

Licenciatura en Ciencias Biológicas

# **Efecto del riego con efluentes de tambo sobre las emisiones de óxido nitroso y la nitrificación**

ALVARO MANUEL HERNÁNDEZ OLVEYRA

Tutora: Pilar Irisarri

2020

# Efecto del riego con efluentes de tambo sobre las emisiones de óxido nitroso y la nitrificación

## Introducción

### El ciclo del nitrógeno: emisión de óxido nitroso ( $N_2O$ )

Los procesos microbianos como la mineralización, nitrificación y desnitrificación regulan la dinámica de nitrógeno en el suelo. La nitrificación ocurre a través de la oxidación de amonio ( $NH_4^+$ ) a nitrito ( $NO_2^-$ ) y de éste a nitrato ( $NO_3^-$ ), una forma móvil de nitrógeno, que constituye la principal vía bajo la cual se pierde N por lixiviación y desnitrificación. La oxidación del  $NH_4^+$  a  $NO_2^-$  está catalizada por la enzima amonio monooxigenasa (Amo) y de éste a  $NO_3^-$  por la enzima nitrito oxidoreductasa (Frioni2006). El primer paso de este proceso ocurre en el suelo por la actividad de dos grupos de microorganismos. Uno de ellos son las bacterias oxidadoras de amonio (AOB) siendo *Nitrosospira* y *Nitrosomonas* los géneros más conocidos y predominantes en ambientes ricos en  $NH_4^+$ . Los miembros de estos grupos han sido cultivados y tienen entre 2 y 3 copias del gen *amoA* que codifica una subunidad de la Amo. El otro grupo de microorganismos corresponde a las arqueas oxidadoras de amonio (AOA) que pertenecen a la porción no termófila del filo Crenarchaeota. Se conoce menos de su estructura genómica, pero se cree que tienen entre 1 y 3 copias de *amoA* y tienden a ser más abundantes que AOB en suelos con  $pH < 5.5$ . Estas arqueas tienen estilo de vida mixótrofo y hay algunas evidencias que indican que serían menos activas que las AOB, al menos en cuanto a la nitrificación (Adair y Schwartz 2008).

En la figura 1 se muestran algunas de las etapas del ciclo del nitrógeno, así como el aporte de estos compuestos por parte de la fertilización con urea, o a través de los desechos animales y vegetales.

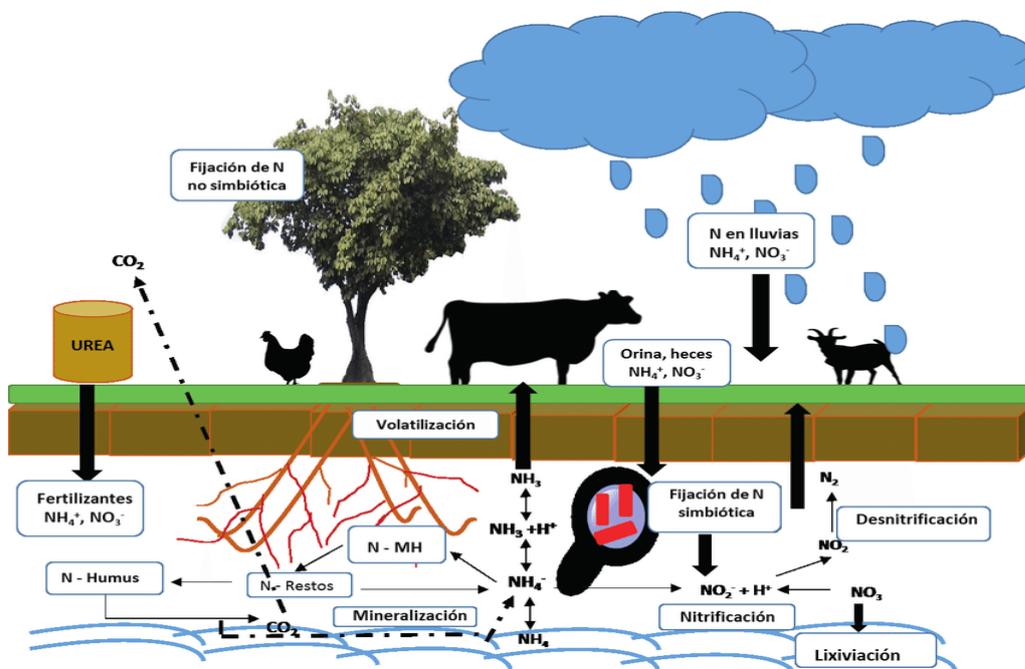


Figura 1. Esquema del ciclo del Nitrógeno en un agroecosistema (Corrales et al., 2017).

Se ha observado que con el agregado de efluentes al suelo la abundancia de AOB es mayor que la de arqueas respecto a la fertilización sintética, y que la diversidad de la comunidad varía con los diferentes tratamientos de N adicionados al suelo (Habteselassie et al., 2013).

La desnitrificación es un proceso que puede involucrar hasta cuatro reacciones:  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ . Hay al menos 25 géneros bacterianos que poseen genes involucrados en estas reacciones. La nitritoreductasa, codificada según el microorganismo por los genes *nirS* o *nirK*, es el paso que define que la reducción del  $\text{NO}_3^-$  está asociada a pérdida de N, ya que rinde un producto gaseoso. Tradicionalmente estos genes han sido usados como genes marcadores de la desnitrificación (Laurent et al., 2010).

Los oxianiones  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  y óxidos gaseosos del N, NO y  $\text{N}_2\text{O}$ , sirven como aceptores finales de  $e^-$  y la desnitrificación es llevada a cabo por microorganismos en su mayoría anaerobios facultativos.

La oxidación de  $\text{NH}_4^+$  y la desnitrificación en el suelo generan emisiones de óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), un potente gas de efecto invernadero. La oxidación de  $\text{NH}_4^+$  es un proceso aeróbico, pero, cuando la provisión de oxígeno es limitada, se genera  $\text{N}_2\text{O}$  como subproducto, mientras que la desnitrificación se activa una vez consumido el  $\text{O}_2$  y se han generado microambientes anóxicos en el perfil del suelo (Frioni 2006).

### **Características y riesgos ambientales en el uso de efluentes de tambo**

La aplicación al suelo de los residuos de tambo se recomienda para mejorar las propiedades de éste y aumentar la producción de forraje, al mismo tiempo que se evita el vertido a cursos de agua con el consiguiente daño ambiental. La intensificación de los sistemas de producción lechera genera grandes volúmenes de residuos orgánicos que dificultan su manejo y conllevan riesgo sanitario y ambiental (Taverna et al., 2007).

En un sistema pastoril cada vaca en ordeño genera entre 14 y 24 litros de efluentes por día, sin considerar el agua utilizada por la placa de refrescado y el agua de lluvia, y contienen aproximadamente 350 gramos de materia seca (MS). Estos efluentes representan para un tambo de 200 vacas, entre 1000 a 1700  $\text{m}^3$  al año. (Taverna et al. 2007).

La composición del efluente es elevada en compuestos inorgánicos con K, N o P, materia orgánica y microorganismos, que pueden afectar las propiedades de cuerpo receptor (laguna, suelos, etc) al recibir la descarga. Debido a estas características, los compuestos que forman parte del efluente, con un adecuado manejo se transforman en subproductos que se reciclan aportando materia orgánica y nutrientes al suelo. La restitución al suelo de los nutrientes y los materiales no digeridos de las paredes celulares de las plantas (celulosa, lignina), favorecen la conservación y/o restitución de la fertilidad del suelo. De todas formas. Es necesario regular la aplicación o carga máxima admitida en el suelo, de manera de no saturar su capacidad de intercambio catiónico (Casanova y del Pino, 2008).

El procesamiento de los efluentes a través de lagunas de decantación anaerobia y facultativa, es una alternativa muy recomendable respecto a la práctica que se realizaba de desecho directo de los efluentes de tambo en cursos de agua. La utilización de estos efluentes tratados como fuente de N es importante para el país, dado que se producen en gran cantidad. Así, se podría contribuir a la fertilización y disminuir el uso de fuentes nitrogenadas de alto costo para el productor, como lo es la fertilización con urea.

La microbiota del suelo responde diferente según el tipo de efluente y las cantidades de aplicación en una pastura (Shi et al., 2018). Charlón (2007) reporta que los efluentes líquidos de tambo (ELT) resultan del lavado de las áreas de ordeño y se componen de heces, microorganismos fecales, orina, barro, restos de leche, residuos de alimentos, aguas pluviales y de lavado, detergentes y otros productos químicos utilizados en un sistema de tratamiento. Así se explica la significativa cantidad de nutrientes esenciales que potencialmente serían una excelente fuente nutricional para los cultivos cuando se los incorpora al suelo (Schröder et al. 2007; Imhoff et al. 2011).

El riego de la aplicación de efluentes de tambo es que se promueva la mineralización por microorganismos, lo que ha sido puesto en evidencia por un aumento en la respiración, la biomasa microbiana y actividades enzimáticas de suelo (Casanova y Del Pino, 2007).

Las características fisicoquímicas y microbiológicas de cada efluente dependerán del manejo del tambo y del tratamiento previo a su vertido. En muchos trabajos se destaca el efecto positivo del riego con efluentes sobre las propiedades químicas del suelo debido al reciclado de nutrientes, así como a propiedades físicas derivadas del aumento del contenido de materia orgánica, porosidad, e infiltración del agua en el suelo (Feng et al. 2005, Khan et al., 2007).

El 69% de los establecimientos lecheros en Uruguay realizan un manejo de los efluentes en piletas (Fig. 2) y el 80 % de estas descargan al suelo por desagüe natural en el terreno. Los sistemas de lagunas con efluentes de tambos permiten una reducción importante de carga orgánica, pero no permiten lograr, en lo que se refiere a nitrógeno, fósforo y patógenos, los límites requeridos por la normativa para su vertido a cauce (MGAP, 2008).



**Figura 2.** Colecta de efluentes tratados (izquierda) y crudos (derecha) en el Centro regional Sur (CRS) de Facultad de Agronomía usados en esta tesina. Los efluentes tratados son recolectados en la segunda laguna de tratamiento (laguna facultativa) y los efluentes crudos a la salida de la sala de ordeño.

En el Cuadro 1 se muestra la composición de los efluentes concentrados, sin tratar tomados directo de la sala de ordeño.

**Cuadro 1.** Composición de efluentes sin tratar\*

N (mg/l)	P (mg/l)	K (mg/l)
533	82	307

\*Estimación realizada para vacas de 550 kg de PV; 20 L leche; 0,4%P y 1,48% de K en la dieta, un gasto de agua de 50 L/v/d en el ordeño y un tiempo de estadía medio en el corral de 2 horas/d. Cálculos tomados de Nennichet al. 2005.

La composición de los efluentes tratados con sistema de doble pileta en Uruguay se presentan en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Composición de efluentes de tambo tratados y límites requeridos por el MGAP.

	N total (limite 10 mg/l)	P total (limite 0,025 mg/l)	K total
Salida pileta anaerobia	88-433	40-118	266-539
Salida pileta facultativa	28-265	23-180	
Lodo de pileta anaerobia	2500-3500	190-290	900-1700

Composición (mg/L, valores min/máx.) de N, P y K de efluentes de tambo tratados con un sistema de doble pileta (MGAP, 2008; La Manna y Malcuori, 2008).

Los efluentes están compuestos mayoritariamente por estiércol y orina. La orina contiene principalmente elementos solubles orgánicos simples y minerales, por lo tanto, los nutrientes presentes en la orina están inmediatamente disponibles para las plantas, aunque también corren el riesgo de perderse, principalmente el N.

En cuanto al estiércol contiene principalmente compuestos orgánicos que sufren procesos de ataque microbiano, ya sea en el sistema de almacenamiento o en el suelo, cuando son depositados directamente. Este proceso de degradación del estiércol produce pérdidas de C que es utilizado por la biomasa microbiana como fuente de energía, en tanto que los elementos minerales se van concentrando, lo que lleva a la disminución de la relación C/N (Casanova y del Pino 2008).

En la medida que un efluente es estacionado por mayor tiempo, o los procesos biológicos son acelerados, el material a ser aplicado tendrá menores valores de C/N, siendo esperable un mayor impacto favorable, sobre todo en la disponibilidad de N mineral.

Cuando se agrega materiales líquidos al suelo generalmente su distribución en la superficie es bastante homogénea, en tanto que su aporte de nutrientes es bajo, especialmente en aquellos elementos asociados a la fase sólida. A medida que el contenido de materiales sólidos aumenta se pueden tener materiales con mayor aporte de nutrientes, dependiente de la presencia de materiales que no provengan de las

deyecciones (suelo, residuos de paja, etc.). De todos modos, la distribución de estos materiales es generalmente más heterogénea. En cambio, cuando se aplica un material que se ha dejado secar, y por lo tanto tiene niveles muy bajos de humedad, se facilita la distribución, al tiempo que se logran mayores impactos, debidos al aporte de nutrientes y mejora de propiedades físicas y biológicas del suelo. (Casanova y Del Pino 2008).

Aunque los parámetros de disponibilidad de nutrientes o físicos del suelo no mantengan los incrementos logrados de inmediato, los beneficios en el corto y mediano plazo justifican el agregado de este tipo de enmiendas, especialmente en suelos que han perdido la fracción más activa de su componente orgánico. Debe considerarse que una gran parte de los campos de producción lechera están recibiendo una presión importante sobre el recurso y necesitan por lo tanto recuperar en lo posible sus cualidades productivas (Casanova, Del Pino 2008).

El uso de estiércol como enmienda en el suelo aumenta el contenido de materia orgánica y mejora las propiedades físicas (baja la densidad aparente, aumenta la macroporosidad) y también mejora la capacidad de retención de agua (Silva et al. 1992, Casanova et al. 2004, Lagos J y Huertas J 2019).

La mayor parte del nitrógeno vuelve en formas orgánicas, de liberación lenta y solo un 50-60% de este N estará disponible en el primer año de aplicación. Una fracción del N estará como N mineral (amonio y nitrato), siendo disponible inmediatamente (Longhurst et al. 2012).

## **Objetivos**

En este trabajo, se ha elegido el ciclo del nitrógeno y los microorganismos involucrados en los procesos de nitrificación como objeto de estudio, dado que el riego con efluentes de tambo tiene aportes significativos de N y se crean diferentes microambientes en el suelo luego del riego, ambientes oxigenados, con poca oxigenación o anóxicos dependiendo del drenaje del suelo y alternando ciclos de humedecido y secado. En este trabajo se realizará la comparación del efecto en el suelo de efluentes tratados y sin tratar sobre el proceso de nitrificación, así como sobre la emisión del gas de efecto invernadero  $N_2O$  y también sobre la disponibilidad en el suelo de  $NH_4^+$  y  $NO_3^-$ .

El objetivo general es mejorar la utilización productiva de efluentes de tambo a través del conocimiento de sus características y de los procesos que ocurren una vez incorporados al suelo. Para esto se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la emisión de  $N_2O$  del suelo antes y después del riego con efluentes de tambo frescos y estacionados, así como también con la equivalente fertilización nitrogenada (urea).
- Evaluar si existe alguna relación de la emisión de  $N_2O$  con la actividad nitrificante, así como con la variación del número de microorganismos responsables de dicho proceso.
- Relacionar las emisiones de  $N_2O$  con la disponibilidad de  $NH_4^+$  y  $NO_3^-$  en el suelo.

## **Resultados esperados:**

Con estos resultados se espera contribuir a la valoración de los efluentes de tambo como insumos para la fertilización nitrogenada y profundizar en la comprensión de algunos de los procesos del ciclaje de N, para aportar mejores resultados productivos y disminuir la emisión de gases de efecto invernadero.

## **Materiales y métodos:**

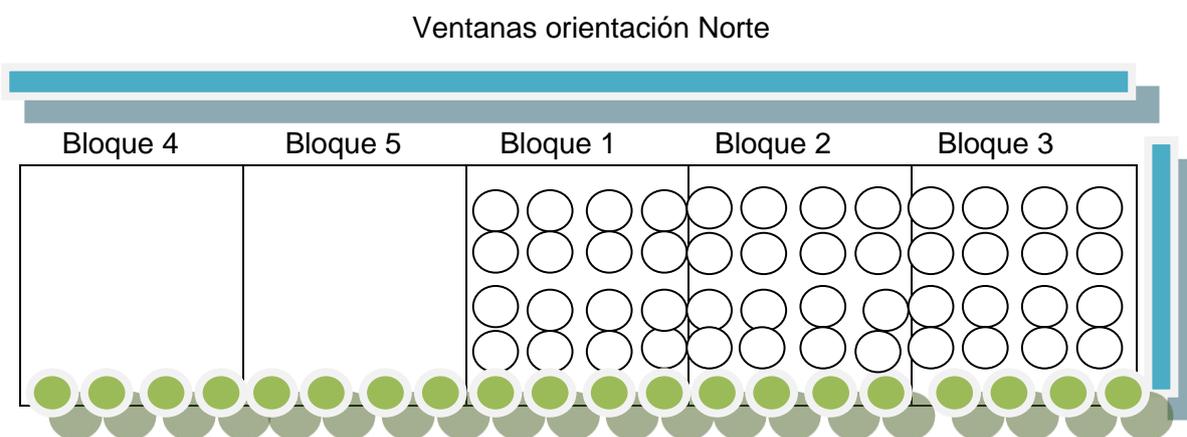
### **Ensayo de invernáculo**

Se instaló en agosto 2018 un ensayo de invernáculo en macetas con suelo donde se plantó *Festuca arundinacea* (gramínea perenne) con aplicación de efluentes de tambo frescos (alta relación C:N) y efluentes de tambo de una segunda laguna de tratamiento (baja relación C: N), comparado con un testigo fertilizado con urea y otro sin fertilización ni adición de efluentes. De aquí en adelante los tratamientos se designarán como EFC, EFL, U y A, respectivamente. En A se agregó agua para mantener el mismo tenor de humedad que en los demás tratamientos.

Para la colecta de efluentes de tambo tratados (baja relación C:N) se utilizó un recipiente 0,5 l con un soporte de 2m de longitud para poder tomar muestras de seis diferentes zonas de la segunda laguna de tratamiento que luego se mezclaron (Fig. 2). La colecta de efluentes frescos se realizó directamente a la salida de la sala de ordeño (Fig. 2).

### **Diseño experimental**

Los tratamientos se aplicaron a las macetas en un diseño de bloques, cada bloque aleatorizado, para las extracciones de suelo se colocaron las unidades experimentales (maceta con 4 plantas) en 3 bloques con 4 repeticiones de cada tratamiento y para las extracciones de gases 5 bloques cada uno con una sola repetición de tratamiento (Fig. 3).



**Figura 3.** Esquema de la disposición de las macetas en el invernáculo. Las macetas con cámara para realizar la colecta de gases se representan en verde, el resto de las macetas se utilizaron para realizar los muestreos de suelo.

El suelo usado se colectó de la capa más superficial (15 cm superiores) del Centro Regional Sur de la Facultad de Agronomía, al igual que los efluentes. La dosis de efluentes aplicados a las macetas fue la correspondiente a  $200 \text{ kg de N} \times \text{ha}^{-1}$ , distribuyendo la mitad cuatro semanas posgerminación y la otra mitad luego del primer corte de la pastura. El suelo se mantuvo a 70 % de capacidad de campo. Pevio a la

aplicación, los efluentes y el suelo fueron caracterizados de acuerdo con su composición fisicoquímica y los efluentes se normalizaron por el contenido de N total para su aplicación. Cada maceta contenía 4kg de suelo. Los efluentes de la laguna presentaron 111,5 mg N total x L<sup>-1</sup>, y con este dato se ajustó la dosis de riego por maceta.

De igual manera se calculó el volumen de riego para el efluente concentrado. En la Fig. 4 se muestra una foto del ensayo de invernáculo.

La duración del experimento fue de 90 días durante los que se hizo muestreos de suelo (submuestras de 40 g) para determinar el potencial de nitrificación y el contenido de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el suelo, de acuerdo con el cronograma del cuadro 3.



**Figura 4.** Distribución de las macetas para el muestreo de suelo y las macetas que presentan cámara, cada maceta presenta 4 plantas de Festuca marcadas con una arandela cada una.

**Cuadro 3.** Cronograma de actividades experimentales durante el año 2018

Fecha	Muestreo de suelo para medir $\text{NH}_4^+$ y $\text{NO}_3^-$	Toma de muestras gaseosas	Muestreo de suelo para recuento de oxidadores de $\text{NH}_4^+$	Riego con efluentes
13/9		X		
20/9	X	X		X
22/9		X		
24/9		X		
26/9		X		
27/9	X			
28/9		X		
5/10		X		
12/10		X		
22/10	X			
13/11		X		
14/11	X			X
16/11	X			
17/11		X		
19/11		X		
21/11		X		
24/11	X	X		
30/11		X		
7/12		X		
13/12		X		
17/12	X	X	X	

### **Cuantificación de amonio y nitrato**

Para realizar estos análisis, se toma suelo húmedo (5 g) de las macetas con los 4 tratamientos etiquetadas con el número 1 (otorgado al azar) en cada bloque. Para la extracción se agregan 15 mL de KCl 2M, se agita durante 30 min y posteriormente se filtra la suspensión con papel Whatman nº 41. El contenido de  $\text{NO}_3^-$  se cuantificó tras la reducción a  $\text{NO}_2^-$  por una columna de cadmio y posterior determinación colorimétrica (reacción de Griess-Ilosvay). El contenido de  $\text{NH}_4^+$  se cuantificó según Rhineet al. 1998. El N mineral se calculó como la suma de  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  y  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ .

### **Cuantificación de microorganismos oxidantes de $\text{NH}_4^+$**

El recuento se realizó por la técnica del número más probable (NMP). Se suspendieron 10 g de suelo fresco en 90 mL de buffer fosfato ( $\text{pH}=7 \pm 0,2$ ) y se realizaron diluciones seriadas en base 10. Se sembraron 3 repeticiones de las diluciones -2, -3, -4 en tubos de 4ml.

Para la cuantificación por NMP de microorganismos oxidadores de amonio, se utilizaron tubos con 4 mL de medio mineral con  $5 \text{ g L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Los tubos se incubaron durante 30 días en agitación a  $28^\circ\text{C}$ . La presencia de  $\text{NO}_2^-$  es revelada con el color rojizo al agregar los reactivos de Griess-Ilosvay al medio en los diferentes tubos (Illarze et al. 2017). Con estos resultados se fue a las tablas descriptas para el método (NMP) según el número de las 3 repeticiones para cada dilución que dio positivo, se calculó el número de microorganismos presentes en la muestra.

### **Emisión de $\text{N}_2\text{O}$**

Se determinó la pérdida de N gaseoso como  $\text{N}_2\text{O}$  cada dos días después de la primera semana posriego y con una frecuencia semanal durante un mes. Para cuantificar el flujo de los gases emitidos, se utilizó el método de cámara cerrada, disponiendo cámaras estáticas en las macetas ( $n=4$ )

La cuantificación del  $\text{N}_2\text{O}$  emitido se realizó por cromatografía de gases según Irisarri et al. (2012). Las campanas se taparon previo a la toma de muestras gaseosas que se tomaron con una jeringa de 10 ml y se almacenaron en tubos de vidrio con tapa de goma a los que previamente se hizo vacío (Fig. 5). Para recoger la muestra se llena la jeringa tres veces y se vuelve a vaciar dentro de la campana para hacer que circule el aire y así tomar una muestra homogénea, se repite el mismo procedimiento a los 20 minutos y a los 40 siempre manteniendo la campana cerrada de manera que se vaya acumulando el gas emitido.



**Figura 5.** Campana previo al cerrado (izquierda), campanas cerradas (centro) y toma de muestras de gases (derecha).

### **Análisis estadístico**

Se utilizó el programa estadístico Infostat (Di Rienzo et al. Versión 2019) para realizar los cálculos de medias, desvío estándar y análisis de varianza. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la emisión de óxido nítrico, contenido de N mineral y recuento de oxidadores de amonio. Para determinar diferencias significativas entre las medias de los tratamientos se realizó un test de LSD (Fisher) ( $p < 0.05$ ) y también se realizaron análisis de correlación de *Pearson* ( $r$ ) entre algunas de las variables.

## Resultados

### Emisiones de N<sub>2</sub>O

Los flujos de N-N<sub>2</sub>O promedio por fecha de los distintos tratamientos se presentan en la Fig. 6. Con la primera aplicación de los tratamientos y en 2 oportunidades luego de la segunda aplicación se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 4). En todos los casos el tratamiento EFC (con agregado de efluentes crudos) fue el que presentó mayores flujos de N<sub>2</sub>O.

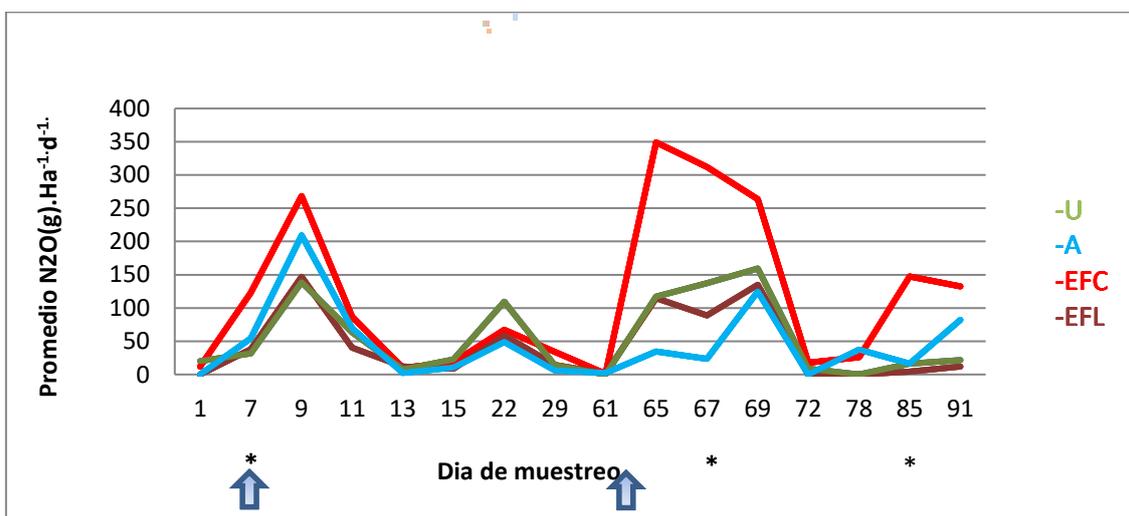


Figura 6. Emisiones de N<sub>2</sub>O del suelo bajo los diferentes tratamientos.

Se marca con asterisco (\*) las fechas donde existió diferencias significativas entre tratamientos (días, 7, 67, 85). Se marca con flechitas dos fechas donde se realizaron los riegos con los diferentes tratamientos (días, 7, 62). Tratamientos: U: urea, A: agua, EFC: efluentes concentrados, EFL: efluentes de laguna.

**Cuadro 4.** Análisis de varianza para las emisiones de N<sub>2</sub>O.

Día	U	A	EFC	EFL
1	A	A	A	A
7	B	AB	A	B
9	A	A	A	A
11	A	A	A	A
13	A	A	A	A
15	A	A	A	A
22	A	A	A	A
29	A	A	A	A
61	A	A	A	A
65	A	A	A	A
67	B	B	A	B
69	A	A	A	A
72	A	A	A	A
78	A	A	A	A
85	B	B	A	B
91	A	A	A	A

Tratamientos: U: urea, A: agua, EFC: efluentes concentrados, EFL: efluentes de laguna.

A continuación en el cuadro 5. se muestra la conversión de fechas que fue necesaria para realizar los cálculos realizados en la Fig. 6.

**Cuadro 5.** Conversión de las fechas de medición de la emisión de N<sub>2</sub>O a día para los cálculos.

conversión Día	Fecha
1	13-sep
7	20-sep
9	22-sep
11	24-sep
13	26-sep
15	28-sep
22	05-oct
29	12-oct
61	13-nov
65	17-nov
67	19-nov
69	21-nov
72	24-nov
78	30-nov
85	07-dic
91	13-dic

Con el cálculo del área total bajo las curvas (Fig. 6) se obtuvieron las emisiones de N-N<sub>2</sub>O totales para cada tratamiento (Cuadro 6). Observándose valores similares para los tratamientos U, A y EFL y un valor cercano al doble para las macetas tratadas con EFC.

**Cuadro 6.** Emisiones de N-N<sub>2</sub>O totales en el período del ensayo.

Tratamientos	N-N <sub>2</sub> O kg ha <sup>-1</sup>
U	3
A	2,4
EFC	6,5
EFL	2,3

Tratamientos: U: urea, A: agua, EFC: efluentes concentrados, EFL: efluentes de laguna.

### **Cuantificación de oxidadores de Amonio**

El recuento se llevó a cabo al final del experimento, 3 meses después del inicio del ensayo y un mes después de la segunda aplicación de efluentes a la pastura.

El NMP de oxidadores de amonio se muestra en el cuadro 7. No hubo diferencias significativas en el número de estos microorganismos entre los tratamientos.

**Cuadro 7.** Numero más probable (NMP) de oxidadores de amonio, media  $\pm$  desvío estándar.

tratamiento	NMPdeoxidadores de amonio * x 10 <sup>3</sup>
U	0,6 $\pm$ 0,5
A	1,3 $\pm$ 0,8
EFC	1,1 $\pm$ 0,8
EFL	1,8 $\pm$ 1,4

\*El NMP de oxidadores de amonio no fue diferente significativamente entre los tratamientos, Tratamientos: U: urea, A: agua, EFC: efluentes concentrados, EFL: efluentes de laguna. Medias de tres repeticiones por tratamiento y su correspondiente desvío estándar.

## Contenidos de amonio y nitrato en el suelo

### Disponibilidad de Amonio

El cuadro 8 muestra los valores de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> registrados de acuerdo con los días transcurridos después del primer agregado de los efluentes u otro tratamiento. El día 55 corresponde a la segunda aplicación (marcado con flecha). Enseguida de la primera aplicación se observaron diferencias significativas entre todos los tratamientos, siendo U el que presentó mayor contenido de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y Agua el que presentó menor. Para la segunda aplicación de tratamientos solo se diferenció EFC presentando el valor mayor y a los 2 días el que presentó menor contenido de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> con diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos fue el tratamiento A.

**Cuadro8.** Amonio disponible en el suelo (mg.g<sup>-1</sup>).

Día	Urea		Agua		EFC		EFL	
1 $\Rightarrow$	32,8 $\pm$ 4	A	3,3 $\pm$ 0,7	D	13,7 $\pm$ 0	C	22,6 $\pm$ 0,1	B
7	3,2 $\pm$ 0,2	A	2,7 $\pm$ 0,1	A	4,4 $\pm$ 2	A	3,2 $\pm$ 0,9	A
32	5,6 $\pm$ 2,9	A	3,6 $\pm$ 1,2	A	4,2 $\pm$ 0,3	A	6,8 $\pm$ 4	A
55 $\Rightarrow$	4,5 $\pm$ 4,4	B	1,1 $\pm$ 1,2	B	10,9 $\pm$ 3,6	A	4,1 $\pm$ 4,9	B
57	10,7 $\pm$ 5,6	A	0,5 $\pm$ 0,6	B	11 $\pm$ 1,8	A	9,1 $\pm$ 4	A
65	2,7 $\pm$ 2,2	A	1,1 $\pm$ 1,1	A	2,2 $\pm$ 0,6	A	2,0 $\pm$ 2,2	A
88	1,7 $\pm$ 1,4	A	1,3 $\pm$ 0,6	A	2,0 $\pm$ 2,1	A	1,6 $\pm$ 0,7	A

Mediade amonio (mg) de 3 muestras por gramo de suelo y su correspondientes desvío estándar. Con las diferentes letras se marca si hay ono diferencias estadísticas entre los tratamientos. Tratamientos: U: urea, A: agua, EFC: efluentes concentrados, EFL: efluentes de laguna. Se marca con flecha los días donde se realizaron los riegos con los diferentes tratamientos.

### Contenido de nitrato del suelo

El contenido de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se muestra en el cuadro 9 de acuerdo con los días transcurridos después del primer agregado de los efluentes u otro tratamiento. El día 55 corresponde a la segunda aplicación (marcado con flecha). Luego de 7 días de la aplicación se observaron diferencias significativas entre tratamientos, siendo EFL el que presentó mayor contenido de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (cuadro 9). En el siguiente muestreo del día 32 se observa el menor valor para las macetas regadas con agua. Para la segunda aplicación de tratamientos se diferenció EFC y Urea presentando los valores menores, por otra parte, EFL y A los mayores. En el día 65 del ensayo se observó que el mayor valor de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> lo presentaron las macetas tratadas con EFC y para el último día del ensayo el menor valor con diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos lo presentaron las macetas regadas con EFL.

**Cuadro 9.** Nitrato disponible en el suelo ( $\text{mg.g}^{-1}$ ).

Día	Urea		Agua		EFC		EFL	
1	17 $\pm$ 4,7	A	17,4 $\pm$ 4	A	17,5 $\pm$ 4,5	A	15,4 $\pm$ 1,2	A
7	26,2 $\pm$ 4,8	B	25,6 $\pm$ 3,3	B	24 $\pm$ 1,7	B	31,7 $\pm$ 4,3	A
32	70,6 $\pm$ 5,9	A	75 $\pm$ 21,8	A	40,6 $\pm$ 5,2	B	48,1 $\pm$ 25,2	A
55	61,5 $\pm$ 15,2	B	83,9 $\pm$ 7,8	A	30,3 $\pm$ 9,4	C	95 $\pm$ 26,8	A
57	49 $\pm$ 19,1	A	58,3 $\pm$ 9	A	42,2 $\pm$ 12,9	A	51,9 $\pm$ 27	A
65	99,4 $\pm$ 18,2	A	79,8 $\pm$ 10,8	A	52 $\pm$ 21,8	B	96,7 $\pm$ 18,3	A
88	58,7 $\pm$ 7,3	A	57 $\pm$ 13,7	A	67,4 $\pm$ 5,6	A	32,5 $\pm$ 11,2	B

Media de nitrato de 3 muestras y su correspondiente desvío estándar. Con las diferentes letras se marca si hay o no diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Tratamientos: U: urea, A: agua, EFC: efluentes concentrados, EFL: efluentes de laguna. Se marca con flecha los días donde se realizaron los riegos con los diferentes tratamientos (1,55).

Por último, se comparó el contenido de  $\text{NH}_4^+$  y el contenido de  $\text{NO}_3^-$  con las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$ . No existió correlación entre estos parámetros, siendo los  $p$ -valores de la regresión respecto al  $\text{N}_2\text{O}$ , 0,456 para  $\text{NH}_4^+$ , 0,649 para  $\text{NO}_3^-$  y 0,908 para el N mineral total.

## Discusión:

### Emisión de óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ )

El primer objetivo de esta tesis fue conocer si el agregado de efluentes de tambo, tanto crudos como tratados en laguna, modificaba la emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  del suelo sembrado con Festuca en relación con la fertilización con urea.

Los picos en las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  para todos los tratamientos el mismo día que se realizó el primer riego (día 7, figura 6, cuadro 4) o inmediatamente después del segundo riego (día 62, figura 6, cuadro 4) pueden deberse a la formación de ambientes anóxicos por el agregado de agua que contienen los 4 tratamientos, obligando a los microorganismos a respirar compuestos nitrogenados en ausencia de  $\text{O}_2$  (Vander Weerden et al, 2016). Estos autores detectaron que inmediatamente después de la aplicación de los efluentes se formaban ambientes anaeróbicos. Este mismo resultado fue observado por Luo et al. (2008), quienes constataron que los efluentes provocaban la formación de ambientes anaerobios por su contenido de agua, aumentando la emisión de  $\text{N}_2\text{O}$ . Otros autores observaron que el riego simplemente con agua provoca la formación de microambientes anóxicos pero que el agregado de efluentes además aumenta la disponibilidad de N y C en el suelo y por lo tanto las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  (Bhandalet al. 2007, Barton y Shipper 2001). Esto podría estar ocurriendo en nuestro ensayo con la aparición de picos en las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  inmediatamente después del riego por la formación de ambientes anóxicos entre otras razones (Bhandralet al. 2010). En las macetas tratadas con EFC que presentaron un aumento en las emisiones totales de  $\text{N}_2\text{O}$  con respecto a los demás tratamientos (cuadro 6) se está agregando una mayor cantidad de C, que entre otras cosas podría ser donador de electrones para la desnitrificación. Este resultado alienta la aplicación de efluentes tratados dado que estos producen menor emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  realizando igualmente aporte de nitrógeno al suelo.

Li et al. (2014) también constataron que el factor de emisión de  $\text{N}_2\text{O}$ , producto indirecto de la volatilización de  $\text{NH}_3$ , fue mayor para los efluentes frescos aplicados a pasturas que para los estacionados 4 meses. Laubach et al. (2015) observaron que el  $\text{N}_2\text{O}$  pudo aumentar de forma directa a través de la nitrificación y desnitrificación asociada, o de

forma indirecta por medio de la volatilización de  $\text{NH}_3$ . Contrariamente, Bhandral et al. (2007) en un ensayo de riego a pasturas con efluentes frescos y tratados durante el otoño reportaron mayores emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  cuando se regó con efluentes tratados que con efluentes crudos. Esto pudo deberse a que el efluente crudo tiene una mayor relación C/N y esto puede provocar una liberación retardada del N por mineralización de este y por otra parte producirse menos  $\text{N}_2\text{O}$  porque se realiza una desnitrificación completa hasta  $\text{N}_2$  por tener mayor contenido de C.

El pico observado en las emisiones para todos los tratamientos 15 días después del primer riego el día 22 (figura 6, cuadro 4) puede ser producto de una mayor actividad microbiana dado que la temperatura promedio del suelo con respecto a la anterior medición aumento de  $18,1^\circ\text{C}$  el día 28 de septiembre a  $21,4^\circ\text{C}$  para el día 5 de octubre (en anexo). Las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  incrementan con el aumento de la desnitrificación que depende entre otras cosas del pH y la temperatura del suelo (Blackmer y Bremner 1978; Van Cleemput 1998 y Wang et al. 2013).

### **Oxidadores de amonio**

El segundo objetivo del trabajo fue evaluar si existe alguna relación de las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  con la actividad nitrificante, así como con la variación del número de microorganismos responsables de dicho proceso. No se observaron diferencias entre los tratamientos en cuanto al número de oxidadores de amonio al final del experimento (cuadro 7), presentando valores del orden de  $10^3$ . Habteselassine et al. (2013) observaron que el número de bacterias oxidadoras de  $\text{NH}_4^+$  llegó a valores del orden de  $10^7$ , aunque los niveles de nitrógeno agregados son similares a los nuestros ( $200\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ). Este ensayo sin embargo fue de largo plazo realizando riegos con efluentes durante 6 años. Existe a su vez un efecto regional sobre los microorganismos y su comportamiento (Van der Weerden et al. 2016). Otros ensayos de largo plazo reportan un aumento de las bacterias oxidadoras de  $\text{NH}_4^+$ , con el agregado de efluentes de tamba (Zhang et al. 2018, Liu y Haynes 2010).

Dado que los oxidadores de amonio son microorganismos de crecimiento lento y solo una pequeña porción de estos es cultivable, utilizar la técnica del NMP como en nuestro caso para estudiar esta población representa una limitación metodológica, una alternativa para evitar esto podría ser la amplificación por qPCR del gen de la amoniomonoxigenasa, lo que permitiría estimar una población del orden de  $10^5$  a  $10^7$  bacterias oxidantes de  $\text{NH}_4^+$ . (Illarze et al. 2017).

### **Amonio y Nitrato**

En tercer lugar, se planteó como objetivo relacionar las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  con la disponibilidad de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  en el suelo.

Los elevados niveles de  $\text{NH}_4^+$  luego del riego para las macetas tratadas con U, EFC o EFL y los niveles muy bajos  $\text{NH}_4^+$  para las macetas tratadas con agua (cuadro 8), pueden deberse a la composición fisicoquímica del efluente ya que estos al igual que la urea contienen  $\text{NH}_4^+$  (Feng et al. 2005, Khan et al. 2007, Bhandral 2010). Esto también podría explicar que las macetas tratadas con EFC tuvieron diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos luego de realizar el primer riego y el segundo.

Luego del riego los altos niveles de  $\text{NH}_4^+$  disponible en el suelo comienzan a descender debido a que es metabolizado por los microorganismos capaces de oxidar amonio a  $\text{NO}_2^-$  y absorbido por plantas o asimilado por microorganismos. Este proceso de

nitrificación provoca el aumento sostenido de  $\text{NO}_3^-$  durante el ensayo (cuadro 9). Luo et al. (2008) también reportan niveles de  $\text{NO}_3^-$  bajos antes de aplicar los efluentes que luego aumentaron, sobretodo luego del segundo riego. Estos autores a su vez comunican un efecto regional en los suelos de Nueva Zelanda, pudiendo alcanzar valores elevados de  $\text{NO}_3^-$  luego del riego con efluentes o prácticamente no observar niveles mayores de  $\text{NO}_3^-$  para pradera regadas con efluentes respecto al control (agua). Este efecto responde a la estructura y composición del suelo que influyen en el tipo de comunidades de microorganismos que habitan en cada región.

Bhandral (2010) reporta que los niveles de  $\text{NO}_3^-$  aumentaron lentamente y de forma sostenida luego del riego, debido a la nitrificación y mineralización del nitrógeno disponible en los efluentes, lo que también puede estar ocurriendo con nuestros resultados.

En nuestro ensayo podemos inferir también un efecto importante de la temperatura dado que los niveles de  $\text{NO}_3^-$  fueron aumentando de forma sostenida conforme pasaron los días de ensayo y la temperatura media aumentaba en el suelo debido a un efecto estacional, esto provoca un aumento en la actividad bacteriana aumentando entre otros procesos la nitrificación (Van der Weerden et al. 2016).

No se observó correlación entre los niveles de  $\text{NO}_3^-$  y el  $\text{N}_2\text{O}$  emitido, ni entre los niveles de  $\text{NH}_4^+$  y el  $\text{N}_2\text{O}$  emitido. La gran variabilidad de los resultados de las emisiones pudo enmascarar esas correlaciones, aunque otros autores ya han reportado falta de correlación debido a los múltiples factores que pueden afectar las emisiones (Lark et al. 2004). Aunque las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  están relacionadas en parte con el N total del suelo y los procesos de desnitrificación y nitrificación que ocurren en él, también dependen de otros factores que influyen esos procesos, así como la absorción de N mineral por la pastura o la inmovilización por microorganismos. Otra posibilidad es que el nitrógeno presente en forma de  $\text{NH}_4^+$ , en el suelo se perdiera mediante volatilización en lugar de sufrir nitrificación y luego desnitrificación, descendiendo de esta manera los niveles de  $\text{NH}_4^+$  en el suelo y no permitiendo establecer una correlación con las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  (Li et al. 2014).

También es posible que se realizara desnitrificación completa a  $\text{N}_2$  en ausencia de  $\text{O}_2$ , obligando a los microorganismos a respirar compuestos nitrogenados de tal manera que no se produzca  $\text{N}_2\text{O}$  como observaron Van der Weerden et al. (2016).

## **Conclusiones**

Si bien los resultados obtenidos son preliminares y corresponden a un ensayo en macetas en invernáculo, indicarían que el riego con efluentes crudos produce un aumento significativo en las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$ .

Por otra parte, no se observó un aumento en el número de oxidadores de amonio con ningún tratamiento, aunque no se evaluó el número de desnitrificantes que probablemente sean los responsables de las emisiones en estas condiciones.

Por último, no se observa una correlación entre las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  y el  $\text{NH}_4^+$  disponible o una correlación entre las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  y el nivel de  $\text{NO}_3^-$  disponible en el suelo.

## Bibliografía

Adair KI y Schwartz E (2008). Evidence that ammonia-oxidizing archaea are more abundant than ammonia-oxidizing bacteria in semiarid soils of northern Arizona. *Microbial Ecology* 56: 420-426.

Barton L y Schipper LA (2001). Regulation of nitrous oxide emissions from soils irrigated with dairy farm effluent. *Journal of Environmental Quality* 30:1881-1887.

Bhandral R, Bolan NS, Saggiar S y Hedley MJ (2007). Nitrogen transformation and nitrous oxide emissions from various types of farm effluents. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 79: 193-208.

Bhandral R, Bolan NS y Saggiar S (2010). Nitrous oxide emission from farm dairy effluent application in grazed grassland. *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal* 10(1): 22 – 34.

Blackmer AM y Bremner JM (1978), Inhibitory effect of nitrate on reduction of N<sub>2</sub>O to N<sub>2</sub> by soil microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 10: 187-191.

Casanova O, Duran A, del Pino A y Melo R (2004). Reciclaje de los efluentes de tambo en un sistema de producción lechera sostenible. Congreso de Agroecología-Porto Alegre, Brasil 22 a 25 de noviembre de 2004.

Casanova O y Del Pino A (2007). Aplicación al suelo de efluentes de tambo: consideraciones generales y pautas de manejo. Informe elaborado a solicitud de INALE por docentes del Dpto. de Suelos y Aguas – Facultad de Agronomía-UDELAR.

Casanova O y del Pino A (2008). Anexo 2- Estiércol en la producción lechera. En: Guía de gestión integral de aguas en establecimientos lecheros. Eds. DINAMA, CONAPROLE, Fundación J. Ricaldoni, IMFIA. Montevideo. pp. 181-189.

Corrales LC, Caycedo L, Gomez MA, Ramos SJ y Rodríguez JN (2017). *Bacillus* spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *NOVA* 15: 45-65.

Charlón V (2007). Residuos en las instalaciones de ordeño. *Revista de Información sobre Investigación y Desarrollo Agropecuario XXI* 9: 80-85.

Di Rienzo JA., Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M y Robledo CW. InfoStat versión 2019. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Feng GL, Letey J, Chang AC y Campbell MM (2005). Simulating dairy liquid waste management options as a nitrogen source for crops. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 110: 219-229.

Froni L (2006). *Microbiología Básica, ambiental y agrícola*, Editorial de la Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay-2006.p.169-209, cap.10, 11.

Gambaudo S, Imhoff S, Carrizo ME, Marzetti M y Racca S (2014). Uso de efluentes líquidos de tambo para mejorar la productividad de cultivos anuales y la fertilidad del suelo. *Ciencia del Suelo* 32:197-208.

Habteselassie MY, Xu L y Norton JM (2013). Ammonia-oxidizer communities in an agricultural soil treated with contrasting nitrogen sources. *Frontiers in Microbiology* 4:326.

Illarze G, Del Pino A, Riccetto S e Irisarri P (2017). Emisión de óxido nitroso, nitrificación, desnitrificación y mineralización de nitrógeno durante el cultivo de arroz en 2 suelos de Uruguay. *Revista Argent Microbiol* 50: 97-104.

Imhoff S, Ghiberto P, Carrizo ME, Charlón V, Zen O y Gambaudo S (2011). Uso alternativo de efluentes de tambo para disminuir el impacto ambiental. En: V Congreso Iberoamericano sobre Desarrollo y Ambiente de REDIBEC y V Jornadas de la Asociación Argentino-Uruguaya de Economía Ecológica, Santa Fe. Resumen en CD de V CISDA.

Irisarri P, Pereira V, Fernández A, Terra J y Tarlera S (2012). CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions in a rice field: First measurements in the Uruguayan productive system. *Agrociencia* 16: 1-10.

Khan AU, Iqbal M y Islam KR (2007). Dairy manure and tillage effects on soil fertility and corn yields. *Bioresource Technology* 98: 1972-1979.

Lagos J y Huertas J (2019). Efectos de una enmienda orgánica sobre las propiedades fisicoquímicas de un Andisol, en Túquerres, Nariño, Colombia. *Agro Sur* 47: 39-54.

La Manna A y Malcuori E (2008). Anexo 6-Matrices de riesgo aplicadas a establecimientos lecheros. En: Guía de gestión integral de aguas en establecimientos lecheros. Eds. DINAMA, CONAPROLE, Fundación J. Ricaldoni, IMFIA. Montevideo. pp. 213-215.

Lark RM, Milne AM, Addiscott TM, Goulding WWT, Webster CP y O'Flaherty S (2004). Scale and location dependant correlation of nitrous oxide emissions with soil properties: an analysis using wavelets. *European Journal of Soil Science* 55: 611-627.

Laubach J, Heubeck S, Pratt C, Woodward K B, Guieysse B, Van der Weerden TJ, Chung ML, Shilton AN y Craggs RJ (2015). Review of greenhouse gas emissions from the storage and land application of farm dairy effluent. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. Volume 14.

Laurent P, Andert J, Jones C M, Bru D y Hallin S (2010.) Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for N<sub>2</sub>O emissions from soil. *Global Change Biology* 17: 1497-1504.

Liu YY y Haynes J (2010). Long-term Irrigation with Dairy Factory Wastewater Influences Soil Quality World Academy of Science. *Engineering and Technology* 4:10-23.

Li J, Shi Y, Luo J, Houlbrooke D, Ledgard S, Ghani A y Lindsey S (2014). Effects of form of effluent, season and urease inhibitor on ammonia volatilization from dairy farm effluent applied to pasture. *Journal of Soils Sediments* 14: 1341–1349.

Longhurst B, Houlbrooke D, Orchiston T y Muirhead R (2012). Characterising dairy manures and slurries. *Advanced Nutrient Management: Gains from the Past-Goals for the Future*. Occasional Report 25.

Luo J, Sagggar S, Bhandral R, Bolan N, Ledgard S, Lindsey S y Sun W (2008). Effects of irrigating dairy-grazed grassland with farm dairy effluent on nitrous oxide emissions. *Plant Soil* 309:119–130.

MGAP. Manual de Manejo de efluentes de tambo.2008.  
<http://www.cebra.com.uy/presponsable/2008/06/05/manual-de-manejodeefluentes-de-tambo/>

Nennich TD, Harrison JH, VanWieringen LM, Meyer D, Heinrichs A J, Weiss WP y Block E (2005). Prediction of manure and nutrient excretion from dairy cattle. *Journal of dairy science* 88:3721-3733.

Rhine ED, Sims GH, Mulvaney RL y Pratt EJ (1998).Improving the Berthelotre action for determining ammonium in soil extract sandwater. *Soil Science Society of America Journal* 62:473-480.

Schröder JJ, Aarts HFM, Van Meddelkoop JC, Schils RL, Velthof GL, Fraters B y Willems WJ (2007). Permissible manure and fertilizer use in dairy farming systems on sandy soils in the Netherlands to comply with the Nitrates directive target. *European Journal of Agronomy* 27: 102-114.

Shi Y, Eissenstat D M, He y Davis K J (2018). Using a spatially-distributed hydrologic biogeochemistry model with a nitrogen transport module to study the spatial lvariation of carbon processes in a Critical Zone Observatory. *Ecological Modelling* 380:8-21.

Silva A, Ponce de Leon J, Cavassa R y Reyes W (1992). Efecto de la aplicación de efluentes orgánicos de tambo sobre la producción de verdeos y propiedades físico – químicas del suelo. *Notas Técnicas No 16*. Facultad de Agronomía. Montevideo. Uruguay.

Taverna M, Charlón V, García K y Walter E (2007). Manejo de efluentes de tambos «INTA Rafaela». *Revista de Información sobre Investigación y Desarrollo Agropecuario XXI* 9: 86-92.

Van Cleemput O (1998). Subsoils: chemo-and biological denitrification, N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub>emissions. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 52: 187-194.

Van der Weerden TJ, Cox N, Luob J, Dic HJ, Podolyanc A, Phillipsd R L, Saggare S, De Klein CAM, Ettemaf P y Rysf G (2016). Refining the New Zealand nitrous oxide emission factor for urea fertiliser and farm dairy effluent. *Agriculture Ecosystems and Environment* 222: 133–137.

Wang R, Feng Q, Liao T, Zheng X, Butterbach-Bahl K y Zhang W (2013).Effects of nitrate concentration on the denitrification potential of a calcic cambisol and it fractions of N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O and NO. *Plant and Soil* 363: 175-189.

Zhang Y, Hao X, Alexander TW, Thomas BW, Shi XY, Lupwayi NZ (2018).Long-term and legacy effects of manure application onsoilmicrobialcommunitycomposition.*Biology and Fertility of Soils*54: 269–283.