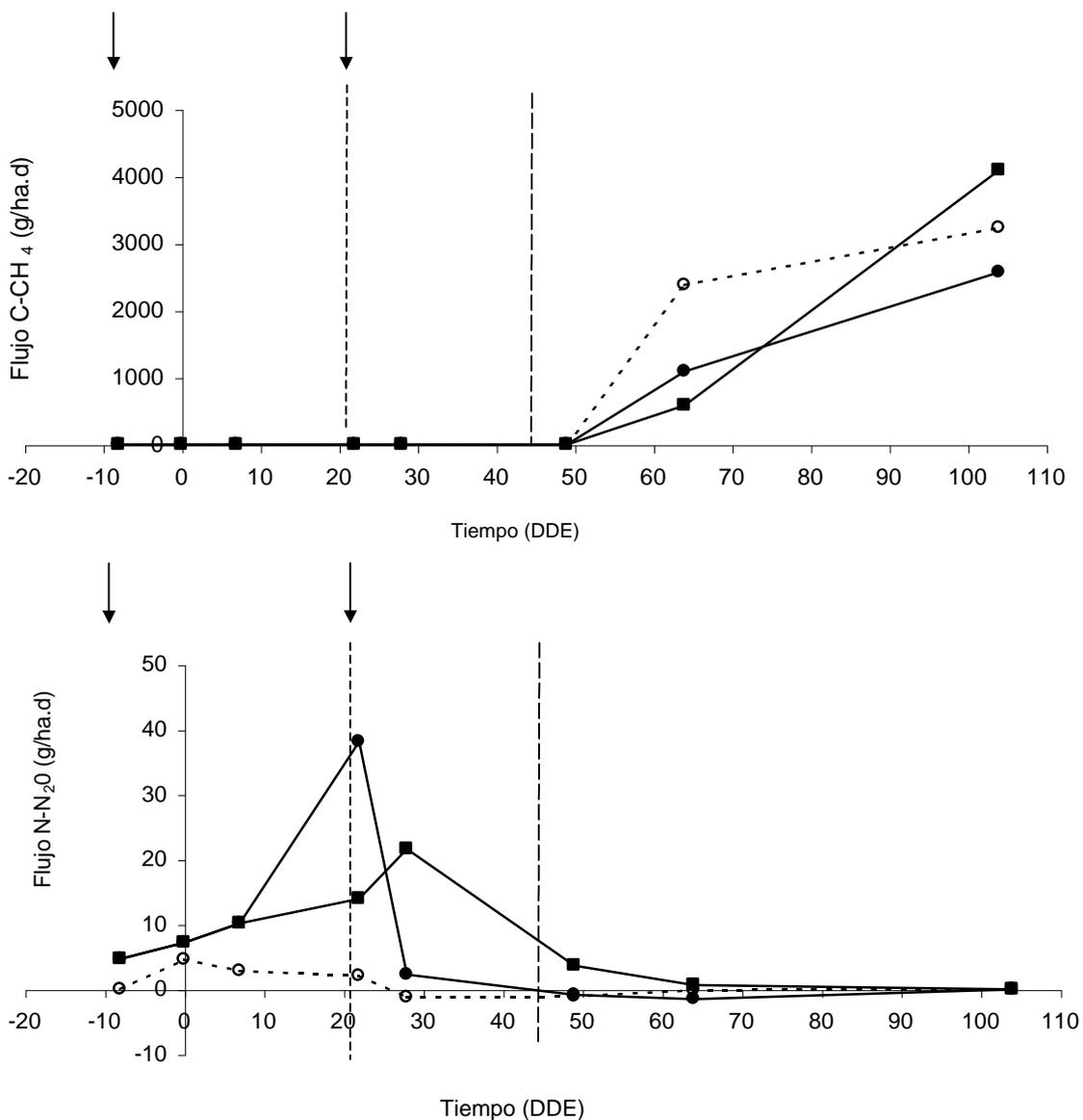
## 5.2 Emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O

En general, las emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O mostraron un comportamiento opuesto en el transcurso del ciclo de cultivo: la emisión de N<sub>2</sub>O fue máxima al comienzo de la inundación o en etapas de riego previas a ésta, mientras que el CH<sub>4</sub> alcanzó las mayores concentraciones únicamente en las últimas etapas de suelo inundado (Fig. 2 y 3). Para mayor claridad, en las Figuras 2 y 3 no se presenta la desviación estándar de los flujos de emisión promedio por tratamiento (ver Anexo). La existencia de una diferencia significativa entre las curvas de emisión de cada tratamiento se reporta en el texto como resultado del análisis estadístico realizado.

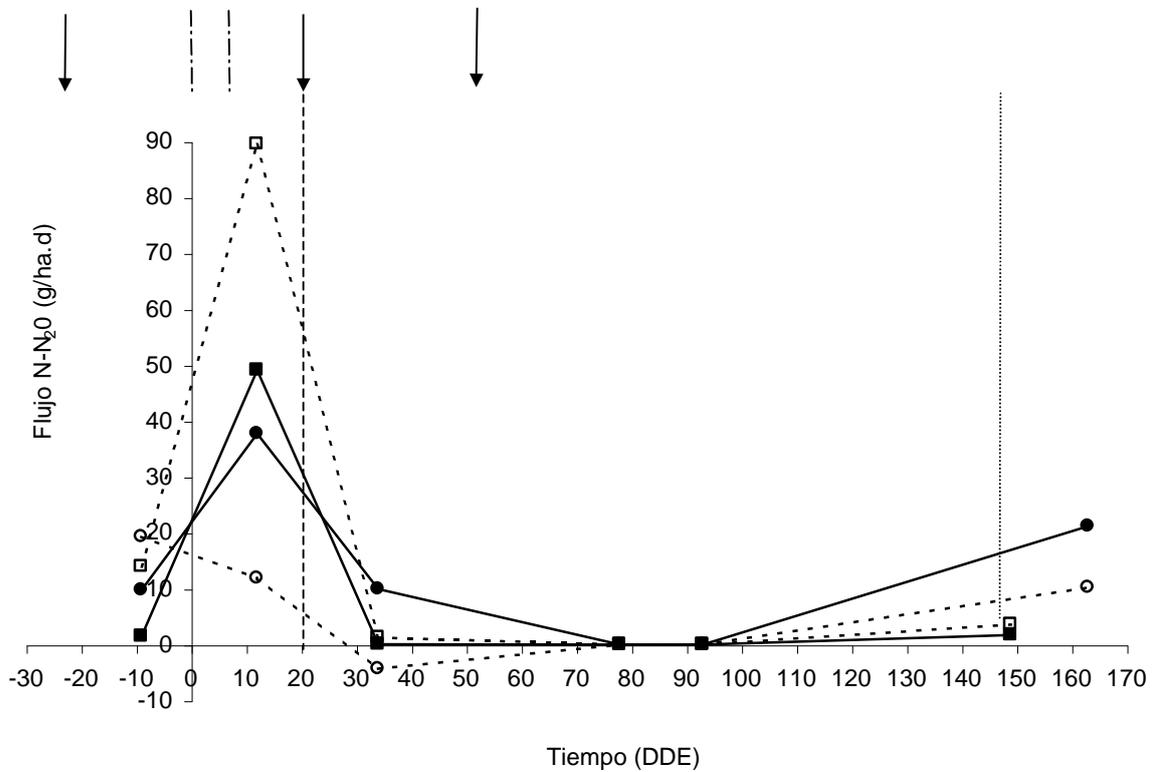
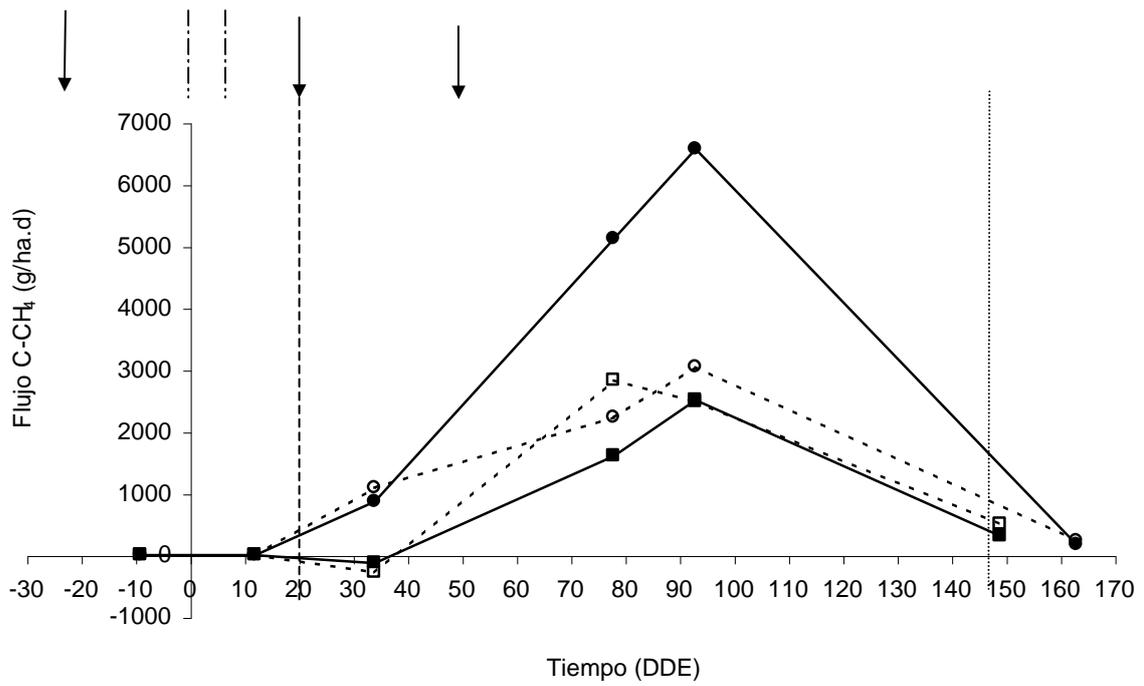
En los cultivos en invernáculo inundados a los 21 DDE, la emisión de CH<sub>4</sub> no fue detectable hasta luego de 5 semanas aproximadamente de establecida la inundación (55 DDE aprox.); mientras que en los inundados de forma tardía (45 DDE) la emisión comenzó a detectarse a partir de las 2 semanas post-inundación (55 DDE aprox.). A su vez, el inicio de la emisión en todos los tratamientos de invernáculo coincidió en el tiempo con el comienzo de la etapa reproductiva de la planta de arroz (60 DDE). A partir de entonces, el flujo de CH<sub>4</sub> aumentó progresivamente alcanzando los mayores valores en el tratamiento inundado a los 45 DDE con fertilización nitrogenada (Fig. 2). En este ensayo la interacción entre el factor tratamiento y la covariable tiempo fue significativa únicamente al comparar los datos de CH<sub>4</sub> de los cultivos inundados a los 45 DDE con los inundados a los 21 DDE con y sin fertilización nitrogenada ( $p=0.002$ ), evidenciando una diferencia significativa entre las curvas de emisión de estos tratamientos.

La emisión de CH<sub>4</sub> en el ensayo de campo comenzó a detectarse aproximadamente a las 2 semanas luego de inundado el cultivo en los tratamientos con Raigrás como cobertura invernal, y a las 5 semanas aproximadamente en los suelos sin vegetación previa al cultivo de arroz (Fig. 3). En los tratamientos sin vegetación, el inicio de la emisión coincidió aproximadamente con el inicio de la etapa reproductiva (55 DDE aprox.). En todos los tratamientos la emisión se mantuvo en ascenso durante el período inundado y disminuyó en respuesta al retiro de agua previo a la cosecha, hasta alcanzar tasas de emisión casi nulas. Las tasas de emisión de los cultivos sin vegetación

previa, y con Raigrás sin fertilización nitrogenada se mantuvieron en el mismo rango que las tasas máximas observadas en invernáculo. En cambio, en arrozales con Raigrás como cobertura invernal y fertilización nitrogenada las concentraciones máximas duplicaron los máximos de emisión detectados en los restantes tratamientos. Este patrón se ve evidenciado por el hallazgo de una interacción significativa ( $p=0.01$ ) entre las variables cobertura invernal y fertilización nitrogenada, al analizar su incidencia sobre la emisión de  $\text{CH}_4$ . En presencia de fertilización nitrogenada, la cobertura invernal Raigrás se asocia con un aumento significativo en la emisión de  $\text{CH}_4$ , mientras que en ausencia de fertilización nitrogenada esta cobertura no parece inducir diferencias en la emisión.



**Figura 2.** Emisión de  $\text{C-CH}_4$  y  $\text{N-N}_2\text{O}$  en ensayo de Invernáculo en función del tiempo (DDE). En invernáculo se aplicaron 3 tratamientos: Inundación a los 21 días de la emergencia con N (●); Inundación a los 21 días sin N (○); Inundación a los 45 días con N (■). Las flechas indican las aplicaciones de fertilización nitrogenada efectuada en los tratamientos correspondientes. Las líneas verticales indican el momento de inundación del cultivo a los 21 días (-----) y a los 45 días (---).



**Figura 3.** Emisión de C-CH<sub>4</sub> y N-N<sub>2</sub>O en ensayo de Campo en función del tiempo (DDE). En campo se aplicaron 4 tratamientos: Raigrás con N (●); Raigrás sin N (○); Sin vegetación con N (■); Sin vegetación sin N (□). Las flechas indican las aplicaciones de fertilización nitrogenada efectuada en los tratamientos correspondientes. Las líneas verticales indican el momento de inundación del cultivo a los 21 días (----); momento de retiro de agua del cultivo (—); momentos de baños del cultivo (---).

A través del análisis de los valores de emisión de N<sub>2</sub>O en invernáculo, se determinó que la interacción entre la variable tratamiento y la covariable tiempo fue significativa al contrastar las tres curvas obtenidas entre sí ( $p < 0.0001$ ). De esta manera, se detectó la existencia de una incidencia significativa del momento de inundación y el nivel de fertilización nitrogenada sobre la emisión de N<sub>2</sub>O a través del tiempo. En particular, en el tratamiento de invernáculo fertilizado e inundado a los 21 DDE se observó un aumento en la emisión de N<sub>2</sub>O en respuesta a la segunda aplicación de nitrógeno (urea), mientras que en el tratamiento no fertilizado la concentración de N<sub>2</sub>O se mantuvo relativamente constante en el tiempo y cercana a su concentración atmosférica habitual (Fig. 2). Además, el incremento en la emisión de N<sub>2</sub>O, el cual también se observó en el tratamiento inundado a los 45 DDE, fue mayor en los cultivos en los que la inundación coincidió en el tiempo con la fertilización ( $38.1 \text{ g N-N}_2\text{O ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). Los valores máximos de emisión se detectaron un día luego de la inundación en los tratamientos inundados a los 21 DDE y una semana luego de la fertilización, en los tratamientos inundados a los 45 DDE. En ambos casos, la emisión detectada disminuyó hasta valores casi nulos a partir de la semana de inundación aproximadamente.

En el ensayo de campo el patrón de emisión de N<sub>2</sub>O fue similar al observado en invernáculo, pero en este caso los máximos de emisión detectados sucedieron a la aplicación de baños al cultivo posteriores a la fertilización inicial (Fig. 3). Dos semanas luego de la inundación la emisión de N<sub>2</sub>O disminuyó drásticamente, al igual que lo ocurrido en el ensayo de invernáculo. A su vez, la tendencia observada en los cultivos con Raigrás como cobertura invernal fue la de una mayor emisión ante la aplicación de fertilización nitrogenada, en comparación con tratamientos con Raigrás sin fertilizar. Sin embargo, este patrón no fue observado en los bloques sin vegetación previa al cultivo, e incluso la emisión en los bloques sin fertilizar fue superior a la emisión en los bloques fertilizados. Igualmente, la variable cobertura invernal y fertilización nitrogenada no tuvieron incidencia significativa sobre la emisión de N<sub>2</sub>O ( $p=0.15$  y  $p=0.54$  respectivamente), por lo que los cuatro tratamientos ensayados no difirieron significativamente entre sí. A pesar de este resultado, cabe señalar que en el ensayo de campo la tendencia observada para el N<sub>2</sub>O luego del retiro de agua previo a la cosecha fue de un leve aumento en la tasa de emisión.

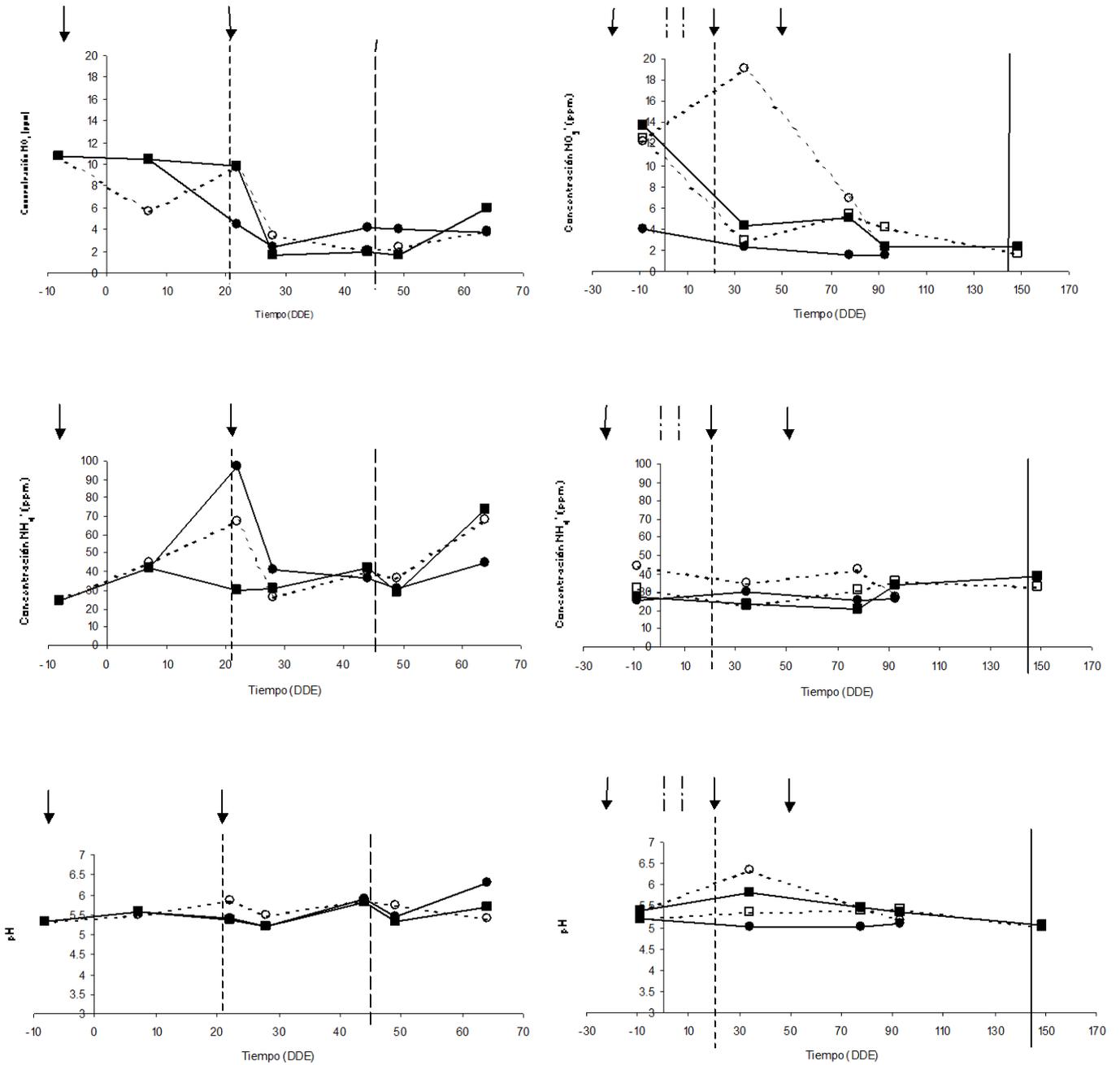
### 5.3 Componentes del suelo

En los ensayos de invernáculo y campo, la concentración de  $\text{NO}_3^-$  presentó variaciones en el transcurso del cultivo, así como ocurrió con la concentración de  $\text{NH}_4^+$  en el ensayo de invernáculo (Fig. 4). En cambio, la concentración de  $\text{NH}_4^+$  en campo y el pH del suelo en ambos ensayos mostraron un patrón relativamente constante en el tiempo. Según el análisis estadístico realizado, no existió correlación significativa ( $p > 0.05$ ) entre los niveles de emisión de  $\text{CH}_4$  y los valores de estos componentes del suelo para los tratamientos correspondientes, tanto en campo como en invernáculo. El mismo resultado se obtuvo al analizar la correlación entre el  $\text{N}_2\text{O}$  y la concentración de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , y el pH del suelo. En la Figura 4, no se presenta la desviación estándar del promedio de concentraciones para cada tiempo y tratamiento, habiéndose aplicado el mismo criterio utilizado en las Figuras 2 y 3.

A pesar de esto, en invernáculo fue posible visualizar a los 22 DDE una tendencia a una disminución en la concentración de  $\text{NO}_3^-$  de los suelos inundados a los 21 DDE y fertilizados, a la vez que se observó para este mismo tratamiento y fecha un aumento en la emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  superior al de los restantes tratamientos (Fig. 2 y 4a). A su vez, en todos los tratamientos ensayados a campo exceptuando los bloques con Raigrás sin fertilización nitrogenada se observó una tendencia a una disminución en la concentración de  $\text{NO}_3^-$  de forma posterior a la detección de los máximos niveles de  $\text{N}_2\text{O}$  para estas condiciones experimentales (Fig. 3 y 4b). Finalmente, en el ensayo de invernáculo se observó una tendencia a un aumento en la concentración de  $\text{NH}_4^+$  en respuesta a la segunda fertilización nitrogenada, excepto en el tratamiento inundado a los 45 DDE, en el cual a su vez comenzó a observarse luego de la fertilización con urea un aumento en la emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  por parte de estos suelos aún no inundados (Fig. 2 y 4a).

a) Invernáculo

b) Campo



**Figura 4.** Variación de la concentración de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  y nivel de pH en ensayo de Invernáculo (a) y Campo (b) en función del tiempo (DDE). En invernáculo se aplicaron 3 tratamientos: Inundación a los 21 días de la emergencia con N (●); Inundación a los 21 días sin N (○); Inundación a los 45 días con N (■). En campo se aplicaron 4 tratamientos: Raigrás con N (●); Raigrás sin N (○); Sin vegetación con N (■); Sin vegetación sin N (□). Las flechas indican las aplicaciones de fertilización nitrogenada efectuada en los tratamientos correspondientes. Las líneas verticales indican el momento de inundación del cultivo a los 21 días (.....) y a los 45 días (-----); momento de retiro de agua del cultivo (—); momentos de baños del cultivo (— · — · —).

## 6. DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos, el principal factor determinante de la emisión de CH<sub>4</sub> fue el contenido de agua en suelo y su influencia en el potencial redox del mismo. Probablemente la emisión de CH<sub>4</sub> haya sido detectada únicamente luego de asegurarse un ambiente lo suficientemente reductor en suelo como para permitir el crecimiento y activación del metabolismo de estas bacterias anaerobias estrictas, facilitado por el avance de la inundación del cultivo. Asimismo, este resultado es consistente con la disminución de la emisión de CH<sub>4</sub> en campo en respuesta al establecimiento de un suelo aeróbico originado por el retiro de la inundación del cultivo. Estos hechos han sido reportados en otros estudios, en los cuales ocurrió una disminución en el potencial redox del suelo a partir del momento de inundación del cultivo y un concomitante aumento en la emisión de CH<sub>4</sub>, además de una disminución en la emisión asociada a un aumento en el potencial redox ocasionado por el retiro de agua del cultivo (Hou *et al.*, 2000).

Sin embargo, el establecimiento de un suelo anaeróbico no pareció ser la única condición para el inicio de la emisión de CH<sub>4</sub> en invernáculo, ya que en los tratamientos inundados por un período más prolongado (a partir de 21 DDE) la emisión de CH<sub>4</sub> comenzó a detectarse aproximadamente al mismo tiempo que en los tratamientos que permanecieron menos tiempo en condiciones de anaerobiosis (45 DDE). Esta detección fue simultánea al comienzo de la etapa reproductiva de la planta, en la cual se han reportado altos niveles de producción de exudados orgánicos (Pusatjapong *et al.*, 2003). Por lo tanto, puede sugerirse que este aporte suplementario de materia orgánica mineralizable fue determinante una vez establecida la inundación para el inicio de la emisión y su posterior incremento sucesivo. A su vez, los máximos niveles de emisión de CH<sub>4</sub> reportados se han observado durante la floración de la planta de arroz y se han atribuido al aumento progresivo de la producción de exudados orgánicos, el cual alcanzaría su máximo en esta etapa (Holzapfel-Pschorn *et al.*, 1986b; Schütz *et al.*, 1989). En el ensayo de invernáculo, el máximo de emisión de CH<sub>4</sub> se presentó en el tratamiento inundado a los 45 DDE. Cantou *et al.* (2009) han reportado un atraso de aproximadamente una semana en el inicio de la floración de cultivos inundados de forma tardía (45 DDE) con respecto a los inundados con un mes de antelación. Por esta razón, probablemente las plantas inundadas a los 45 DDE en el último muestreo realizado (104 DDE) se encontraban en etapa de floración, mientras que los cultivos

inundados de forma más temprana ya habrían superado la etapa reproductiva y por lo tanto sus mayores tasas de emisión de CH<sub>4</sub>.

Además del régimen de inundación, un factor determinante de las tasas de emisión de CH<sub>4</sub> en campo fue la presencia de Raigrás como cobertura previa al cultivo de arroz, en presencia de fertilización nitrogenada. Posiblemente este hecho se deba al aporte extra de materia orgánica al suelo por parte de esta cobertura en comparación con los suelos sin vegetación previa al cultivo, el cual junto con el aporte complementario de nitrógeno activaría la cadena trófica de la degradación anaerobia, redundando en una mayor producción de CH<sub>4</sub>. El agregado de paja de arroz a los suelos cultivados ha sido frecuentemente asociado a un aumento en la tasa de emisión de CH<sub>4</sub> (Johnson-Beebout *et al.*, 2009), el cual podría asemejarse a los restos de Raigrás que perduran en el suelo luego de la aplicación de herbicidas previa a la siembra de arroz. Tanto en invernáculo como en campo exceptuando la condición con Raigrás y fertilización nitrogenada, el agregado de nitrógeno al suelo no fue un determinante de la emisión de CH<sub>4</sub>. Posiblemente, el nitrógeno disponible en suelo para las bacterias metanogénicas comenzó a ser limitante únicamente ante mayores concentraciones de materia orgánica en suelo tales como las encontradas probablemente en presencia de Raigrás, y determinó bajo estas condiciones la capacidad de producir y emitir mayores niveles de CH<sub>4</sub>. Por otro lado, en los tratamientos sin vegetación previa al cultivo el inicio de la emisión de CH<sub>4</sub> fue posterior al observado en las condiciones experimentales con Raigrás y posiblemente haya coincidido con la etapa reproductiva de la planta. Este comportamiento podría justificarse por la existencia de una dependencia más directa entre inicio de la metanogénesis en los tratamientos sin un aporte externo de materia orgánica, y la liberación de exudados por las raíces de la planta, similar a la observada en invernáculo. Posteriormente, los cultivos sin Raigrás con fertilización nitrogenada y los cultivos con Raigrás sin agregado de nitrógeno alcanzaron niveles máximos de emisión similares. En un experimento de campo realizado por Neue *et al.* (1996), tratamientos con agregado externo de materia orgánica sin fertilizar presentaron en las últimas etapas de crecimiento del cultivo patrones de emisión de CH<sub>4</sub> similares a los observados en arrozales tratados con urea. Según los autores, esta situación se debió a una creciente influencia de la planta sobre las emisiones en el transcurso del tiempo a través de su aporte de carbono orgánico, lo cual explicaría el patrón observado en el ensayo de campo para estas condiciones experimentales.

En general, la emisión de  $N_2O$  se caracterizó por una dependencia aparente con el contenido de agua en suelo y con la aplicación de fertilización nitrogenada en invernáculo. El aumento observado en la tasa de emisión en respuesta a la aplicación de fertilización nitrogenada, sustrato disponible para las reacciones de nitrificación y desnitrificación bacterianas, es consistente con lo reportado en otros estudios (Cai *et al.*, 1997; Bronson *et al.*, 1997a). En particular, Bronson *et al.* (1997a) observaron flujos de  $N_2O$  apenas detectables durante el ciclo de cultivo, los cuales aumentaron luego de las aplicaciones de fertilización nitrogenada hasta valores máximos muy cercanos a los detectados en este estudio luego de la fertilización ( $35 \text{ g N-N}_2\text{O ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). Sin embargo, esta respuesta no se observó luego de la primera fertilización en invernáculo, ni luego de la segunda fertilización en campo. En invernáculo, es probable que en el caso de haber ocurrido un aumento de la emisión entonces, éste no haya sido detectado dado que en los dos muestreos iniciales el número de réplicas fue inferior al existente en los restantes muestreos. En campo el muestreo se realizó dos semanas luego de la segunda fertilización e inundación, por lo que en el caso de haber existido un comportamiento similar al observado en los cultivos en invernáculo sometidos al mismo tratamiento, los eventuales cambios en la emisión de  $N_2O$  ocasionados en este lapso no hubiesen podido ser detectados. En el tratamiento sin vegetación previa al cultivo en campo la respuesta a la fertilización nitrogenada no fue consistente con las observaciones realizadas en los restantes tratamientos, lo cual podría explicarse por la alta variabilidad espacial frecuentemente observada en ensayos de campo (IAEA, 1992) y la relativa escasa cantidad de réplicas que fue posible utilizar en este estudio. Es probable que este hecho haya sido además la causa de la ausencia de diferencias significativas entre las emisiones de  $N_2O$  para los tratamientos ensayados en campo.

El aumento observado en la emisión de  $N_2O$  frente a la fertilización e inundación en invernáculo y frente a la fertilización seguida por baños en campo, podría deberse a que al aumentar ligeramente el contenido de humedad en suelo el potencial redox del mismo puede tornarse levemente reductor y promover así las reacciones bacterianas de desnitrificación. En un ensayo de campo de dos años de duración Bronson *et al.* (1997b) observaron resultados muy similares a los mencionados, en respuesta a la inundación del cultivo de arroz y la ocurrencia de lluvias mayores a 20 mm en el período de barbecho. Estos picos de emisión de  $N_2O$  fueron atribuidos a una rápida desnitrificación del  $NO_3^-$  acumulado en el suelo, lo cual podría estar ocurriendo en los experimentos realizados en este estudio. En invernáculo, un día luego de la

inundación temprana (22 DDE) se observó una tendencia a una disminución en la concentración del  $\text{NO}_3^-$  en suelo, únicamente en los cultivos inundados previamente y con fertilización nitrogenada. De esta manera, la hipótesis que sugiere a la desnitrificación como principal contribuyente del aumento en la emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  observado en este tratamiento, podría ser respaldada. En campo, esta hipótesis puede ser apoyada por la observación de una disminución en la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en suelo luego de un aumento en la emisión de  $\text{N}_2\text{O}$ , en los tratamientos que presentaron mayores niveles de emisión. A su vez, mediante ensayos de inhibición con acetileno se ha observado que la mayor producción de  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{N}_2$  por desnitrificación puede ocurrir un día luego de la inundación del cultivo, así como sucedió probablemente en el ensayo de invernáculo (Bronson et al., 1997b). El  $\text{NO}_3^-$  disponible para las bacterias desnitrificantes podría proceder de la nitrificación del amonio proveniente de las aplicaciones de fertilizante o de la mineralización de la materia orgánica en suelo, desarrolladas de forma previa a la inundación y realización de baños.

Por otro lado, cuando la aplicación de fertilizante en invernáculo no fue acompañada por la inundación del cultivo, el aumento de emisión fue menos notorio y probablemente sea explicado por reacciones bacterianas de nitrificación esencialmente, dada la condición aeróbica que predomina en estos suelos durante ese período. Este comportamiento es consistente con otros estudios en los cuales la mayoría de los aumentos en la emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  se asocian con aumentos en el potencial redox del suelo, y son atribuidos a nitrificación principalmente (Hou et al., 2000; Towprayoon et al., 2005). En el tratamiento en el cual se fertilizó e inundó el cultivo simultáneamente, ocurrió un incremento en la concentración de  $\text{NH}_4^+$  en suelo como consecuencia del agregado de urea. Sin embargo, en los tratamientos no inundados al fertilizar este aumento no se observó e incluso la concentración disminuyó levemente, posiblemente por la ocurrencia de un consumo del  $\text{NH}_4^+$  por parte de las bacterias nitrificantes (Domínguez et al., 2007). Asimismo, la tendencia a un aumento en la tasa de emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  frente al retiro de agua del cultivo en campo reportado también por Towprayoon et al. (2005), podría ser explicada por una activación de la nitrificación en estos suelos ocasionada por un aumento en el potencial redox.

Es probable que en todos los tratamientos ensayados en invernáculo y campo, luego de transcurrida aproximadamente una semana de inundación el suelo se haya tornado altamente reductor induciendo a que el  $\text{N}_2\text{O}$  siga su proceso de reducción hasta

N<sub>2</sub>, lo que explicaría la disminución observada en las tasas de emisión a partir de entonces (Hou *et al.*, 2000).

A pesar de las tendencias observadas, no existió una correlación significativa entre los componentes del suelo y las emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O. Probablemente este hecho se debió a la existencia de otros factores tales como el régimen de inundación y el consumo de nutrientes por parte de las plantas, los cuales podrían estar incidiendo simultáneamente sobre la producción y emisión de estos gases y evitar así que una correlación simple fuese capaz de explicar la complejidad de estos procesos (Lark *et al.*, 2004). A su vez, la mayor variabilidad en los componentes de suelo se observó en general en las primeras etapas del cultivo, en las cuales la ausencia de un ambiente anaeróbico inhibe la emisión de CH<sub>4</sub> y su consecuente vinculación directa con estos componentes. Por otro lado, dado que el pH no presentó variaciones en el tiempo y se mantuvo dentro de los rangos óptimos para el desarrollo de la flora metanogénica, nitrificante y desnitrificante (Robertson & Groffman, 2007; Segers, 1998), las fluctuaciones en las emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O no se atribuyeron a esta variable.

## **6.1 Conclusiones y perspectivas**

En este estudio se determinaron valores absolutos de emisión de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O por suelos cultivados con arroz bajo las prácticas agrícolas habitualmente aplicadas en nuestro país, los cuales fueron consistentes en su mayoría con resultados obtenidos en estudios equivalentes de otras regiones. Los resultados obtenidos señalan que el manejo de agua determina en gran medida la dinámica de las emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O. Además, la fertilización nitrogenada y la presencia de la cobertura invernal Raigrás influyó positivamente en la emisión de N<sub>2</sub>O y CH<sub>4</sub>. Por esta razón es de gran importancia que estos factores sean contemplados en su conjunto a la hora de calcular factores de emisión para el cultivo de arroz en el país, los cuales diferirán según el manejo de cultivo aplicado (IPCC, 2006). Estos factores de emisión son necesarios para una construcción más precisa y realista de estimaciones de emisión de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O en el país, para su inclusión en inventarios nacionales de gases con efecto invernadero. Igualmente, para mejorar estas estimaciones sería recomendable en próximos estudios aumentar el número de réplicas por tratamiento, e intentar minimizar el efecto de la variabilidad espacial que existe naturalmente en ensayos de campo y la potencial variabilidad entre unidades experimentales en invernáculo. Por otro lado, es importante incluir en el

cronograma de muestreo los eventos posteriores a altos valores de emisión, de manera de poder detectar el momento en el cual la emisión disminuye, para así evitar una posible sobreestimación de la emisión. Además, sería conveniente aumentar especialmente la frecuencia de muestreo en la etapa de floración de la planta dada su asociación con picos de emisión de  $\text{CH}_4$ , y al mismo tiempo contemplar las variaciones en la longitud del ciclo de cultivo que pueden ocasionarse por el establecimiento de la inundación del cultivo a distintos tiempos. También, se sugiere en futuros estudios incluir un muestreo inmediatamente posterior al establecimiento de la inundación en ensayos de campo, con la finalidad de observar si se presenta a esta escala el mismo patrón de emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  observado en invernáculo ante este evento. Considerando los resultados obtenidos sería interesante en futuros estudios realizar un seguimiento en el tiempo del contenido de materia orgánica en el suelo, para confirmar su incidencia significativa sobre la producción y emisión de  $\text{CH}_4$ . A su vez, contar con resultados cuantitativos del contenido de agua en suelo y particularmente del potencial redox del mismo sería de gran utilidad para comprender mejor los principales procesos microbianos que se desarrollan en el transcurso del cultivo, y analizar con más precisión las causas de las fluctuaciones en las emisiones de estos gases de efecto invernadero.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACA. Asociación de Cultivadores de Arroz. Uruguay. 2008. Dirección: [http://www.aca.com.uy/proyecciones\\_expotaciones.html](http://www.aca.com.uy/proyecciones_expotaciones.html)
- Bronson, K.F., Neue, H.U., Abao Jr., E.B. & Singh, U. 1997a. Automated Chamber Measurements of Methane and Nitrous oxide Flux in a Flooded Rice Soil: I. Residue, Nitrogen, and Water Management. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61:981-987.
- Bronson, K.F., Singh, U., Neue, H.U. & Abao Jr., E.B. 1997b. Automated Chamber Measurements of Methane and Nitrous Oxide Flux in a Flooded Rice Soil: II. Fallow Period Emissions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61:988-993
- Cai, Z., Xing, G., Yan, X., Xu, H., Tsuruta, H., Yagi, K. & Minami, K. 1997. Methane and nitrous oxide emissions from rice paddy fields as affected by nitrogen fertilisers and water management. *Plant and Soil.* 196:7-14.
- Cantou, G., Roel, A., Castiglini, J.I. & Ugarte, J.M. 2009. Efecto del momento de la inundación en INIA Olimar y El Paso 144. En: *Arroz: Resultados Experimentales 2008-2009*. Actividades de Difusión 571. INIA Treinta y Tres. Estación Experimental del Este. pp. 16-29.
- Chan, A.S.K. & Parkin, T.B. 2001. Effect of land use on methane flux from soil. *J. Environ. Qual.* 30:786-797.
- Conrad, R. 1996. Soil Microorganisms as Controllers of Atmospheric Trace Gases (H<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, OCS, N<sub>2</sub>O, and NO). *Microbiol. Rev.* 60(4):609-640.
- Crutzen, P.J. 1970. The influence of nitrogen oxides on the atmospheric ozone content. *Q. J. R. Meteorol. Soc.* 96:320-325.
- Davis, C.S. 2002. *Statistical Methods for the Analysis of Repeated Measurement*. Springer-Verlag, New York.
- Domínguez, V., Irisarri, P. & Gonnet, S. 2007. Emisiones de óxido nitroso por suelos cultivados con arroz: efecto de un inhibidor de la nitrificación. *Agrociencia.* 11:50-57.
- Ferguson, S.J., Richardson, D.J. & van Spanning, R.J.M. 2007. Biochemistry and Molecular Biology of Nitrification. En: *Biology of the Nitrogen Cycle*. Eds. Bothe, H., Ferguson, S. & Newton, W.E. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands.

- Ferrando, L. & Tarlera, S. 2009. Activity and diversity of methanotrophs in the soil–water interface and rhizospheric soil from a flooded temperate rice field. *JAM*. 106:306-316.
- Gamarra, G. 1996. *Arroz: manual de producción*. Ed. Hemisferio Sur. Montevideo.
- García, I.L. 1990. Taxonomy and ecology of methanogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 87:297-308.
- Gilbert, B. & Frenzel, P. 1995. Methanotrophic bacteria in the rhizosphere of rice microsoms and their effect on pore-water methane concentration and methane emission. *Biol. Fertil. Soils*. 20:93-100.
- Holzapel-Pschorn, A., Conrad, R. & Seiler, W. 1986a. Effects of vegetation on the emission of methane from submerged paddy soil. *Plant and Soil*. 92:223-233.
- Holzapel-Pschorn, A., Conrad, R. & Seiler, W. 1986b. Production, oxidation and emission of methane in rice paddies. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31:149-158.
- Hou, A.X., Chen, G.X., Wang, Z.P., Van Cleemput, O. & Patrick Jr., W.H. 2000. Methane and nitrous oxide emissions from a rice field in relation to soils redox and microbiological processes. 2000. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64:2180-2186.
- Hutchinson, G.L. & Mosier, A.R. 1981. Improved soil cover method for field measurement of nitrous oxide fluxes. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45:311-316.
- IAEA. 1992. Methane and nitrous oxide flux measurements from soil and plant systems. En: *Manual of measurement of methane and nitrous oxide emissions from agriculture*. pp. 45-89.
- IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change. 2001. *Climate Change 2001: The Scientific Basis*. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Houghton, J.T., Y. Ding, D.J. Griggs, M. Noguer, P.J. van der Linden, X. Dai, K. Maskell, and C.A. Johnson (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York.
- IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change. 2006. *2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories*. National Greenhouse Gas Inventories Programme. [Eggleston, H.S., Buendia, L., Miwa, K., Ngara, T. & Tanabe, K. (eds)]. IGES, Japan.
- IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change. 2007. *Cambio climático 2007: Informe de síntesis*. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Cuarto Informe de evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el

- Cambio Climático [Equipo de redacción principal: Pachauri, R.K. y Reisinger, A. (directores de la publicación)]. IPCC, Ginebra, Suiza.
- Jacobson, M.Z. 2005. *Atmospheric pollution: History, science and regulation*. Cambridge University Press. Cambridge, New York.
- Johnson-Beebout, S.E., Angeles, O.R., Alberto, MA C.R., & Buresh, R.J. 2009. Simultaneous minimization of nitrous oxide and methane emission from rice paddy soils is improbable due to redox potential changes with depth in a greenhouse experiment without plants. *Geoderma* 149:45-53.
- Kerdchoechuen, O. 2005. Methane emission in four rice varieties as related to sugars and organic acids of roots and root exudates and biomass yield. *Agr. Ecosyst. Environ.* 108(2):155-163.
- Lark, R.M., Milne, A.E., Addiscott, T.M., Goulding, K.W.T., Webster, C.P. & O'Flaherty, S. 2004. Scale and location dependent correlation of nitrous oxide emissions with soil properties: an analysis using wavelets. *Eu. J. Soil Sci.* 55(3):611-627.
- Lindau, C.W., Bollich, P.K., Delaune, R.D., Patrick Jr., W.H. & Law, V.J. 1991. Effect of urea fertilizer and environmental factors on CH<sub>4</sub> emissions from a Louisiana, USA rice field. *Plant and soil.* 136:195-203.
- Macalady, J.L., McMillan, A.M.S., Dickens, A.F., Tyler, S.C. & Scow, K.M. 2002. Population dynamics of type I and II methanotrophic bacteria in rice soils. *Environ. Microbiol.* 4:148-157.
- Madsen, E.L. 2008. *Environmental Microbiology: From Genomes to Biogeochemistry*. Wiley Blackwell. Malden MA.
- Majumdar, D. 2003. Methane and nitrous oxide emission from irrigated rice fields: Proposed mitigation strategies. *Current science.* 84:1317-1326.
- Masscheleyn, P.H., Delaune, R.D. & Patrick, W.H. 1993. Methane and nitrous oxide emission from laboratory measurements of rice soil suspension. Effect of soil oxidation - reduction status. *Chemosphere.* 26:251-260.
- Mei, L., Yang, L., Wang, D., Yin, B., Hu, J. & Yin, S. 2004. Nitrous oxide production and consumption in serially diluted soil suspensions as related to in situ N<sub>2</sub>O emission in submerged soils. *Soil Biol. Biochem.* 36:1057-1066.
- Mosier, A.R. 1998. Soil processes and global change. *Biol. Fertil. Soils.* 27:221-229.

- Müller, V., Blaut, M. & Gottschalk, G. 1993. Bioenergetics of Methanogenesis. En: *Methanogenesis: ecology, physiology, biochemistry & genetics*. Ed. J.G. Ferry. Chapman & Hall. New York-London. pp. 360-406.
- Neue, H.U., Wassmann, R., Lantin, R.S., Alberto, MA C.R., Aduna, J.B. & Javellana, A.M. 1996. Factors affecting methane emission from rice fields. *Atmospheric Environment*. 30:1751-1754.
- Nicolaisen, M.H., Risgaard-Petersen, N., Revsbech, N.P., Reichardt, W. & Ramsing, N.B. 2004. Nitrification-denitrification dynamics and community structure of ammonia oxidizing bacteria in a high yield irrigated Philippine rice field. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49:359-369.
- Nouchi, I, Mariko, S. & Aoki, K. 1990. Mechanism of methane transport from the rhizosphere to atmosphere through rice plants. *Plant Physiol.* 94:59-66.
- Oremland, R.S. 1988. Biogeochemistry of Methanogenic Bacteria. En: *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Ed. J.B.A. Zehnder. John Wiley and Sons, Inc. New York. pp. 641-705
- Patrick Jr., W.H. 1981. The role of inorganic redox systems in controlling reduction in paddy soils. En: *Proceedings of Symposium on Paddy Soil*. Institute of Soil Science, Academia Sinica. Beijing and Springer Verlag, Berlin. pp. 107-117.
- Pinheiro, J.C & Bates, D.M. 2000. *Mixed-Effects Models in S and S-Plus*. Springer-Verlag, New York.
- Pusatjapong, W., Kerdchoechuen, O. & Towprayoon, S. 2003. Glucose, fructose, and sucrose accumulation in root and root exudate of rice cv. Supanburi 1. *KMUTT Res. Develop. J.* 26(3):339-350.
- R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Rhine, E.D., Sims, G.K., Mulvaney, R.L. & Pratt, E.J. 1998. Improving the Berthelot reaction for determining ammonium in soil extracts and water. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62(2):473-480.
- Robertson, G.P. & Groffman, P.M. 2007. Nitrogen transformations. En: *Soil Microbiology, Biochemistry, and Ecology*. Ed. E. A. Paul. Springer, New York, New York, USA. pp. 341-364.
- Rochette, P. & Eriksen-Hamel, N.S. 2008. Chamber Measurements of Soil Nitrous Oxide Flux: Are Absolute Values Reliable? *Soil Sci. Soc. Am. J.* 72:331-342.

- Sass, R.L., Fisher, F.M., Harcombe, P.A. & Turner, F.T. 1991. Mitigation of methane emission from rice fields: Possible adverse effects of incorporated rice straw. *Global Biogeochem. Cycl.* 5:275-287.
- Schütz, H., Holzappel-Pschorn, A., Conrad, R., Rennenberg, H. & Seiler, W. 1989. A 3-year continuous record on the influence of daytime, season and fertilizer treatment on methane emission rates from an Italian rice paddy field. *J. Geophys. Res.* 94:16405-16416.
- Segers, R. 1998. Methane production and methane consumption: a review of processes underlying wetland methane fluxes. *Biogeochemistry.* 41:23-51.
- Smith, K.A., Thomson, P.E., Clayton, H., McTaggart I.P. & Conen, F. 1998. Effects of temperature, water content and nitrogen fertilization on emissions of nitrous oxide by soils. *Atmos. Environ.* 32:3301-3309.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. 1979. *Biometría: Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica.* Blume. Madrid.
- Tarlera, S., Gonnet, S., Irisarri, P., Menes, J., Fernández, A., Paolino, G., Travers, D. & Deambrosi, E. 2006. Nitrification and denitrification associated with N<sub>2</sub>O production in a temperate N-fertilized irrigated Uruguayan ricefield. En: *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology: Exploiting Microbes and their Interactions.* Ed. A. Méndez-Vilas. Wiley-VHC, eds. Weinheim. pp. 416-420.
- Thornton, F.C. & Valente, R.J. 1996. Soil emissions of nitric oxide and nitrous oxide from no-till corn. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60:1127-1133
- Towprayoon, S., Smakgahn, K. & Poonkaew, S. 2005. Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from drained irrigated rice fields. *Chemosphere.* 59:1547-1556.
- Van Cleemput, O., Boeckx, P., Lindgren, P. & Tonderski, K. 2007. Denitrification in wetland. En: *Biology of the Nitrogen Cycle.* Eds. Bothe, H., Ferguson, S. & Newton, W.E. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. pp. 359-368.
- Van Spanning, R.J.M., Richardson, D.J. & Ferguson, S.J. 2007. Introduction to the Biochemistry and Molecular Biology of Denitrification. En: *Biology of the Nitrogen Cycle.* Eds. Bothe, H., Ferguson, S. & Newton, W.E. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. pp. 3-20.
- Venables, W.N. & Ripley, B.D. 2002. *Modern Applied Statistics with S.* 4a ed. Springer-Verlag, New York.

- Waschütza, S., Hofmann, N., Niemann, E.G. & Fendrik, I. 1992. Investigations on root exudates of Korean rice. *Symbiosis*. 13:181-189.
- Watanabe, T., Chairoj, P., Tsuruta, H., Masarngsan, W., Wongwiwatchai, C., Wonprasaid, S., Cholitkul, W. & Minami, K. 2000. Nitrous oxide emissions from fertilized upland fields in Thailand. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 58:55–65.
- Wood, E.D., Armstrong, F.A.J. & Richards, F.A. 1967. Determination of nitrate in seawater by cadmium cooper reduction to nitrite. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 47:23-31.
- Zumft, W.G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(4):533-616.

## ANEXO

Valores de desviación estándar correspondientes a los promedios de los flujos de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O obtenidos para las distintas réplicas por tratamiento.

<b>Tratamiento (CAMPO)</b>	<b>Flujo N<sub>2</sub>O (g/ha.d)</b>	<b>Tiempo (DDE)</b>	<b>Desviación Estándar (g/ha.d)</b>
<b>Raigrás con N</b>	9.7	-9	4.8
	37.7	12	27.7
	9.9	34	13.2
	0.0	78	0.0
	0.0	93	0.0
	21.2	163	17.8
<b>Raigrás sin N</b>	19.3	-9	2.3
	11.9	12	1.2
	-4.4	34	2.6
	0.0	78	0.0
	0.0	93	0.0
	10.2	163	5.4
<b>Sin vegetación con N</b>	1.4	-9	2.0
	49.1	12	61.5
	0.1	34	2.5
	0.0	78	0.0
	0.0	93	0.0
	1.7	149	3.6
<b>Sin vegetación sin N</b>	13.9	-9	12.5
	89.5	12	15.4
	1.2	34	3.7
	0.0	78	0.0
	0.0	93	0.0
	3.6	149	5.9

<b>Tratamiento (CAMPO)</b>	<b>Flujo CH<sub>4</sub> (g/ha.d)</b>	<b>Tiempo (DDE)</b>	<b>Desviación Estándar (g/ha.d)</b>
<b>Raigrás con N</b>	0.0	-9	0.0
	0.0	12	0.0
	866.3	34	143.7
	5119.4	78	517.4
	6572.8	93	1909.7
	171.0	163	322.5
<b>Raigrás sin N</b>	0.0	-9	0.0
	0.0	12	0.0
	1090.1	34	1001.0
	2231.7	78	717.3
	3044.9	93	916.4
	231.4	163	116.8
<b>Sin vegetación con N</b>	0.0	-9	0.0
	0.0	12	0.0

	-129.1	34	454.1
	1606.0	78	453.3
	2509.9	93	732.5
	313.3	149	233.8
<b>Sin vegetación sin N</b>	0.0	-9	0.0
	0.0	12	0.0
	-278.1	34	0.0
	2827.8	78	1424.9
	2485.5	93	730.9
	503.9	149	726.2

<b>Tratamiento (INVERNÁCULO)</b>	<b>Flujo N<sub>2</sub>O (g/ha.d)</b>	<b>Tiempo (DDE)</b>	<b>Desviación Estándar (g/ha.d)</b>
<b>Inund. 21 DDE con N</b>	4.7	-9	7.1
	7.1	0	7.0
	10.1	7	8.9
	38.1	22	5.0
	2.3	28	8.2
	-0.9	49	10.1
	-1.6	64	3.7
	0.0	104	0.0
<b>Inund. 21 DDE sin N</b>	0.0	-9	5.7
	4.6	0	2.8
	2.8	7	9.3
	2.1	22	5.2
	-1.3	28	3.6
	-1.1	49	0.3
	-0.2	64	1.2
	0.0	104	
<b>Inund. 45 DDE con N</b>	4.7	-9	7.1
	7.1	0	7.0
	10.1	7	8.9
	13.9	22	9.6
	21.6	28	7.8
	3.6	49	9.1
	0.7	64	4.0
	0.0	104	0.0

<b>Tratamiento (INVERNÁCULO)</b>	<b>Flujo CH<sub>4</sub> (g/ha.d)</b>	<b>Tiempo (DDE)</b>	<b>Desviación Estándar (g/ha.d)</b>
<b>Inund. 21 DDE con N</b>	0.0	-9	0.0
	0.0	0	0.0
	0.0	7	0.0
	0.0	22	0.0
	0.0	28	0.0
	0.0	49	0.0
	1091.4	64	816.7
	2568.7	104	1646.1
<b>Inund. 21 DDE sin N</b>	0.0	-9	0.0
	0.0	0	0.0

	0.0	7	0.0
	0.0	22	0.0
	0.0	28	0.0
	0.0	49	0.0
	2378.6	64	840.6
	3232.4	104	606.6
<b>Inund. 45 DDE con N</b>	0.0	-9	0.0
	0.0	0	0.0
	0.0	7	0.0
	0.0	22	0.0
	0.0	28	0.0
	0.0	49	0.0
	585.9	64	165.0
	4091.4	104	1337.0