

Emisiones de óxido nitroso por suelos cultivados con arroz: efecto de un inhibidor de la nitrificación

Domínguez, V.^{1*}(†); Irisarri, P.; y Gonnet, S.

¹Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Agronomía. Av. Garzón 780. Montevideo, Uruguay.

*Este trabajo se publica en memoria de Valeria Domínguez (1976-2007) quien realizó los experimentos y estaba escribiendo los resultados para su Trabajo Especial II de la Licenciatura de Bioquímica.

Correo electrónico: irisarri@fagro.edu.uy

Recibido: 27/7/07 Aceptado: 26/12/07

Resumen

El N₂O, gas con efecto invernadero, se produce en procesos bacterianos como producto secundario del proceso de nitrificación y como intermediario en el proceso de desnitrificación. En el sistema de producción de arroz que se utiliza en Uruguay, la pérdida de nitrógeno en forma de N₂O ha sido poco estudiada y para disminuirla se ha propuesto el uso de fertilizantes que contengan un inhibidor de la nitrificación. El objetivo de este trabajo fue medir si la inhibición de la nitrificación tiene efecto sobre las emisiones de N₂O de un suelo cultivado con arroz y determinar si éstas provienen de la desnitrificación o de la nitrificación. El ensayo se realizó en invernáculo y se fertilizó con urea o ENTEC (fertilizante que contenía nitrato, amonio y el inhibidor de la nitrificación 3,4 dimetil pirezolofato). El efecto inhibidor de la nitrificación se evidenció en el tratamiento con ENTEC en una menor concentración de nitrato y menor cantidad de N₂O emitido hasta los 30 días después de la siembra. Luego de 10 días de inundado el cultivo no se detectó emisión de N₂O en ninguno de los tratamientos. El N₂O proveniente de la nitrificación era menor en los tratamientos con ENTEC a los 14 días después de la siembra. Después de 35 días el N₂O se originaba por desnitrificación en todos los tratamientos.

Palabras clave: desnitrificación, DMPP, N₂O, nitrificación

Summary

Nitrous oxide emissions from soils planted with rice: effect of a nitrification inhibitor

Nitrous oxide (N₂O) is a greenhouse gas produced both by denitrification and nitrification processes and may constitute a significant nitrogen loss from agricultural soils. N₂O losses in rice culture in Uruguay have been scarcely studied. The aim of this work was to measure the effect of a nitrification inhibitor on the N₂O emissions from a rice field soil and to evaluate the contribution of nitrification and denitrification. The assay was placed in a greenhouse and consisted in urea and ENTEC (containing nitrate, ammonium and the nitrification inhibitor DMPP) fertilization. A closed-chamber technique was used for collecting gas samples at different dates, which were analysed for N₂O by gas chromatography. Thirty days after fertilization soil nitrate content and N₂O emission were lower for ENTEC treatment than for urea, confirming nitrification inhibitor effect. No emission was detected from 10 days after flooding for any treatment. N₂O originated from nitrification was lower for ENTEC treatment 14 days after sowing. After 35 days N₂O was due to denitrification in all treatments.

Key words: denitrification, DMPP, N₂O, nitrification

Introducción

El óxido nitroso (N_2O) es un gas con efecto invernadero con un poder de calentamiento 297 veces superior al CO_2 (IPCC, 2001). Se estima que el 70 % del N_2O emitido por la biosfera a la atmósfera proviene del suelo (Bouwman, 1996). La agricultura contribuye con un 65-80 % del N_2O antropogénico y la dinámica de su producción está determinada en gran medida por la fertilización nitrogenada.

La producción de N_2O ocurre básicamente en los procesos microbianos de nitrificación y desnitrificación. La nitrificación es un proceso aeróbico en el que el amonio es oxidado por bacterias hasta nitrato pasando previamente por nitrito. La desnitrificación es un proceso microbiano anaeróbico en el que el carbono orgánico es usado como fuente de energía y el nitrato es el aceptor de electrones que se reduce a NO , N_2O y N_2 .

En el cultivo de arroz el fertilizante nitrogenado aplicado se pierde además de por nitrificación-desnitrificación, por procesos fisicoquímicos como volatilización y lavado. En un ensayo realizado en la Estación Experimental de Paso de la Laguna- INIA Treinta y Tres con fertilizante enriquecido en ^{15}N se estimaron pérdidas del 57 % cuando el N se aplicaba en una dosis a la siembra (Irisarri *et al.*, 2007). Cassman *et al.* (1998) citan estudios hechos en arrozales tropicales donde la mayoría de las pérdidas gaseosas provenían de la volatilización de amonio mientras que las de N_2O eran menores. Sin embargo, en las condiciones del cultivo en Uruguay, Tarlera *et al.*, (2006) sugieren que la nitrificación en el período previo a la inundación podría ser importante.

Müller *et al.* (2004) encontraron que las pérdidas de N_2O de los suelos ocurren principalmente después de la fertilización y durante un período de unos 10 días, lo que coincidiría en el cultivo de arroz con el período previo a la inundación si el fertilizante se aplica a la siembra. Después, las condiciones de anegamiento, probablemente inducirían la reducción del N_2O a N_2 por desnitrificación (Granli y Bockman, 1994). La mayor actividad nitrificadora en suelos cultivados con arroz transplantado en el trópico, se ha encontrado al macollaje y en la fracción superficial del suelo (2-5 mm superiores) (Nicolaisen *et al.*, 2004).

Para aumentar la capacidad de retención de N se ha propuesto agregar al fertilizante un inhibidor de la nitrificación, compuesto que entelentece la oxidación de NH_4^+ a NO_2^- en el suelo por un cierto período porque inhibe las actividades de las bacterias del género *Nitrosomonas*. Como el NO_2^- y el NO_3^- son compuestos claves en el proceso que lleva a la pérdida final de N

vía desnitrificación (en forma de N_2 y N_2O) y lixiviación, los inhibidores de la nitrificación pueden reducir los problemas ambientales y al mismo tiempo aumentar la eficiencia de la fertilización nitrogenada (Pasda *et al.*, 2001). Algunos de los denominados fertilizantes “de liberación lenta” tienen un inhibidor de la nitrificación incorporado en su formulación. Son presentados en forma granulada para ser fácilmente disueltos con la lluvia, dando lugar a un mosaico de concentraciones tanto del compuesto inhibidor como de NH_4^+ . De este modo, se disminuyen las pérdidas por volatilización de NH_4^+ , que ha sido reportado como el principal mecanismo de pérdida de fertilizante para el cultivo de arroz inundado (Freney *et al.*, 1990; Aulakh *et al.*, 1992).

El 3,4-dimetilpirazol fosfato (DMPP) es un inhibidor de la nitrificación que se ha encontrado disminuye las emisiones de N_2O (Linzmeier *et al.*, 2001) y que aumenta el rendimiento en cultivos de arroz entre otros (Pasda *et al.*, 2001).

En nuestro país, ensayos exploratorios de campo realizados en la zafra 2001-2002 en la Unidad Experimental Paso de la Laguna- INIA Treinta y Tres, empleando dos fuentes de N de liberación lenta comparadas con urea tuvieron resultados alentadores (Deambrosi y Méndez, 2002). Uno de los fertilizantes utilizados fue el ENTEC (marca registrada por BASF) que contiene DMPP. El % de N total absorbido por la planta debido al N aplicado fue mayor cuando se usó ENTEC al 75 % de la dosis recomendada comparado con el uso de urea.

Los objetivos de este trabajo fueron evaluar el efecto de un fertilizante con un inhibidor de la nitrificación (DMPP) sobre el rendimiento de arroz y las emisiones de N_2O del suelo, así como determinar la contribución relativa de la desnitrificación y de la nitrificación a la producción de N_2O .

Materiales y métodos

El ensayo se realizó en invernáculo con arroz (*Oryza sativa* L.) variedad INIA Olimar que se sembró en macetas con suelo proveniente de la Estación experimental Paso de la Laguna del INIA Treinta y Tres. El suelo Solod melánico tenía las siguientes características: pH 5,2; M.O. 2,9; P Bray 7,2 ppm y K 0,28 meq/100g.

Se realizaron 3 tratamientos: 1) control sin fertilización, 2) tres dosis sucesivas de 20 kg N.ha⁻¹ de urea (a la siembra, macollaje y primordio floral), 3) dosis única de ENTEC de 60 kg N a la siembra. El inicio de macollaje (aplicación de la segunda dosis de urea) fue 28 días después de la siembra y el primordio floral (aplicación de la tercera dosis) fue 58 días después de la siembra.

El fertilizante ENTEC26 contiene 26 % N (27 % nítrico y 73 % amoniacal), 32,5 % SO_3 y dimetil pirazol fosfato (DMPP) como principio activo inhibidor de la nitrificación.

Las macetas se colocaron de a tres, en cajones de plástico que se inundaron 30 días después de la siembra (inicio del macollaje). Los cajones se colocaron al azar y se rotaron periódicamente para que todos los tratamientos recibieran la misma cantidad de luz. Se usaron seis repeticiones (macetas) por tratamiento.

Determinación de N_2O emitido por el suelo

El N_2O se midió en distintos momentos del ciclo de cultivo utilizando cámaras cerradas de 23 cm de alto, enterradas 3 cm en el suelo (Figura 1). El extremo superior, abierto al aire, se cerró en cada medición durante una hora con una tapa hermética y a intervalos regulares de 0, 30 y 60 minutos se tomaron muestras de la atmósfera bajo la campana en un tubo al vacío. Se determinó la concentración de N_2O con un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-14B con detector de captura electrónica (columna de Porapak Q, temperaturas de columna, inyector y detector 70° C, 90° C y 300° C) provisto de válvulas de venteo para evitar la interferencia del O_2 y del acetileno. La tasa de emisión de N_2O se corrigió por la temperatura en el momento de muestreo y se calculó según Hutchinson y Mosier (1981).

El flujo de masa neto de N_2O durante un período determinado de tiempo se calculó como el flujo promedio entre 2 fechas de medición multiplicado por el número de días transcurridos (Bowden *et al.*, 1990).

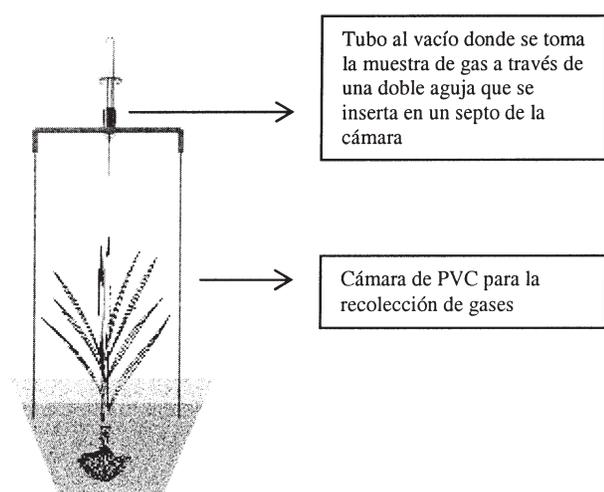


Figura 1. Sistema empleado para la toma de muestras de gases para analizar el flujo de N_2O .

Determinación del aporte de la desnitrificación y la nitrificación a las emisiones de N_2O

El primer paso en la nitrificación autotrófica es catalizado por la enzima amonio monooxigenasa que se inhibe por acetileno a presiones de 0,01-0,1 % (Klemetsson *et al.*, 1988). Por lo tanto, el N_2O producido por la incubación de suelo con acetileno a bajas presiones proviene de la desnitrificación. La tasa de producción por nitrificación puede estimarse como la diferencia entre el N_2O producido por incubación del suelo sin acetileno y con 0,1 % de acetileno. Para determinar si la desnitrificación continúa hasta N_2 se incubó con 5 % de acetileno que inhibe la óxido nitroso reductasa (que cataliza el pasaje de N_2O a N_2). La determinación del N_2O proveniente de la nitrificación y de la desnitrificación se realizó, de acuerdo a estas consideraciones, según Merino *et al.* (2001).

Para esto se tomaron muestras de los 5 cm superficiales del suelo seco en tres momentos del cultivo de arroz (a los 14, 35 y 148 días de la siembra) que se humedecieron en forma homogénea hasta llevarlas a capacidad de campo. Las muestras se incubaron en frascos cerrados a 28° C con 0 %, 0.1 % y 5 % de acetileno durante 24 horas. Se tomaron muestras de los frascos y el óxido nitroso N_2O se midió por cromatografía gaseosa.

Determinaciones analíticas

Para determinar la evolución del nitrógeno mineral en el suelo se tomaron muestras de los 5 cm superiores en los momentos en que se midieron las emisiones de N_2O . La determinación de NO_3^- se realizó siguiendo el método de Cataldo *et al.* (1975) y el amonio se determinó según Mulvaney (1996).

El rendimiento de arroz se determinó como peso seco de grano a la cosecha y el nitrógeno total se analizó por el método de Kjeldahl según Faust *et al.* (1987).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando el procedimiento GLM de Statistical Analysis System (SAS Institute, 2001). La mínima diferencia significativa ($p < 0.05$) se determinó por el test de Tukey.

Resultados y discusión

Efecto del inhibidor de la nitrificación sobre el rendimiento

En el cuadro 1 se presentan los rendimientos de los distintos tratamientos. Los rendimientos de los dos tra-

Cuadro 1. Rendimiento de grano de arroz obtenido con los distintos tratamientos de fertilización.

Tratamiento	Grano [†] (kg ha ⁻¹)
Control	3.800 ± 400 (c)
Urea	6.000 ± 1000 (a)
ENTEC	4.900 ± 500 (a,b)

[†]= corresponde a promedios de seis repeticiones con desvío estándar. Los valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

tamientos fertilizados son significativamente distintos al control pero el rendimiento del tratamiento con ENTEC aplicado a la siembra no es significativamente diferente al obtenido con urea fraccionada, si bien este último fue mayor.

La eficiencia de uso del fertilizante en arroz puede duplicarse con el fraccionamiento (Irisarri *et al.*, 2007). En este caso con la aplicación de una dosis única de ENTEC a la siembra el rendimiento de arroz no fue menor que el obtenido cuando se aplicó urea fraccionada. Como el fertilizante con inhibidor de la nitrificación es más caro que la urea, su empleo podría justificarse en caso de aplicarse con la siembra y, por lo tanto, disminuir el costo de las distintas aplicaciones que, en general, se realizan con avión (Deambrosi E., com pers).

Emisiones de N₂O por el suelo

Los resultados de las determinaciones de flujo de emisión de N₂O se presentan en la figura 2. Las diferencias no son significativas entre los tratamientos, pero hasta los 30 días la tendencia es a menores emisiones en el tratamiento con ENTEC respecto al fertilizado con urea. Debe considerarse además la diferencia de nitrógeno aportado a la siembra en cada tratamiento, 20 kg de N en el tratamiento de urea y 60 kg como ENTEC. La alta variabilidad en la medición de las emisiones, que ha sido comunicada por varios autores (Petersen, 1999; Flessa *et al.*, 1998), no permitió detectar diferencias entre los tratamientos aunque, contrariamente a lo esperado, el pico máximo de N₂O fue detectado en el tratamiento con ENTEC 35 días después de la siembra, con el cultivo ya inundado (Figura 2).

El agregado de urea a la siembra aumentó el contenido de amonio desde el día 4 (Cuadro 2) indicando ocurrencia de hidrólisis de la urea y posterior disminución rápida del amonio al tiempo que aumentaba la concentración de nitrato (nitrificación). Los valores de N

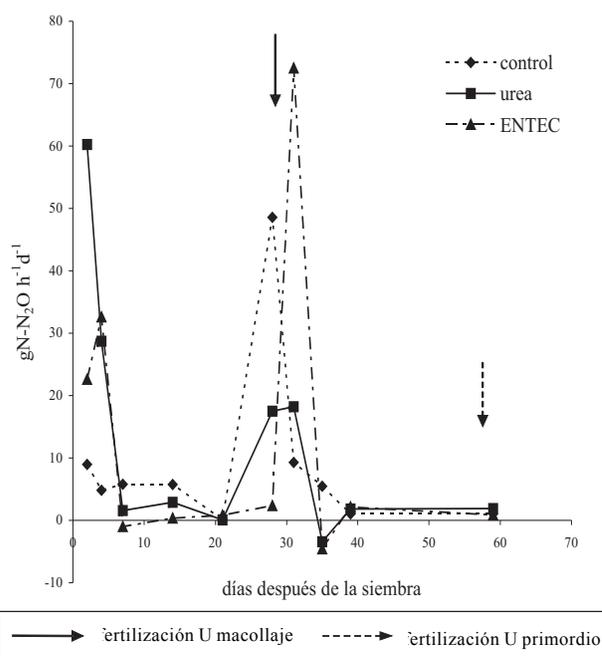


Figura 2. Evolución del flujo de N₂O hasta los 60 días de sembrado el arroz para los distintos tratamientos de fertilización.

mineral en el suelo control son difíciles de explicar, pero debe considerarse que las muestras analizadas fueron tomadas de los 5 cm superiores por lo que pueden no representar adecuadamente lo que ocurre en el perfil del suelo.

Aproximadamente desde 10 días después de establecida la inundación, coincidiendo con la disminución de nitrato en el suelo (Figura 3) y el aumento de la concentración de amonio (Cuadro 2), las emisiones son muy bajas en todos los tratamientos (Figura 2).

Cuadro 2. Contenido de amonio en el suelo durante los primeros 60 días del cultivo de arroz bajo diferentes tratamientos de fertilización.

Días	Amonio (μg g ⁻¹)		
	Control	Urea	ENTEC
0	7	7	7
4	115	154	338
14	11	34	127
23	6	8	45
59	63	37	69

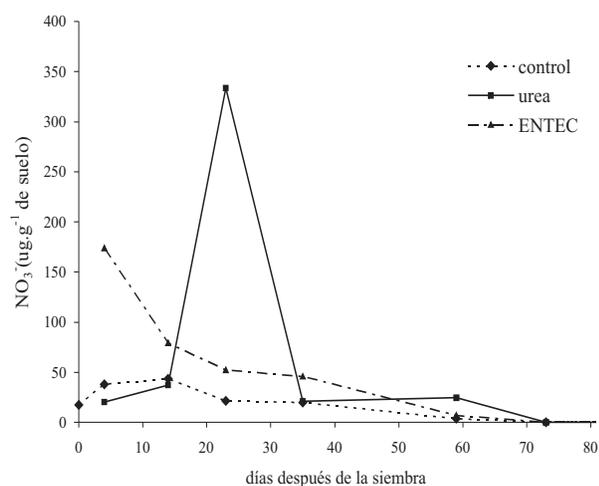


Figura 3. Evolución del contenido de nitrato en el suelo durante el ciclo de cultivo.

A los 14 días la cantidad de nitrato en el suelo (Figura 3) no es estadísticamente diferente entre tratamientos, pero a los 23 días el tratamiento con ENTEC evidencia una menor concentración de nitrato que el de urea, a consecuencia de la presencia del inhibidor de la nitrificación. La concentración de nitrato es menor en ese tratamiento hasta los 30 días luego de la siembra. A los 4 días el nitrato en el tratamiento con ENTEC es mayor debido a que contiene nitrato en su composición.

No se encontró correlación entre el nitrato del suelo (Figura 3) y el flujo de N₂O (Figura 2). La emisión de N₂O depende del nitrato presente en el suelo pero es influenciada por múltiples factores y una correlación simple no explica adecuadamente todos los procesos involucrados (Lark *et al.*, 2004). Otra posible explicación para la falta de correlación entre nitrato y flujo de N₂O es que el suelo emite también nitrógeno bajo forma de N₂ y de NO.

En la figura 4 se muestran los flujos acumulados de N₂O durante los primeros 35 días del cultivo lo que coincide con los mayores flujos de este gas. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos por lo que la aplicación de urea fraccionada (hasta esa fecha se habían realizado 2 fertilizaciones) y el ENTEC (con inhibidor de la nitrificación) no aumentaron las emisiones respecto al control sin fertilizar. El fraccionamiento de la urea sería adecuado a los requerimientos del cultivo y, por lo tanto, el nitrógeno mineral del suelo no estaría en exceso como para sufrir procesos de nitrificación o desnitrificación que originan las pérdidas de N₂O. La dosis de N aplicada como ENTEC

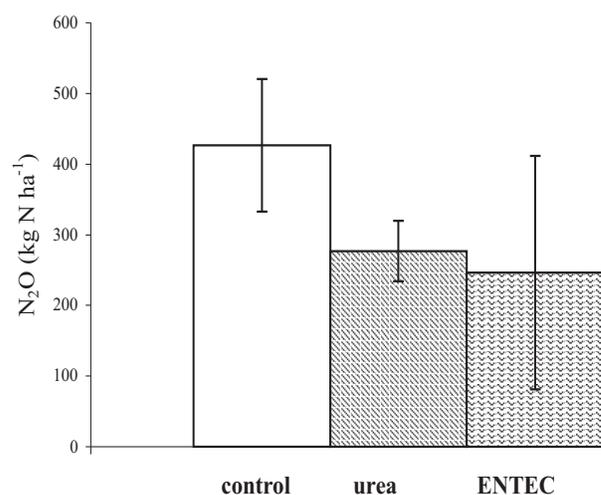


Figura 4. Flujo neto de N₂O acumulado durante los 35 días iniciales del cultivo.

Las barras representan los desvíos estándar. No hay diferencias significativas entre tratamientos.

(60 kg) era mayor hasta ese momento que la de urea (40 kg) y, por lo tanto, el tratamiento con ENTEC presentó menores emisiones de N₂O que el de urea por unidad de N aplicada, sin considerar el control que tuvo un rendimiento menor de arroz.

Cabe señalar sin embargo, que en los tratamientos control y ENTEC la mayor parte de las emisiones de N₂O corresponden a un único pico de emisión (Figura 2).

Aporte de la desnitrificación y la nitrificación a las emisiones de N₂O

Los ensayos de laboratorio para determinar si el N₂O provenía de la nitrificación o de la desnitrificación evidenciaron diferencias (p=0.01) entre algunos tratamientos a los 14 y a los 35 días después de la siembra (Figuras 5 y 6).

A 14 días de la siembra se registró emisión de N₂O tanto por nitrificación como por desnitrificación en todos los tratamientos y no hubo diferencias en el N₂O total emitido (Figura 5). La desnitrificación ocurrió solamente hasta óxido nitroso ya que cuando se inhibió la enzima que cataliza el pasaje a N₂, no se detectó mayor producción de N₂O. En el tratamiento con fertilizante con inhibidor de la nitrificación (ENTEC) la nitrificación fue menor que la desnitrificación, mientras que al N₂O emitido por el control y el tratamiento fertilizado con urea contribuyeron igualmente nitrificación y desnitrificación. Como este ensayo se realizó en el laboratorio a capacidad de campo se esta-

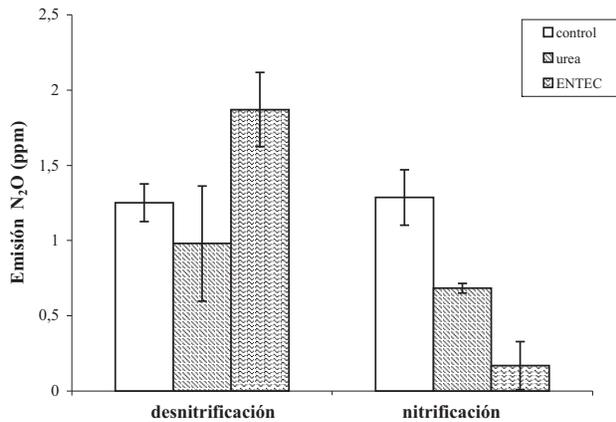


Figura 5. Producción de N₂O del suelo por desnitrificación y nitrificación a los 14 días de la siembra.

Las barras representan los desvíos estándar.

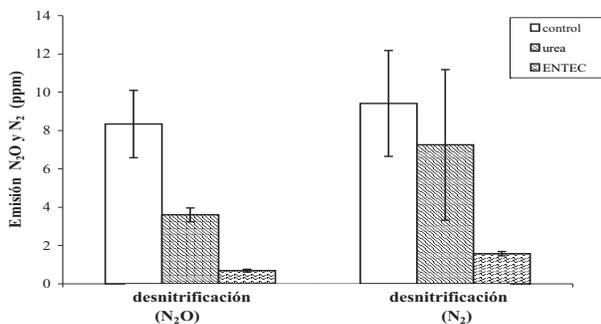


Figura 6. Producción de N₂O y N₂ del suelo por desnitrificación a los 35 días de la siembra.

Las barras representan los desvíos estándar.

ría midiendo desnitrificación que puede no ocurrir en las condiciones redox del campo en esa etapa del cultivo. Emisiones similares de N₂O para los tratamientos control y urea pueden explicarse por iguales concentraciones de nitrato en el suelo en ese momento. Estudios en arrozales tropicales (Ghosh *et al.*, 2003) demostraron por el contrario que la fertilización con urea aumenta la población de microorganismos nitrificantes. Nicolaisen *et al.* (2004) señalan que las pérdidas por nitrificación- desnitrificación acopladas son menos del 10 % del N tomado por la planta y que una posible pérdida significativa de N debida a esos procesos solo puede esperarse cuando el sistema radicular no está desarrollado y la planta no compete adecuadamente por el nitrato del suelo.

La menor contribución de la nitrificación al N₂O emitido a los 14 días en el tratamiento con ENTEC (Figura 5), comprobó el efecto de bloqueo del primer paso de la oxidación de amonio a nitrito en las bacterias autótrofas oxidadoras de amonio. No hay que descartar, sin embargo, que una parte de lo que se consideró emisiones provenientes de la desnitrificación, se originen por nitrificación heterotrófica que, para inhibirse completamente, necesita concentraciones de acetileno mayores a 0.1 % (Daum *et al.*, 1998). En las condiciones de invernáculo no se permitió que el suelo se secase mediante riegos en la etapa previa a la inundación, por lo que podría estarse subestimando la nitrificación que ocurriría en el campo en suelo seco.

A los 35 días en cambio, con el cultivo ya inundado y en activo macollaje, no se detectó nitrificación en ningún tratamiento y en todos los casos la desnitrificación prosiguió en parte hasta N₂ (Figura 6). La menor desnitrificación correspondió al tratamiento con ENTEC y los otros 2 tratamientos emitieron más N₂O por desnitrificación que a los 14 días de la siembra.

Hay evidencias de que cantidades importantes de fertilizante se pierden vía desnitrificación en suelos subtropicales semiáridos bajo inundación (Aulakh *et al.*, 1992). A diferencia de lo que ocurre en nuestro caso, en esos suelos el bajo contenido en C orgánico afecta la desnitrificación aún en presencia de nitrato.

A la cosecha (148 días) todo el óxido nitroso proviene de la desnitrificación, ya que el valor de N₂O medido al inhibir la nitrificación era igual al total (sin inhibir) y no se observaron diferencias entre tratamientos, con una media de 1,1 ppm de N₂O emitido (datos no mostrados). La desnitrificación no proseguía hasta N₂ probablemente debido a que previo a la cosecha se dejó de regar. Wrage *et al.*, (2004) comunicaron que en condiciones de saturación no se logra efectividad en la inhibición de la N₂O reductasa con 5 % de acetileno por problemas de difusión, así que estos resultados pueden haber subestimado las emisiones como N₂. Estos ensayos de nitrificación- desnitrificación con inhibición por acetileno nos dan una fotografía instantánea y problemas metodológicos con la inhibición a distintas concentraciones de acetileno deben relativizar la interpretación de los procesos productores de N₂O.

Las muestras se tomaron de los 5 cm superficiales del suelo asumiendo que después de la aplicación del fertilizante los flujos de N₂O derivan de procesos microbianos en la capa superficial del suelo donde permanece la mayor parte del N mineral aplicado. Esto pudo no reflejar adecuadamente todos los procesos que estaban ocurriendo ya que se ha comunicado una alta

tasa de nitrificación a profundidades entre 5 y 25 cm en suelos secos (Müller *et al.*, 2004).

Aunque las emisiones de N₂O de cultivos de arroz inundado no se consideran muy importantes, ya que el N₂O se reduciría rápidamente a N₂ en condiciones anaeróbicas, debe tenerse en cuenta que los primeros centímetros de suelo y la zona alrededor de las raíces son parcialmente aeróbicas aún bajo inundación.

Conclusiones

En este trabajo, bajo las condiciones controladas del invernáculo, no se observaron flujos mayores de N₂O después de más de una semana de instalada la inundación. El fertilizante con el inhibidor de la nitrificación DMPP produjo menor concentración de nitrato en el suelo y una menor emisión de N₂O hasta los 30 días después de la siembra. Sin embargo, las emisiones de N₂O acumuladas no fueron afectadas por los tratamientos. A los 35 días de cultivo y a la cosecha todo el N₂O provenía de la desnitrificación en todos los tratamientos mientras que tanto nitrificación como desnitrificación fueron fuentes de N₂O cuando el cultivo no estaba anegado.

Los resultados indicarían que las emisiones de N₂O en el cultivo de arroz en estas condiciones estarían dirigidas principalmente por procesos reductivos en el suelo aunque se necesitan estudios más exhaustivos para explorar la importancia de los procesos de nitrificación-desnitrificación en este ecosistema.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica – Sector Productivo (UdelaR). Agradecemos a W. Ibáñez por el asesoramiento en el análisis estadístico.

Bibliografía

- Aulakh, M. S.; Doran, J. W. and Mosier, R.** 1992. Soil denitrification- Significance, measurements, and effects of management. *Adv. Soil Sci.* 18:1-57.
- Bouwman, A. F.** 1996. Direct emission of nitrous oxide from agricultural soils. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 46:53-70.
- Bowden, R. D.; Melillo, J. M.; Steudler, P. A. and Aber, J. D.** 1990. Annual nitrous oxide fluxes from temperate forest soils in the northeastern United States. *J. Geophys. Res.* 95:13997-14005.
- Cataldo, D.; Haroon, M.; Scharader, L. and Youngs, V.** 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Com. Soil Sci. Plant Annal.* 6:71-80.
- Cassman, K. G.; Peng, S.; Olk, D. C.; Ladha, J. K.; Reichardt, W.; Dobermann, A. and Singh, U.** 1998. Opportunities for increased nitrogen-use efficiency from improved resource management in irrigated rice systems. *Field Crops Res.* 56:7-39.
- Daum, M.; Zimmer, W.; Papen, H.; Kloos, K.; Nawrath, K. and Bothe, H.** 1998. Physiological and molecular biological characterization of ammonia oxidation of the heterotrophic nitrifier *Pseudomonas putida*. *Curr. Microbiol.* 37: 281-288.
- Deambrosi, E. y Méndez, R.** 2002. Evaluación de Fuentes de nitrógeno de liberación lenta. Capítulo 3 – Manejo de Suelos – Nutrición. INIA Treinta y Tres. ARROZ – Resultados Experimentales 2001 – 2002. pp. 5 – 7.
- Faust, H.; Sebastianelli, J.A. and Axmann, H.** 1987. Manual de laboratorio, métodos para el análisis de ¹⁵N. FAO/OIEA. Viena.
- Flessa, H.; Wild, U.; Klemisch, M. and Pfadenhauer, J.** 1998. Nitrous oxide and methane fluxes from organic soils under agriculture. *Eur. J. Soil Sci.* 49:327-335.
- Freny, J. R.; Trevitt, A. C. F.; De Datta, S. K.; Obcemea, W. N. and Real, J. G.** 1990. The interdependence of ammonia volatilization and denitrification as nitrogen loss processes in flooded rice fields in the Philippines. *Biol Fertil. Soils* 9:31-36.
- Ghosh, P. and Kashyap, A. K.** 2003. Effect of rice cultivars on rate of N-mineralization, nitrification and nitrifier population size in an irrigated rice ecosystem. *Appl. Soil Ecol.* 24:27-41.
- Granli, T. and Bockman, O. C.** 1994. Nitrous oxide from agriculture. *Nor. J. Agric. Sci. (Suppl. 12)* Agricultural University of Norway, Advisory Service, As, Norway.
- Hutchinson, G. and Mossier, A.** 1981. Nitrous oxide emissions from cropped fields. *J. Environ. Qual.* 10:169-173.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC).** 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 (UK), 881pp.
- Irisarri, P.; Gonnet, S.; Deambrosi, E. and Monza, J.** 2007. Cyanobacterial inoculation and nitrogen fertilization in rice. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23:237-242.
- Klemetsson, L.; Svensson, B. and Rosswall, T.** 1988. A method of selective inhibition to distinguish between nitrification and denitrification as sources of nitrous oxide in soil. *Biol. Fertil. Soils* 6:112-119.
- Kumar, U.; Jain, M. C.; Pathak, H.; Kumar, S. and Majumdar, D.** 2000. Nitrous oxide emission from different fertilizers and its mitigation by nitrification inhibitors in irrigated rice. *Biol. Fertil. Soils* 32: 474-478.

- Lark, R.M.; Milne, A.E; Addiscott, T.M.; Goulding, K.W.T.; Webster, C.P. and O'Flaherty, S.** 2004. Scale and location dependent correlation of nitrous oxide emissions with soil properties: an analysis using wavelets. *Eu. J. Soil Sci.* 55:611-627.
- Linzmeier, W.; Gutser, R. and Schmidhalter, U.** 2001. Nitrous oxide emissions from soil and from a nitrogen-15-labelled fertilizer with the new nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP). *Biol. Fertil. Soils* 34:103-108.
- Merino, P.; Estavillo, J. M.; Besga, G.; Pinto, M. and González-Murua, C.** 2001. Nitrification and denitrification derived N₂O production from a grassland soil under application of DCD and Actilith F2. *Nutr.Cicl.Agrossystem* 60:9-14.
- Müller, C.; Stevens, R. J.; Laughlin, R. J. and Jäger, H. J.** 2004. Microbial processes and the site of N₂O production in a temperate grassland soil. *Soil Biol Biochem.* 36:453-461.
- Mulvaney, R. L.** 1996. Nitrogen - inorganic forms. En: *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods.* D.L. Sparks *et al.* (Eds.) ASA and SSSA, Madison WI. p 1123-1184.
- Nicolaisen, M.H.; Risgaard-Petersen, N.; Revsbech, N. P.; Reichardt, W. and 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.
- Pasda, G.; Händel, R. and Zerulla, W.** 2001. Effect of fertilizers with the new nitrification inhibitor DMPP on yield and quality of agricultural and horticultural crops. *Biol. Fertil. Soils* 34:85-97.
- Petersen, S. O.** 1999. Nitrous oxide emissions from manure and inorganic fertilizers applied to spring barley. *J. Environ. Qual.* 28: 1610-1618.
- SAS Institute.** 2001. SAS system for Windows. Release 8.02. SAS Inst., Cary, NC.
- Tarlera, S.; Gonnet, S.; Irisarri, P.; Menes, J.; Fernández, A.; Paolino, G.; Travers, D. y Deambrosi, E.** 2005. Nitrification and denitrification associated with N₂O production in a temperate N-fertilized irrigated Uruguayan ricefield. En: *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology.* Ed. A. Méndez Vilas Wiley-VHC, eds. Weinheim pp.416-420.
- Wrage, N.; Velthof, G. L.; Laanbroek, H. J. and Oenema, O.** 2004. Nitrous oxide production in grassland soils: assessing the contribution of nitrifier denitrification. *Soil Biol. Biochem.* 36: 229-236.