

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS  
ESCUELA DE AGRONOMÍA

**Evaluación del efecto de la fertilización nitrogenada y de un inhibidor de la nitrificación, sobre las emisiones de óxido nitroso en un Andisol dedicado a la ganadería de leche, bajo condiciones controladas.**

Mayela María Monge Muñoz

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE PROFESIONAL DE INGENIERA AGRÓNOMA  
CON EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA

2018

**Evaluación del efecto de la fertilización nitrogenada y de un inhibidor de la nitrificación, sobre las emisiones de óxido nitroso en un Andisol dedicado a la ganadería de leche, bajo condiciones controladas.**

Mayela María Monge Muñoz

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE PROFESIONAL DE INGENIERA AGRÓNOMA  
CON EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS  
ESCUELA DE AGRONOMÍA

2018

Evaluación del efecto de la fertilización nitrogenada y de un inhibidor de la nitrificación,  
sobre las emisiones de óxido nitroso en un Andisol dedicado a la ganadería de leche,  
bajo condiciones controladas.

Mayela María Monge Muñoz

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE PROFESIONAL DE INGENIERA AGRÓNOMA  
CON EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA

\_\_\_\_\_  
M.Sc. Ana Gabriela Pérez Castillo

DIRECTORA DE TESIS

\_\_\_\_\_  
Dra. Cristina Chinchilla Soto

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

\_\_\_\_\_  
Dr. Carlos Henríquez Henríquez

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

\_\_\_\_\_  
M.Sc. Eloy Molina Rojas

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

\_\_\_\_\_  
Dr. Luis Gómez Alpízar

DIRECTOR DE ESCUELA

\_\_\_\_\_  
Mayela María Monge Muñoz

SUSTENTANTE

2018

## **Dedicatoria**

*A mis padres, Rafael y Cecilia.*

## **Agradecimientos**

A mis padres y mi hermana Grettel, que de una u otra forma me apoyaron siempre.

A Jeremy por estar ahí, por su apoyo y motivación.

A a la M.Sc. Ana Gabriela, por su acompañamiento, dedicación y entusiasmo, por sus consejos académicos y personales, que me han ayudado a crecer.

A la Dra. Cristina, por su aporte a este proyecto, sus consejos prácticos, y la motivación que siempre me brindó.

Al M.Sc. Ronny Barboza por su colaboración e interés en el proyecto.

Al Dr. Carlos Hernández y al Msc. Eloy Molina, por formar parte del comité, por su disposición y valiosos aportes durante la revisión de este trabajo.

Al CICA y a todo su personal, por brindarme el espacio y el apoyo para desarrollar el proyecto.

Al OIEA y la FAO por el financiamiento del proyecto.

Y a todos los que colaboraron de una u otra forma,

Muchas gracias.

## CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vi
1 Resumen	1
2 Introducción	2
3 Objetivos	5
3.1 Objetivo general.....	5
3.2 Objetivos específicos .....	5
4 Revisión de literatura	6
4.1 Ciclo del nitrógeno.....	6
4.2 El óxido nitroso y sus mecanismos de generación .....	7
4.3 Acción de los inhibidores de la nitrificación .....	11
4.4 Nitrapirina y otros inhibidores de la nitrificación.....	12
4.5 Eficiencia en el uso del fertilizante nitrogenado.....	14
5 Materiales y Métodos	16
5.1 Suelo y establecimiento de ensayo en invernadero.....	16
5.2 Tratamientos .....	17
5.3 Diseño experimental .....	18
5.4 Humedad del suelo.....	19
5.5 Control del espacio poroso lleno de agua .....	19
5.6 Análisis de nitrógeno inorgánico .....	20
5.7 Medición de flujo de N <sub>2</sub> O y señal isotópica de <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O.....	20

5.8	Cálculo del flujo y de las emisiones acumuladas de N <sub>2</sub> O.....	22
5.9	Cálculo de porcentaje de <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O originado a partir del fertilizante .....	23
5.10	Análisis de la eficiencia en el uso del fertilizante nitrogenado.....	24
5.11	Análisis estadístico de resultados .....	25
6	Resultados y discusión	26
6.1	Características del suelo.....	26
6.2	Análisis del nitrógeno inorgánico .....	26
6.3	Variación temporal de las emisiones de N <sub>2</sub> O .....	30
6.4	Emisiones acumuladas de N <sub>2</sub> O .....	32
6.5	Porcentaje de emisiones de óxido nitroso originadas del fertilizante .....	34
6.6	Uso eficiente del fertilizante nitrogenado .....	36
7	Conclusiones	38
8	Recomendaciones	39
9	Literatura citada	40
10	Anexos	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo del nitrógeno en pasturas.....	7
Figura 2. Mecanismos de formación del N <sub>2</sub> O luego del ingreso de urea al suelo.....	8
Figura 3. Múltiples mecanismos de formación del N <sub>2</sub> O en el suelo .....	9
Figura 4. Etapa del proceso de nitrificación afectada por la adición de un inhibidor de la nitrificación como la nitrapirina. ....	12
Figura 5. Equipo utilizado para la medición de gases.....	21
Figura 6. Gráfico de “Keeling Plot” para el cálculo de la firma isotópica del <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O.....	23
Figura 7. Nitrógeno disponible en el suelo en forma de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> y NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	27
Figura 8. Flujo promedio de emisiones de N-N <sub>2</sub> O.....	31
Figura 9. Emisiones acumuladas de N - N <sub>2</sub> O.....	33
Figura 10. Porcentaje de <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O originado a partir del fertilizante .....	35

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos aplicados.....	17
Cuadro 2. Propiedades químicas del suelo .....	26
Cuadro 3. Porcentaje de eficiencia en el uso del nitrógeno.....	36

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Cálculos para dosificación de Urea.....	47
Anexo 2. Cálculos para dosificación de Urea.....	47
Anexo 3. Hoja de Cálculo para “Análisis de Datos Picarro G5102-i” .....	49

## 1 Resumen

La aplicación de fertilizantes, usualmente urea, en fincas lecheras intensivas conlleva el riesgo de la liberación de óxido nitroso ( $N_2O$ ) al ambiente. Factor de preocupación ambiental por su naturaleza de gas con efecto invernadero (GEI) y agronómica, por la reducción que podría generar sobre la eficiencia en el uso del nitrógeno (EUN). Para minimizar las pérdidas de nitrógeno (N) producto de la nitrificación ya sea como  $N_2O$  o por lixiviación han aparecido en el mercado inhibidores de la nitrificación como la nitrapirina. En un ensayo en invernadero, se trató un Andisol, con urea enriquecida con  $^{15}N$ , al 1% y 2% átomos en exceso, a 65 y 129 mg N  $kg_{ss}^{-1}$ , con y sin el inhibidor de la nitrificación nitrapirina. Se cuantificaron los cambios en el N inorgánico, las pérdidas de N como  $N_2O$  y la eficiencia en el uso del nitrógeno. No hubo una reducción significativa de las emisiones de  $N_2O$  cuando se aplicó 65 mg N  $kg_{ss}^{-1}$ , equivalente a una dosis de 42 kg N  $ha^{-1}$ , en contraste, si se observó una reducción en dichas emisiones al aplicar 129 mg N  $kg_{ss}^{-1}$ , equivalente a una dosis de 84 kg N  $ha^{-1}$ . De acuerdo con la eficiencia en el uso del nitrógeno, los resultados indican que la nitrapirina no es una opción de mitigación viable para la liberación de  $N_2O$  a una dosis de N equivalente a 42 kg N  $ha^{-1}$ , en un suelo con un pH de 5.9 y un contenido de materia orgánica de 7.8%.

## 2 Introducción

En Costa Rica, las fincas agropecuarias suman 2 406 418 hectáreas, de las cuales 43% se dedican a la producción ganadera. Además, 25,6% del total del hato bovino nacional se destina a la producción lechera (CORFOGA, 2015). Mayoritariamente, en la actividad lechera de la región central, el ganado se maneja con una permanencia de medio a un día en cada potrero y un período de descanso de 28 a 35 días (MAG, 2008), con pastos como el *Cynodon nlemfuensis* (nombre común: Estrella Africana), que se caracteriza por su alto rendimiento y resistencia al pastoreo (Nilson *et al.*, 2005).

La ganadería de leche intensiva, cuya alimentación se basa en el pastoreo, conlleva una alta extracción de biomasa, lo que provoca la salida de nutrientes del suelo y, requiere la aplicación de fertilizantes para suplir y compensar estas salidas (Villalobos y Arce, 2014). La aplicación intensiva de fertilizantes nitrogenados, práctica comúnmente utilizada, junto con las excretas de animales, originan una saturación de N cuando las plantas, microorganismos y suelos ya no pueden asimilar ni retener el exceso de N, lo que provoca pérdidas al ambiente por lixiviación de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y emisiones de gases convirtiéndose en una preocupación en el ámbito agronómico y ambiental (Saggar *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2017).

En los sistemas lecheros costarricenses se aplican de 200 a 500 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> mayoritariamente como urea (Montenegro y Abarca, 2002) luego del pastoreo y principalmente, durante la época lluviosa (de 6 a 8 meses).

Los estudios de emisiones de óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) son muy limitados en fincas ganaderas de Costa Rica. Lo anterior, a pesar de que se reconoce que son afectadas en gran medida por el ingreso del N a través de los fertilizantes nitrogenados y la orina del ganado y varían significativamente con las características del suelo y las condiciones climatológicas (CORFOGA, 2013). Montenegro y Abarca (2002) realizaron un balance de emisiones de gases con efecto invernadero (GEI) en sistemas silvopastoriles. Ellos encontraron que las emisiones de GEI fueron mayores que el carbono (C) fijado en conjunto por el suelo y el componente arbóreo. Montenegro y Herrera (2013) investigaron la emisión de N<sub>2</sub>O, derivada de la aplicación de un fertilizante nitrogenado de lenta liberación en pasto kikuyo. Ellos determinaron que, en fincas lecheras con manejo intensivo, el uso de un fertilizante nitrogenado de lenta liberación redujo la emisión de N<sub>2</sub>O y, señalan que podría ser una estrategia a considerar si se intentara diferenciar la producción ganadera nacional como baja en carbono.

Actualmente, el mercado ofrece fertilizantes nitrogenados con inhibidores de la nitrificación bajo la promesa de una óptima utilización del fertilizante aplicado. Estos productos, al reducir las pérdidas de N por lixiviación y por desnitrificación, podrían incrementar la productividad y reducir a la vez los efectos negativos sobre el ambiente (Ruser y Schulz, 2015; Alonso-Ayuso *et al.*, 2016).

En un ensayo de campo realizado<sup>1</sup> en un Andisol costarricense dedicado a la ganadería de leche, con *Cynodon nlemfuensis* como pasto dominante, fueron cuantificadas las emisiones de N<sub>2</sub>O que acompañaron la fertilización con urea con y sin nitrapirina (NI), un inhibidor de la nitrificación. Experimento que, contrario a otros reportes de la literatura

---

<sup>1</sup> Pérez *et al.* 2018. Nitrapyrin did not affect yield-scaled nitrogen gaseous emissions in a tropical grassland. Sometida a Pedosphere.

(Ruser y Schulz, 2015), no mostró una reducción significativa sobre las emisiones acumuladas de  $N_2O$  cuando se aplicaron  $250 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  con una dosis de  $882 \text{ g NI ha}^{-1}$ , distribuidos en 6 aplicaciones de urea con  $5 \text{ L de NI en suspensión acuosa m}^{-2}$ . Como causas de este comportamiento los autores argumentaron: primero, la generación de  $NO_3^-$  a través de procesos que no son inhibidos por la NI, como la nitrificación heterotrófica. Segundo, el bajo excedente de N para que actuara la nitrapirina, debido al fraccionamiento del fertilizante y el uso de una dosis que coincidió estrechamente con las tasas de absorción medidas para el pasto. Tercero, una dosis de nitrapirina insuficiente para retrasar la nitrificación en las condiciones experimentales.

En vista de que varias hipótesis se plantearon para explicar la no reducción significativa de las emisiones de  $N_2O$  cuando se aplicó un inhibidor de la nitrificación como la NI en la fertilización con urea, es necesario profundizar el estudio de este comportamiento. Por ello, en este trabajo se estudian, bajo condiciones controladas, las emisiones de  $N_2O$  al fertilizar un Andisol con urea enriquecida con  $^{15}N$  a la dosis recomendada para compensar la extracción de N por el pasto y el doble de esta dosis. Con el uso del isótopo marcado  $^{15}N$ , se podrá determinar la eficiencia en el uso del fertilizante nitrogenado, y reconocer la fracción del  $N_2O$  emitida por el fertilizante.

En Costa Rica se han realizado pocas investigaciones con el uso de  $^{15}N$  y en particular en estudios para evaluar el efecto de inhibidores de la nitrificación en el uso de fertilizantes nitrogenados sobre las emisiones de  $N_2O$  en ganadería de leche, por lo que este estudio permitirá evaluar si el uso de la NI proporciona o no una opción de mitigación ante el cambio climático.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de un inhibidor de la nitrificación sobre las emisiones de  $N_2O$  al fertilizar con urea un Andisol dedicado a la ganadería de leche costarricense, bajo condiciones controladas.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Evaluar el nitrógeno inorgánico en un Andisol sembrado con pasto, luego de la fertilización nitrogenada con un inhibidor de la nitrificación y su relación con las emisiones de  $N_2O$ .
2. Cuantificar las emisiones de  $N_2O$ , producto de la aplicación de urea y urea más un inhibidor de la nitrificación, en un Andisol sembrado con pasto.
3. Calcular la eficiencia en el uso del nitrógeno, al aumentar la dosis del fertilizante aplicado con un inhibidor de la nitrificación en condiciones controladas, para determinar el efecto del inhibidor sobre dicha eficiencia.

## 4 Revisión de literatura

### 4.1 Ciclo del nitrógeno

El N es un elemento esencial y de los más abundantes de la tierra, se encuentra de diversas formas las cuales cambian de manera constante debido a procesos físicos, químicos y biológicos. Se presenta en los aminoácidos y proteínas, y como N inorgánico en el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), formas absorbibles por las plantas, o bien como amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) y nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) que resultan tóxicos para las plantas.

El N puede ingresar en el suelo desde la atmósfera mediante la deposición seca y húmeda, por fijación y por fertilizantes orgánicos y sintéticos (Verhuls *et al.*, 2015). El ciclo del N, a nivel de suelo, implica una serie de procesos como la fijación, mineralización, nitrificación, desnitrificación y volatilización (Figura 1). De estos procesos ocasionan la salida del N del sistema: la lixiviación de nitratos, la nitrificación y la desnitrificación, vía emisiones gaseosas de  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}$  y  $\text{N}_2$ , y la volatilización de  $\text{NH}_3$  (Hayatsu *et al.*, 2008; Verhuls *et al.*, 2015). Para que ocurran estos procesos de transformación es necesaria la presencia de microorganismos, como los hongos desnitrificantes, las arqueas nitrificantes, las bacterias desnitrificantes aeróbicas y los microorganismos nitrificantes heterotróficos (Hayatsu *et al.*, 2008).

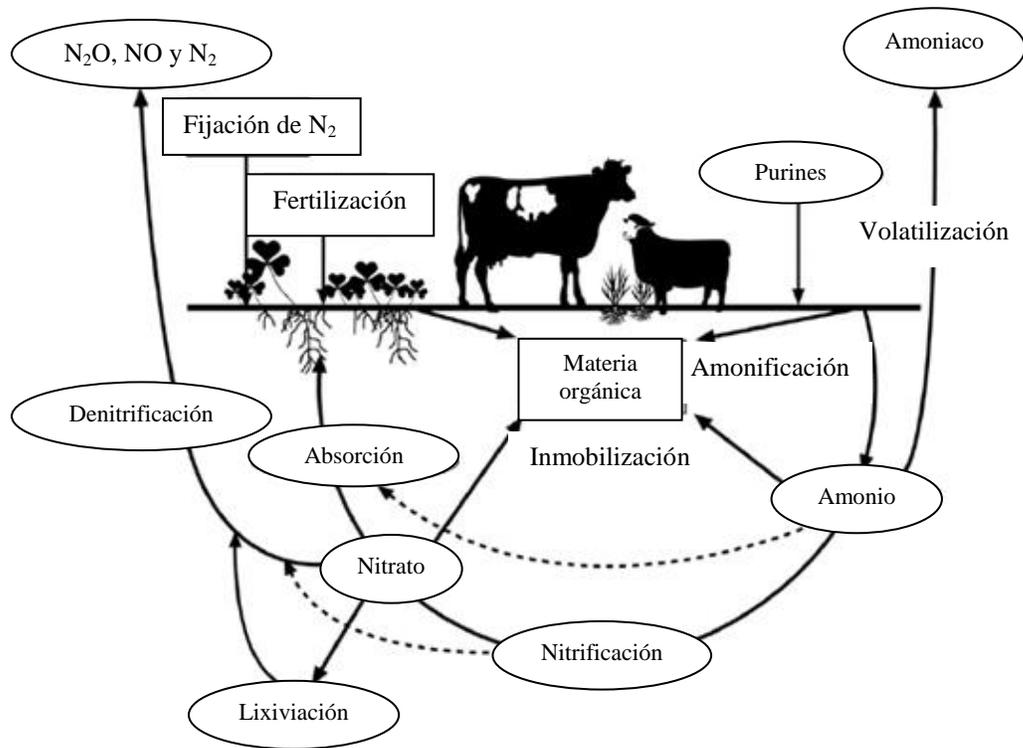


Figura 1. Ciclo del nitrógeno en pasturas. Tomado de Saggar *et al.*, 2013

#### 4.2 El óxido nitroso y sus mecanismos de generación

El  $N_2O$  posee un potencial de calentamiento 265 veces superior a una masa equivalente de  $CO_2$  (al considerar una ventana de tiempo de 100 años), y es un agente importante en la destrucción de la capa de ozono (IPCC, 2014), por ello las pérdidas de N al ambiente como  $N_2O$  son una preocupación.

Los suelos agrícolas son considerados la principal fuente de las emisiones antropogénicas de óxido nitroso ( $N_2O$ ), según Smith *et al.*, (2007), en el 2005 el  $N_2O$  correspondió a 38% del total de las emisiones de gases con efecto invernadero (GEI) distintas al dióxido de carbono ( $CO_2$ ). Las emisiones de  $N_2O$  del sector ganadero están

influenciadas directamente por el ingreso de N a través de los purines, pero también, por la adición de fertilizantes nitrogenados (CORFOGA, 2013).

La adición de fertilizantes nitrogenados, como la urea, altera el ciclo natural del N y, ello repercute en los procesos microbianos y enzimáticos de transformación del N entre los sistemas de suelo, planta y aire (Figura 2). Estos procesos incluyen hidrólisis de la urea, inmovilización del amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), mineralización del N, nitrificación autotrófica, desnitrificación, volatilización de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), fijación de  $\text{NH}_4^+$  y lixiviación de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Zaman *et al.*, 2012).

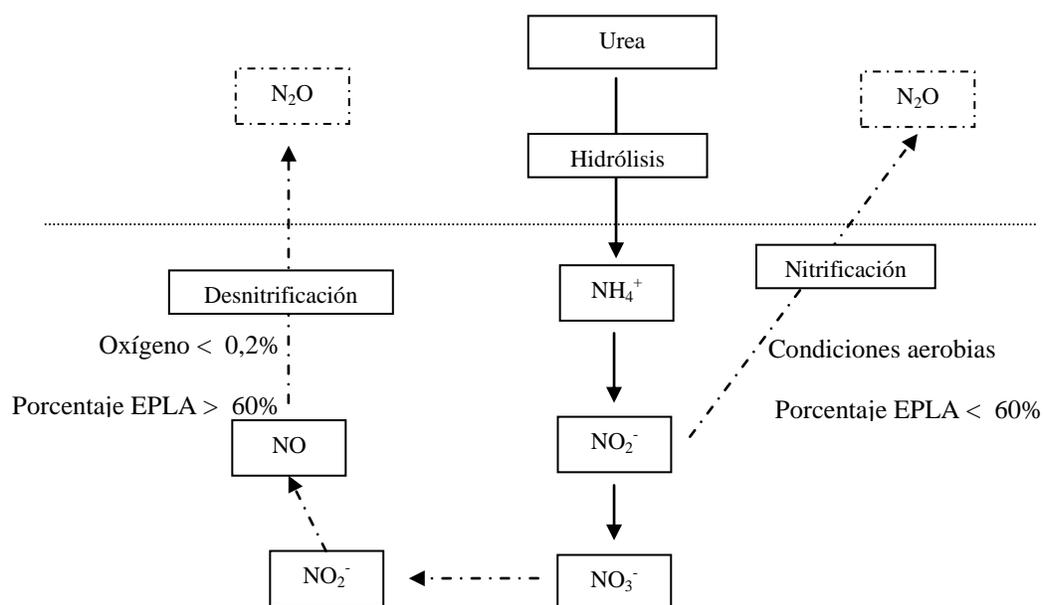


Figura 2. Mecanismos de formación del  $\text{N}_2\text{O}$  luego del ingreso de urea al suelo. Adaptado de Zaman *et al.*, (2012).

Además de la nitrificación autotrófica y la desnitrificación vinculados directamente con el ingreso de N vía fertilización, otros procesos que pueden llegar a ser relevantes en las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  son la nitrificación heterotrófica asociada con la oxidación del N orgánico y la codesnitrificación, una reacción híbrida donde un átomo de N se origina del N

orgánico y el otro de la desnitrificación (Figura 3) (Grosso y Parton, 2011; Müller *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2017).

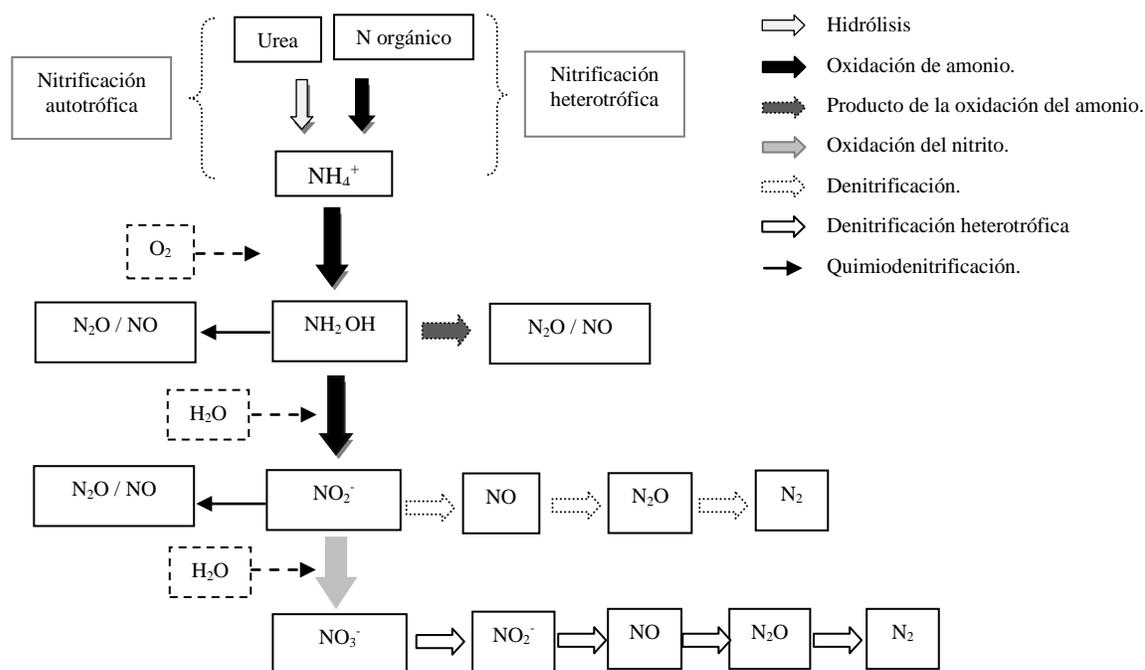


Figura 3. Múltiples mecanismos de formación del  $\text{N}_2\text{O}$  en el suelo. Adaptado de Zhu *et al.*, (2013).

En la nitrificación autotrófica (Figura 3), como primera etapa el  $\text{NH}_4^+$  se oxida a  $\text{NO}_2^-$  mediante la intervención de especies de bacterias principalmente del género *Nitrosomonas* y *Nitrosospira*, mientras que en la segunda etapa, la oxidación de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$  es facilitada principalmente por *Nitrobacter* y *Nitrococcus* (Hayatsu *et al.*, 2008). Adicionalmente, se originan procesos intermedios, que conllevan la reducción de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{N}_2$ . La proporción de las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$ :  $\text{N}_2$ , a su vez depende de la cantidad de oxígeno disponible y la textura (Grove, 2006; Zaman *et al.*, 2012), así como, de la

microbiología del suelo (Jena *et al.*, 2013). El pH del suelo es un factor limitante en la nitrificación, el valor óptimo para las bacterias nitrificantes en cultivos de laboratorio está en el rango de 7-9, sin embargo, la nitrificación ocurre en suelos ácidos con valores de 3 a 5 (Hayatsu *et al.*, 2008).

Durante la desnitrificación, el  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  se reducen a  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{N}_2$  mediante un metabolismo respiratorio, que involucra bacterias como *Pseudomonas denitrificans* y *Thiobacillus denitrificans*. La velocidad de la desnitrificación depende de las condiciones edafológicas, esta se favorece cuando existe un alto porcentaje de poros llenos de agua (mayor al 60%, que corresponde a bajos porcentajes de oxígeno), pH alto y C disponible (Figura 2). También, otros factores que influyen sobre la desnitrificación son la concentración de nitratos, la temperatura y la cantidad de C orgánico oxidable (Bertsch, 1998; Zaman *et al.*, 2012).

En el proceso de nitrificación heterotrófica, se da la oxidación del N orgánico a  $\text{NO}_3^-$  (Figura 3). La contribución de este proceso a las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  parece depender de la presencia de suelos ácidos y ricos en materia orgánica, así como del uso del suelo. La producción de  $\text{N}_2\text{O}$  a través de la nitrificación heterotrófica es poco conocida, ya que la nitrificación autotrófica y heterotrófica pueden ocurrir de manera simultánea y es difícil diferenciar los productos finales de estos procesos (Zaman, 2012; Zhang *et al.*, 2015).

Wang *et al.*, (2016) determinaron las tasas de transformación del N en suelos con pastizales en zonas templadas, utilizando el  $^{15}\text{N}$  como trazador. Encontraron que las tasas de mineralización e inmovilización del N fueron significativamente más bajas, con respecto a las tasas de nitrificación autotrófica, e indican que, la actividad microbiana heterotrófica

se reduce y se favorece la nitrificación autotrófica en suelos con bajas concentraciones de C orgánico disponible. En resumen, la concentración de N y C orgánico en el suelo constituyen factores limitantes sobre la mineralización e inmovilización de  $\text{NH}_4^+$ .

Abbasi y Adams (2000) demostraron que la nitrificación y la desnitrificación se producen simultáneamente. Utilizaron incubaciones de suelo bajo condiciones de humedad controlada,  $^{15}\text{N}$  como trazador, NI como inhibidor de nitrificación y acetileno para bloquear  $\text{N}_2\text{O}$  reductasa. Encontraron que más del 50% de N aplicado como  $\text{NH}_4^+$  desapareció durante un período de 42 días, y que ocurrió una acumulación de  $\text{NO}_3^-$ , lo que indicó una nitrificación activa. En este caso, la aplicación de la nitrapirina aumentó la recuperación de N en un 26% e inhibió tanto la acumulación de  $\text{NO}_3^-$  como la emisión de  $\text{N}_2\text{O}$ .

#### **4.3 Acción de los inhibidores de la nitrificación**

Los inhibidores de la nitrificación son utilizados para mejorar la EUN, reducir la lixiviación y disminuir a su vez las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$ , especialmente en sistemas agrícolas con una alta demanda de N (Ruser y Schulz, 2015). Según Trenkel (2013) los inhibidores de la nitrificación reducen la actividad de bacterias como *Nitrosomonas*, y así, retrasan la oxidación del  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$  de cuatro a diez semanas (Figura 4). Al mantenerse el N en la forma de  $\text{NH}_4^+$  en las partículas del suelo por más tiempo, se favorece la reducción de sus pérdidas por lixiviación y nitrificación (Grove, 2006).

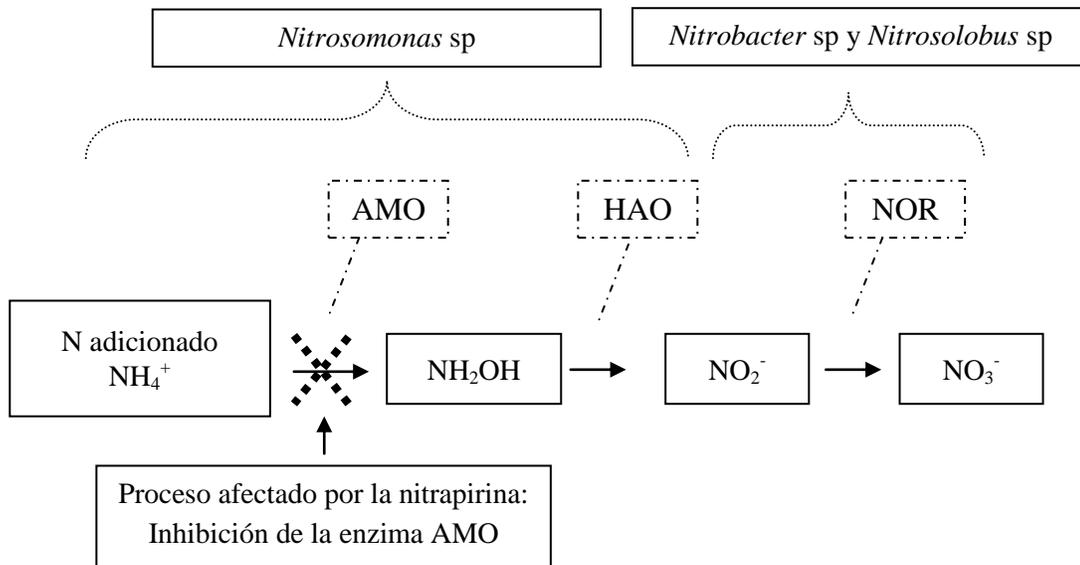


Figura 4. Etapa del proceso de nitrificación afectada por la adición de un inhibidor de la nitrificación como la nitrapirina. Adaptado de Zaman *et al.*, (2012).

En la primera etapa de la nitrificación, el  $\text{NH}_4^+$  se oxida a hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) por la enzima amoniaco monooxigenasa (AMO) y luego a nitrito  $\text{NO}_2^-$  por la enzima hidroxilamina oxidorreductasa (HAO). En la segunda etapa, el  $\text{NO}_2^-$  pasa a  $\text{NO}_3^-$  debido a la acción de la óxido nítrico reductasa (NOR). Dentro de este proceso, la mayoría de los inhibidores de la nitrificación, provoca la inhibición de la AMO, enzima unida a la membrana de microorganismos y que actúa con cobre como cofactor (Figura 4) (Ruser y Schulz, 2015).

#### 4.4 Nitrapirina y otros inhibidores de la nitrificación

Dentro de los inhibidores de la nitrificación más conocidos y eficientes para reducir las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$ , tras la aplicación de fertilizantes nitrogenados y purines, se encuentra: el 2-cloro-6-(triclorometil) piridina (Nitrapirina), el dicianidamida (DCD) y el fosfato de 3,4-dimetilpirazol (DMPP) (Grove, 2006; Martineau *et al.*, 2016). Estas

sustancias pertenecen al grupo de inhibición de los quelatantes de cobre (Ruser y Schulz, 2015).

Un estudio comparativo del efecto de los citados inhibidores de la nitrificación, (NI, DCD y DMPP), tanto bajo condiciones controladas de incubación de suelo, como en ensayos con macetas a capacidad de campo, determinó que aunque tales inhibidores limitan el crecimiento de las bacterias oxidantes de amonio y, por lo tanto, disminuyen la tasa de nitrificación autotrófica, el uso del DMPP mantiene esta disminución por mayor tiempo (Duncan *et al.*, 2016). Los autores atribuyeron este efecto al bajo contenido de cobre en el suelo ( $<1.5 \text{ mg Cu kg}^{-1}_{\text{suelo}}$ ), porque el DMPP inhibe la nitrificación a través del quelante-Cobre (un cofactor esencial en la enzima AMO).

Fisk *et al.*, (2015) estudiaron el potencial de la nitrapirina para disminuir la nitrificación a temperaturas elevadas en suelos con distintos contenidos de materia orgánica y los efectos sobre las poblaciones oxidantes de amoníaco. Ellos encontraron que la NI aumentó la retención de  $\text{NH}_4^+$  y disminuyó las tasas brutas de nitrificación incluso en suelos a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  y, destacaron el potencial de este inhibidor para disminuir el riesgo de pérdida de N por mineralización de la materia orgánica en condiciones de altas temperaturas.

Nauer *et al.*, (2018) compararon el efecto del DMPP sobre las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  en fincas lecheras australianas con Rey grass (*Lolium perenne L.*) como pasto dominante. Entre sus tratamientos urea (dosis de  $46 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) con DMPP, urea (dosis de  $46 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) y control no encontraron diferencias significativas en las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  ni en el rendimiento del pasto. Ellos concluyeron que las emisiones estuvieron más relacionadas con la humedad del suelo y el tiempo transcurrido desde la aplicación del fertilizante y

recomendaron que el uso del DMPP se acompañara de cambios en el manejo de la fertilización.

#### **4.5 Eficiencia en el uso del fertilizante nitrogenado**

Varios estudios para mejorar la EUN y mitigar las pérdidas de N al ambiente, particularmente las emisiones de N<sub>2</sub>O agrícolas, señalan la importancia de igualar el suministro de N inorgánico (por fuentes químicas u orgánicas) a las necesidades espaciales y temporales de los pastos o cultivos. Por lo tanto, el suministro de N inorgánico debería regularse a través de su lenta liberación (vía por ejemplo de inhibidores de la nitrificación, recubrimientos físicos o materiales de alta relación C/N) o la aplicación fraccionada del fertilizante y, siempre equilibrando el suministro de los otros nutrientes necesarios para las plantas (Snyder, 2017).

La EUN busca obtener mayores rendimientos con la misma dosis o con una dosis menor de fertilizante, y se define según la metodología empleada para su cálculo. Para algunos estudios la EUN representa el rendimiento (del grano) por unidad de N disponible en el suelo, el cual está en función de la estructura edáfica, las condiciones climáticas, las interacciones entre el suelo y los procesos bacterianos (Verhuls *et al.*, 2015).

Un método alternativo y directo para la determinar la EUN es a través del uso de fertilizantes marcados con el isótopo estable <sup>15</sup>N, metodología empleada en esta investigación. En este caso, la EUN es definida como la proporción entre el <sup>15</sup>N tomado del fertilizante por la planta y la cantidad de <sup>15</sup>N adicionado al suelo como fertilizante (IAEA, 2001). El primer parámetro que se determina al estudiar la absorción de fertilizante por un

cultivo mediante las técnicas isotópicas es la fracción del nutriente en la planta derivada del fertilizante (fddf).

Con el seguimiento isotópico del  $^{15}\text{N}$  se puede rastrear en el sistema suelo, planta y aire, la cantidad de N proveniente del fertilizante (IAEA, 2001). El  $^{15}\text{N}$  se ha utilizado como marcador de cambios naturales de la relación  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , como marcador de abundancia natural y en fertilizantes nitrogenados enriquecidos (Fenilli *et al.*, 2007). La distribución intramolecular de  $^{15}\text{N}$  en el  $\text{N}_2\text{O}$  está surgiendo como una herramienta para conocer las fuentes microbianas de  $\text{N}_2\text{O}$ . Es posible cuantificar la distribución de  $^{15}\text{N}$  en el  $\text{N}_2\text{O}$  debido a la fragmentación de  $\text{N}_2\text{O}^+$  a  $\text{NO}^+$ , expresándose, la abundancia relativa de  $^{15}\text{N}$  en la molécula de  $\text{N}_2\text{O}$ , en notación delta ( $\delta$ ) (Sutka *et al.*, 2003).

Esta técnica hace posible conocer con mayor exactitud la absorción y el requerimiento de N por parte de las plantas, lo que permite determinar prácticas adecuadas de fertilización como la zona de aplicación del fertilizante, época, fuente y dosis, entre otros aspectos. En consecuencia, facilita encontrar opciones para reducir la aplicación excesiva del N y por lo tanto, sus pérdidas hacia el ambiente ( IAEA, 2001; Hashim *et al.*, 2015).

La principal fuente de error en el seguimiento de la EUN por medio del uso de  $^{15}\text{N}$  es la variabilidad del sistema en campo y no las incertidumbres en las mediciones de los contenidos de N o al enriquecimiento del fertilizante con  $^{15}\text{N}$  (Fenilli *et al.*, 2007).

## 5 Materiales y Métodos

### 5.1 Suelo y establecimiento de ensayo en invernadero

Se tomó suelo de los primeros 15 cm de profundidad de un potrero con *Cynodon nlemfuensis* (Pasto Estrella Africana) como pasto dominante, de la Estación Experimental Alfredo Volio Mata (EEAVM) de la Universidad de Costa Rica (UCR) ubicada en Ochomogo, Cartago, (9°54'39.08"N, 83°57'16.99"O, 1584 m.s.n.m). Dicho suelo, clasificado en el orden Andisol, como un *Typic Haplustands* (Mata *et al.*, 2016), presentó una densidad aparente de 0,65 g cm<sup>-3</sup>, una densidad partículas de 2,5 g cm<sup>-3</sup>, un porcentaje de porosidad de 62,5 y una conductividad eléctrica de 0,3 mS cm<sup>-1</sup>.

El suelo se tamizó a través de una malla de 4 mm, y fue caracterizado químicamente mediante muestras compuestas analizadas por el Laboratorio de Suelos y Foliar del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la UCR, bajo el método KCI-OLSEN.

Posteriormente, el equivalente a 950 ± 5 g de suelo seco, se depositaron en macetas plásticas hasta alcanzar un volumen de 1450 mL, a fin de reproducir una densidad aparente de 0,65 g cm<sup>-3</sup>.

Para el establecimiento del material vegetativo, dos meses antes de la aplicación de los tratamientos, el pasto extraído del mismo sitio de donde se tomó el suelo fue trasplantado a macetas. Las macetas se mantuvieron, durante el establecimiento del pasto, en un ambiente protegido en la Escuela de Agronomía de la UCR, y posteriormente se trasladaron al Centro de Investigación en Contaminación Ambiental (CICA) para la medición de gases.

Durante el período de establecimiento, el pasto fue regado tres veces por semana y se cortó a una altura aproximada de 5 cm, a los 28 y 56 días de sembrado. Lo anterior, permitió primero asegurar el buen desarrollo del pasto y su sistema radical antes de la aplicación de los tratamientos y segundo, evitar el envejecimiento del pasto y lograr un periodo de recuperación entre pastoreos, de tal forma que se mantenga una producción alta de materia seca (Villalobos y Arce, 2014).

## 5.2 Tratamientos

Los tratamientos aplicados se resumen en el Cuadro 1

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos aplicados.

Tratamiento	Descripción	Dosis N (g N kg <sub>ss</sub> <sup>-1</sup> )*	Equivalente a kg N ha <sup>-1</sup>	% átomos <sup>15</sup> N en exceso
C	Control, sin fertilización nitrogenada, únicamente riego con agua desionizada	0	0	0
U42	Fertilización nitrogenada con urea	0,065	42	2
U42+NI	Fertilización nitrogenada con urea más el inhibidor nitrapirina	0,065	42	2
U84	Fertilización nitrogenada con urea**.	0,129	84	1
U84+NI	Fertilización nitrogenada con urea más el inhibidor nitrapirina	0,129	84	1

\*g N kg<sub>ss</sub><sup>-1</sup>: gramos de nitrógeno por kilogramo de suelo seco

\*\* Tratamiento aplicado únicamente para el seguimiento de las emisiones de N<sub>2</sub>O

La urea y la nitrapirina fueron agregadas gota a gota sobre la superficie del suelo para asegurar una distribución homogénea. La aplicación de urea se tomó como el día cero del experimento.

Se preparan dos disoluciones de urea, a concentraciones de  $2614 \text{ mg L}^{-1}$  (para U42) y  $5224 \text{ mg L}^{-1}$  (para U84). Para ello se pesó urea 5,23% átomos  $^{15}\text{N}$  exceso y urea comercial según los cálculos mostrados en el Anexo 1. Posteriormente la urea fue disuelta en agua desionizada.

El inhibidor, también disuelto en agua desionizada, fue aplicado en una dosis de 3,5 g de nitrapirina  $\text{kg N}^{-1}$ , dos días antes que el fertilizante. Según Zaman y Nguyen (2012) la aplicación del inhibidor días antes que la fuente de N es más efectiva reduciendo las tres pérdidas de N ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{NO}_3^-$ ) con respecto a la aplicación simultánea o posterior.

El volumen de la disolución de urea y nitrapirina agregados se ajustaron para no superar el espacio de poros llenos de agua (EPLA) establecido.

### **5.3 Diseño experimental**

El experimento fue establecido bajo dos grupos de macetas ambos con un diseño experimental de bloques completos al azar. El primer grupo, para el seguimiento de las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$ , se conformó con cinco tratamientos y cuatro repeticiones ( $n = 4$ , total 20 macetas). El segundo grupo, utilizado para el análisis destructivo de la variación del nitrógeno mineral, se conformó con cuatro tratamientos y tres repeticiones, para 5 días de muestreo ( $n= 3$ , total 60 macetas).

La reducción en el número de tratamientos para el seguimiento del N inorgánico, de cinco a cuatro se debió a restricciones en el recurso económico y humano. El presupuesto disponible para los análisis de nitrato y amonio solo permitía cubrir el costo de las muestras asociadas al monitoreo de cuatro tratamientos.

## 5.4 Humedad del suelo

Para la determinación de humedad se tomaron 25 g de suelo húmedo y se secaron en una estufa a 105° C por 48 h. Posteriormente, la muestra de suelo seco se pesó y el porcentaje de humedad gravimétrica ( $H_g$ ) se determinó a partir de la pérdida de agua, se calculó mediante la ecuación 1 (Henríquez y Cabalceta, 2012):

$$\% H_g = ((M_{\text{(suelo húmedo)}} - M_{\text{(suelo seco)}}) / M_{\text{(suelo seco)}}) * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

## 5.5 Control del espacio poroso lleno de agua

El espacio poroso lleno de agua (EPLA) fue determinado a partir de la ecuación 2 (Martins *et al.*, 2017).

$$\text{EPLA} = \frac{\text{Humedad}_{\text{gravimétrica}} * \text{Densidad aparente}}{\text{Porosidad}} * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

La condición de capacidad de campo del suelo fue determinada saturando el suelo con agua y midiendo la humedad y el peso, después de 48 horas de drenaje.

Durante todo el experimento con el objetivo de simular condiciones de época lluviosa y no sobrepasar el EPLA establecido de 60%, el suelo se mantuvo con la adición de agua desionizada hasta alcanzar el peso inicial determinado para dicha condición. El ajuste de la humedad por peso, que no consideró el cambio en la biomasa del pasto, se llevó a cabo todos los días la primera semana después de la aplicación de los tratamientos y tres veces por semana desde el día 7 en adelante. Los días de medición de las emisiones de  $N_2O$ , el ajuste de la humedad se realizó 15 a 30 minutos antes de medir el flujo. Bajo las condiciones experimentales se previno la lixiviación del  $NO_3^-$  mediante el riego controlado.

## 5.6 Análisis de nitrógeno inorgánico

El nitrógeno inorgánico, como  $\text{N-NH}_4^+$  y  $\text{N-NO}_3^-$ , se analizó los días 0, 2, 5, 12, 28 y 56, después de la aplicación de los tratamientos. El suelo de cada maceta se homogenizó y cuarteó hasta obtener una muestra de 25 g que se extrajo inmediatamente con 100 mL de  $\text{KCl } 2 \text{ mol L}^{-1}$  (99,999% de pureza, Suprapur®, Merck), durante 2 horas, en un agitador orbital a 200 rpm. Posteriormente, las muestras se filtraron con papel filtro (Marca Sartorius, n°1288). La concentración de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  fue determinada mediante inyección de flujo realizado en un analizador de flujo continuo Lachat FIA-8000 (Hach, Loveland, Colorado, USA) con el método basado en salicilato de sodio, en el CIA de la UCR.

## 5.7 Medición de flujo de $\text{N}_2\text{O}$ y señal isotópica de $^{15}\text{N}_2\text{O}$

Las emisiones de gas  $\text{N}_2\text{O}$  y la señal isotópica de  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  fueron determinadas mediante un espectrómetro de cavidad de decaimiento para el análisis isotópico de  $^{15}\text{N}_2\text{O}$ , marca Picarro, modelo G5102-i (Picarro Inc., Santa Clara, CA, USA) (Figura 5a), conectado a una cámara de muestreo no estacionaria que operó bajo un sistema de flujo cerrado (De Klein y Harvey, 2012).

La cámara de muestreo, en donde se colocó la maceta, se construyó a partir de un recipiente plástico cilíndrico de 12 L con tapa de cierre hermético a la cual se le colocaron dos tomas para la salida y entrada del aire (Figura 5b). Para controlar la humedad se empleó un filtro de Nafion (marca PermaPure LLC.) en la salida de aire hacia el analizador. El filtro permitió el movimiento del agua a través de la pared de la membrana gracias al gradiente de humedad entre el interior y el exterior de la tubería, lo que niveló la humedad del aire que ingresaba al equipo con la del aire ambiente.



Figura 5. Equipo utilizado para la medición de gases. a) Espectrómetro de cavidad de decaimiento para el análisis isotópico de  $\text{N}_2\text{O}$ . b) Sistema de cámara estática operando bajo flujo cerrado que se utilizó para la medición del flujo simultáneo de  $\text{N}_2\text{O}$  y  $^{15}\text{N}_2\text{O}$ .

Cada maceta se muestreó durante 15 minutos a partir del cierre de la cámara, dejando luego un flujo de aire ambiente de 5 minutos entre cada medición para lograr la limpieza del sistema. Condición que se verificó mediante el retorno de las lecturas a los valores de concentración de línea base.

La frecuencia de muestreo fue la siguiente:

1. Una vez antes de la aplicación de la urea
2. Semana 1: todos los días
3. Semana 2: tres veces por semana
4. Semana 3 y 4: dos veces por semana
5. Semana 5 al día 56: una vez por semana

La temperatura del aire dentro de la cámara fue registrada colocando un sensor (marca Sper Scientific 800016) a la par de la cámara durante cada medición. El desempeño del equipo se verificó con la medición de concentración de N<sub>2</sub>O en un cilindro de aire ultrapuro y en un estándar de 0,45 μmol N<sub>2</sub>O mol gas<sup>-1</sup> en aire al inicio y final de cada día de medición.

### 5.8 Cálculo del flujo y de las emisiones acumuladas de N<sub>2</sub>O

El flujo de N<sub>2</sub>O se calculó a partir del cambio en la concentración del gas dentro de la cámara (como la fracción de moles secos en ppm) contra el tiempo de medición, mediante la ecuación 3, en la cual la pendiente de la curva se evaluó al tiempo t = 0, (Christiansen *et al.*, 2015).

$$\text{Flujo}_{\text{gas}} = \frac{\delta C_{\text{N}_2\text{O}} / \delta t \cdot n \cdot M}{M_{\text{ss}}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde  $\delta C_{\text{N}_2\text{O}} / \delta t$  es el cambio de la concentración de N<sub>2</sub>O (μmol<sub>N<sub>2</sub>O</sub> mol<sub>aire</sub><sup>-1</sup>) en el tiempo (h),  $M_{\text{ss}}$  es la masa de suelo seco (kg),  $M$  es la masa de N (28 μg N μmol<sup>-1</sup> N<sub>2</sub>O) y  $n$  son los moles de gas dentro de la cámara calculados mediante la Ley de los Gases Ideales.  $n$  fue evaluado usando la temperatura y presión registrada, y el volumen calculado tomó en cuenta el volumen de la cámara, el volumen ocupado por las macetas, el sistema de mangueras y la cámara del equipo.

Las emisiones acumuladas de N<sub>2</sub>O se calcularon según la ecuación 4:

$$\text{N}_2\text{O}_{\text{total}} = \Sigma (f_i + f_{i+1}) / 2 * (t_{i+1} - t_i) * 24 \times 10^{-5} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde,  $\text{N}_2\text{O}_{\text{total}}$  es la emisión global o acumulada de N<sub>2</sub>O,  $f$  representa el flujo de N<sub>2</sub>O del suelo para un periodo de medición (μg N m<sup>-2</sup>h<sup>-1</sup>),  $(t_{i+1} - t_i)$  es el tiempo entre dos mediciones, y  $24 \times 10^{-5}$  es el factor de conversión de unidades (Chen *et al.*, 2014).

## 5.9 Cálculo de porcentaje de $^{15}\text{N}_2\text{O}$ originado a partir del fertilizante

La firma isotópica del  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  generado se calculó con el enfoque "Gráfico de Keeling", donde se genera un gráfico xy con el recíproco de la concentración  $1/\text{N}_2\text{O}$ , en el eje X y el  $\delta^{15}\text{N}$ , en ‰, en el eje Y. En esta gráfica lineal de pendiente descendiente el intercepto corresponde justamente al desplazamiento isotópico del  $\text{N}_2\text{O}$  emitido. ( $\delta^{15}\text{N}$  ‰) (Figura 6). Los datos registrados por el espectrómetro de cavidad de decaimiento para el análisis isotópico de  $^{15}\text{N}_2\text{O}$ , se procesaron en la hoja de cálculo "Análisis de Datos Picarro G5102-i" (Código SGC PT-04-R-21), validada por el CICA, donde se obtuvo la gráfica Keeling de cada medición. Un ejemplo de sus resultados se muestra en el Anexo 2.

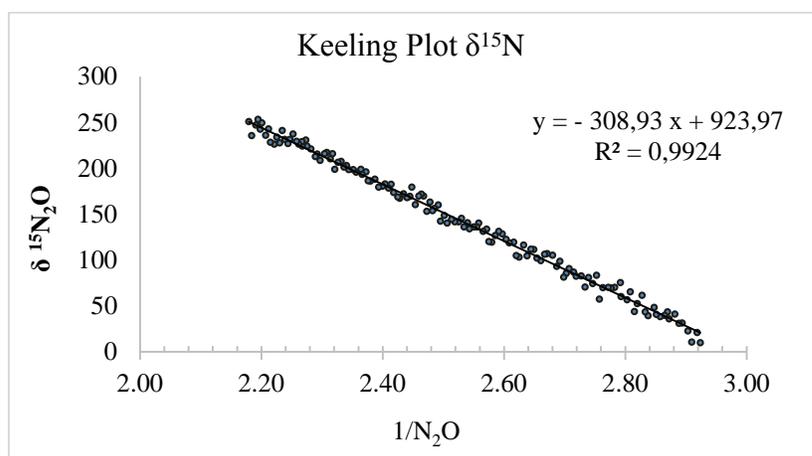


Figura 6. Gráfico de "Keeling Plot" para el cálculo de la firma isotópica del  $^{15}\text{N}_2\text{O}$ .

La fracción de  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  proveniente de fertilizante ( $^{15}\text{N}_2\text{O}_{\text{fertilizante}}$ ), se calculó convirtiendo el dato obtenido de  $\delta^{15}\text{N}_2\text{O}$  ‰ a Atom %  $^{15}\text{N}$  exceso (Ecuación 5) y luego aplicando la ecuación 6:

$$\delta^{15}\text{N}_2\text{O} (\text{‰}) = \frac{\text{Atom \% } ^{15}\text{N}_{\text{exceso muestra}} - \text{Atom \% } ^{15}\text{N}_{\text{ab nat}}}{\text{Atom \% } ^{15}\text{N}_{\text{ab nat}} * 1000} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$^{15}\text{N}_2\text{O}_{\text{fertilizante}} = \frac{\text{Atom \% } ^{15}\text{N}_{\text{exceso}} \text{ N}_2\text{O}_{\text{muestra}}}{\text{Atom \% } ^{15}\text{N}_{\text{exceso}} \text{ urea}} \quad \text{Ecuación 6}$$

### 5.10 Análisis de la eficiencia en el uso del fertilizante nitrogenado

El pasto fue cortado dos días antes y, 28 y 56 días después, de la fecha de aplicación de la urea enriquecida con  $^{15}\text{N}$ . Cada muestra fue secada en la estufa a  $60\text{ }^\circ\text{C}$  durante 72 h. Luego de determinar el peso del follaje seco, la totalidad de la muestra fue molida hasta polvo en un molino de balines (marca Retsch, modelo MM400).

El contenido de N total en las muestras de follaje se analizó en el Laboratorio de Suelos y Foliar del CIA de la UCR, utilizando el método de N por combustión seca en autoanalizador.

El  $^{15}\text{N}$  en las muestras de pasto molido se analizó en el Laboratorio de Agrobiología de la Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA) en Brasil.

La EUN se calculó de acuerdo con la ecuación 7, a partir del  $^{15}\text{N}$  derivado del fertilizante ( $\text{N}_{\text{ddf}}$ ), que se obtiene según se detalla en las ecuaciones de la 8 a la 10:

$$\text{EUN (\%)} = (\text{N}_{\text{dfp}} \text{ (g)} / \text{A}_{\text{N}} \text{ (\%)}_{\text{adicionados}}) * 100 \quad \text{Ecuación 7}$$

El N acumulado se calculó mediante la ecuación:

$$\text{N}_{\text{ac}} = (\text{M}_{\text{S}} * \text{C}_{\text{N}}) / 100 \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde,  $\text{N}_{\text{ac}}$  es el N acumulado (g),  $\text{M}_{\text{S}}$  es la materia seca (g) y  $\text{C}_{\text{N}}$  es la concentración total de N en %.

El N derivado del fertilizante (en %) se calculó mediante la ecuación 9:

$$N_{df} = (A_N * 100) / A_N \text{ del fertilizante} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde,  $A_N$  es el % átomos  $^{15}\text{N}$  en exceso de 0,366.

La cantidad de N proveniente del fertilizante en la planta (g) se calculó mediante la ecuación:

$$N_{dfp} \text{ (g)} = (N_{df} \text{ (\%)} * N_{ac}) / 100 \quad \text{Ecuación 10}$$

Para la técnica indirecta la EUN se calculó mediante la ecuación:

$$EUN = (\% N_{total} * \text{Materia seca (g)}) / N_{adicionado} \quad \text{Ecuación 11}$$

### 5.11 Análisis estadístico de resultados

Se realizó la prueba de Grubbs para valores atípicos en los flujos de  $\text{N}_2\text{O}$ . Se rechazaron los datos de la maceta N° 8 a partir del día 16, la maceta N°20 a partir del día 23 y la maceta N°21 en su totalidad, en los casos rechazados por la prueba mencionada, hubo problemas de plagas o muerte del pasto. En total fueron rechazados 34 datos (lo que representa 10% del total de los datos).

La comparación entre tratamientos se realizó mediante un análisis de varianza y cuando se obtuvieron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) se utilizó el test de Tukey para la comparación de las medias. En el caso de los flujos de  $\text{N}_2\text{O}$  por día de medición, el análisis se llevó a cabo bajo la modalidad de bloques incompletos al azar por el rechazo de datos que se comenta en el párrafo anterior. Para el desarrollo de los análisis estadísticos se empleó el programa InfoStat versión 2017.

## 6 Resultados y discusión

### 6.1 Características del suelo

El suelo presenta una fertilidad alta, con 1 % de saturación de acidez y un pH ligeramente ácido. No existen problemas de aluminio soluble en el suelo debido al bajo contenido de acidez intercambiable. El contenido de fósforo y los elementos menores se encuentran por encima del nivel crítico. La relación C/N es de 9,8 y presenta un porcentaje de materia orgánica de 7,8 que se evalúa como alto (Cuadro 2).

Cuadro 2. Propiedades químicas de los primeros 15 cm del suelo, proveniente de la EEAVM.

pH (H <sub>2</sub> O)	cmol(+)/L					%	mg/L					%		C/N
	Acidez 0,5	Ca 4	Mg 1	K 0,2	CICE*	S A *	P 10	Zn 3	Cu 1	Fe 10	Mn 1	C total	N total	
5.9	0.1	8.1	5.1	2.3	15.6	0.9	42.8	9.9	25.8	450.2	45.8	5,48	0,56	9,8

\*CICE: capacidad de intercambio catiónica efectiva. SA: saturación de acidez.

### 6.2 Análisis del nitrógeno inorgánico

Al igual que en el ensayo de campo realizado en Costa Rica<sup>2</sup> y como lo menciona Martins *et al.*, (2017), se dio un rápido incremento en la concentración del NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, visible en las primeras 48 h desde la aplicación fertilización nitrogenada en los tratamientos U42, U42+NI y U84+NI. Esto se debe, probablemente a la humedad de 63% que se mantuvo durante el experimento, lo que facilita la hidrólisis de la urea adicionada (Figura 7 a) por la acción de la enzima ureasa. Cabe mencionar que la nitrapirina no incide sobre esta etapa, pues como se explicó anteriormente, actúa únicamente sobre los microorganismos que participan en el proceso de nitrificación autotrófica (Zaman *et al.*, 2012).

<sup>2</sup> Pérez *et al.* 2018. Nitrapyrin did not affect yield-scaled nitrogen gaseous emissions in a tropical grassland. Sometida a Pedosphere.

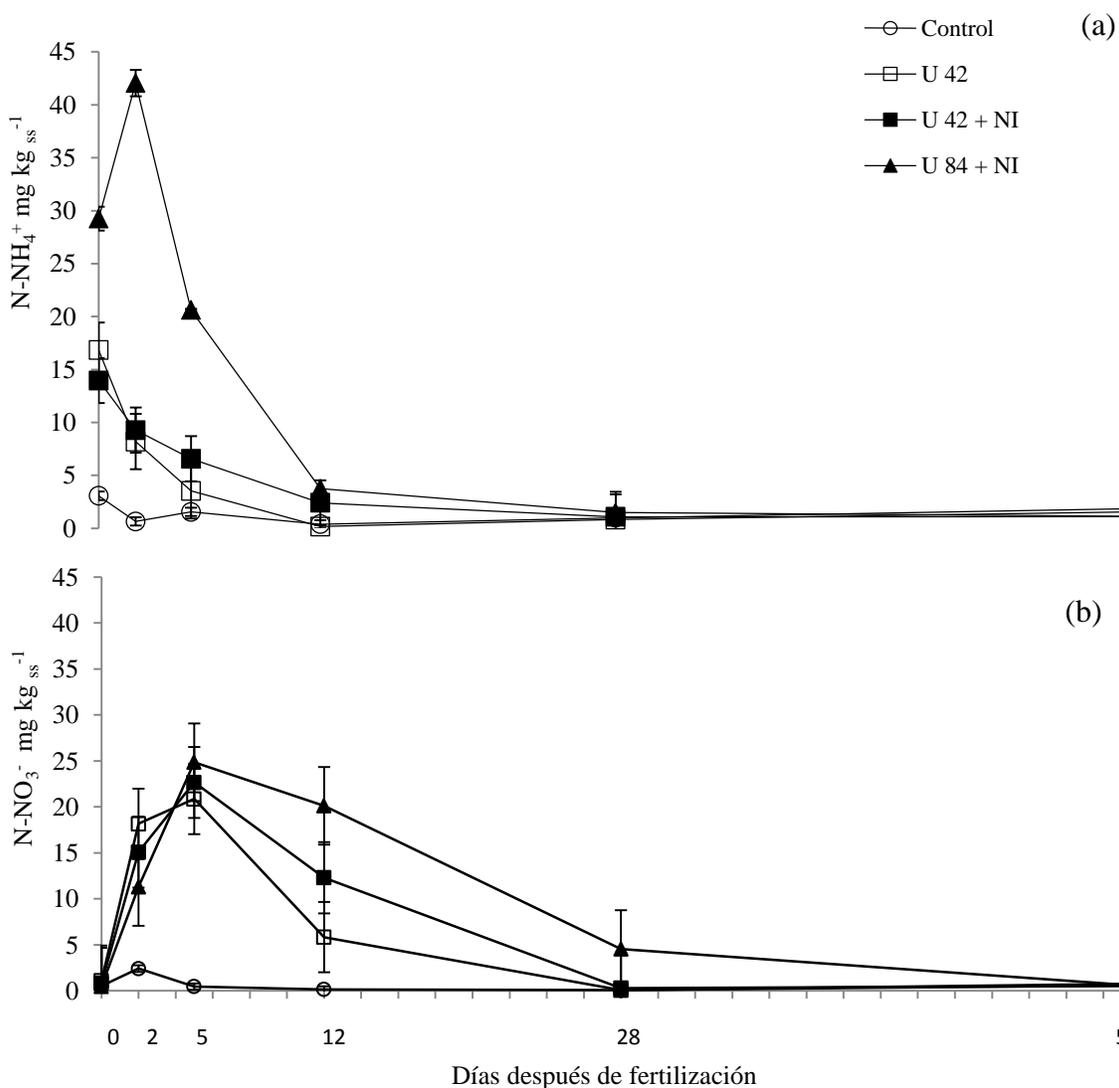


Figura 7. Nitrógeno disponible en el suelo en forma de  $NH_4^+$  (a) y  $NO_3^-$  (b) para los tratamientos control (C), urea (U) y urea con nitrapirina (U+NI). Las barras verticales corresponden al error estándar.

Las concentraciones de  $NH_4^+$  en el suelo del control durante la fase inicial del experimento fueron  $(3.07 \pm 0.14)$  mg  $N-NH_4^+$   $kg_{ss}^{-1}$  el día 0,  $(0,65 \pm 0,23)$  mg  $N-NH_4^+$   $kg_{ss}^{-1}$

el día 2 y  $(1,55 \pm 0,26)$  mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> kg<sub>ss</sub><sup>-1</sup> el día 5. El control no mostró diferencias significativas respecto a las concentraciones de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> con el tratamiento U42+NI ( $13,95 \pm 2,32$  mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> kg<sub>ss</sub><sup>-1</sup>) el día 0 y con el U42 ( $16,83 \pm 2,68$  mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> kg<sub>ss</sub><sup>-1</sup>) el día 5 y, en general con los tratamientos fertilizados con urea a partir del día 12. Lo primero, probablemente por la dispersión de los datos y lo segundo, por la disminución del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> producido a raíz de su consumo e inmovilización. En general, la incertidumbre de los datos se expresa como  $\pm$  el error estándar.

Contrario a lo reportado por otros autores como Abalos *et al.*, (2014), pero de manera similar al ensayo de campo llevado<sup>3</sup>, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Figura 7a), entre los tratamientos U42 y U42+NI. Este resultado podría deberse a dos factores producto del alto contenido de materia orgánica del suelo (7,8%). Primero, la inmovilización del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> que redujo la cantidad de N- NH<sub>4</sub><sup>+</sup> disponible en el suelo lo que pudo enmascarar cualquier reducción en la tasa de nitrificación causada por la nitrapirina (McTaggart *et al.*, 1997). Segundo, la nitrapirina se pudo degradar, ya que según lo menciona Fisk *et al.*, (2015), la materia orgánica absorbe la nitrapirina y además, proporciona una fuente de energía para su posible degradación microbiana.

El tratamiento U84+NI mostró un aumento significativo ( $P < 0,05$ ) en las concentraciones de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Figura 7) respecto a los tratamientos U42 y U42+NI los días 0, 2 y 5. Situación esperable al haberse duplicado la dosis de la urea aplicada.

---

<sup>3</sup> Pérez *et al.* 2018. Nitrapyrin did not affect yield-scaled nitrogen gaseous emissions in a tropical grassland. Sometida a Pedosphere.

En general, el control mantuvo las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  inferiores por debajo de la del resto de tratamientos; excepto el día 0 ( $0,54 \pm 0,15 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ kg}_{\text{ss}}^{-1}$ ) y del día 28 ( $0,16 \pm 5,61 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ kg}_{\text{ss}}^{-1}$ ) en adelante, cuando no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 7 b). La disminución de  $\text{NO}_3^-$  en el tiempo, hasta igualarse entre tratamientos (Figura 7 b), puede atribuirse a causas como la absorción por parte de la planta o a pérdidas por desnitrificación, descartándose las pérdidas por lixiviación, debido a que éstas fueron controladas para minimizar su incidencia.

Las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  en suelo alcanzadas por los tratamientos U42, U42+NI y U84+NI no presentaron diferencias significativas entre los días 0 y 5. Por ejemplo el día 2, las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  fueron: U42 ( $18,17 \pm 5,44$ )  $\text{mg N-NO}_3^- \text{ kg}_{\text{ss}}^{-1}$ , U42 +NI ( $15,09 \pm 2,77$ )  $\text{mg N-NO}_3^- \text{ kg}_{\text{ss}}^{-1}$  y U84+NI ( $11,3 \pm 4,08$ )  $\text{mg N-NO}_3^- \text{ kg}_{\text{ss}}^{-1}$ . Este comportamiento resultó similar al obtenido al comparar parcelas fertilizadas con urea en una dosis de  $42 \text{ kg N ha}^{-1}$  con y sin nitrapirina<sup>4</sup>.

El incremento del  $\text{NO}_3^-$  entre el día 0 y día 5 al mismo tiempo que disminuye la concentración de  $\text{NH}_4^+$  (Figura 7), en los tratamientos U42 y U42+NI señala probablemente una rápida nitrificación de  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$  luego de la hidrólisis de la urea, que podría sugerir que la nitrapirina no fue efectiva bajo las condiciones experimentales. Sin embargo, la magnitud del cambio de  $\text{NO}_3^-$  frente a la variación en la concentración de  $\text{NH}_4^+$  hace suponer una fuente adicional de nitrato, originado probablemente por la nitrificación heterotrófica (oxidación de N orgánico a  $\text{NO}_3^-$ ). Mecanismo considerado relevante en suelos con alto contenido de materia orgánica, pH menor a 6.5 y con eventos de lluvia intensos (Müller *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016).

---

<sup>4</sup> Pérez *et al.* 2018. Nitrapyrin did not affect yield-scaled nitrogen gaseous emissions in a tropical grassland. Sometida a Pedosphere.

### 6.3 Variación temporal de las emisiones de N<sub>2</sub>O

El flujo de N<sub>2</sub>O en los tratamientos con fertilización nitrogenada se mantuvo por encima del control como se esperaba (Figura 8). Conforme al comportamiento esperado, la adición de la urea repercutió en los procesos microbianos y enzimáticos de transformación del N aumentando la generación de N<sub>2</sub>O.

Pese a que al control no se le adicionó urea, se observó un leve aumento en sus emisiones para el día 4 (Figura 8) atribuible probablemente a la oxidación del N orgánico por nitrificación heterotrófica, que podría favorecerse con el EPLA de 60% mantenido durante el experimento. Según se mencionó previamente, en investigaciones realizadas con fertilizantes enriquecidos con <sup>15</sup>N, la nitrificación heterotrófica se presume como una fuente importante de emisiones de N<sub>2</sub>O, representando hasta 85% del flujo total de N<sub>2</sub>O en suelos con alto contenido de materia orgánica y un pH entre 4,2 y 8,4 (Zhang *et al.*, 2015).

En los tratamientos bajo aplicación de urea se observaron dos flujos máximos de N<sub>2</sub>O: el primero alrededor del día 2 y el segundo el día 7, que resultaron más marcados para el tratamiento U84. Es difícil identificar el origen del segundo máximo a partir del ensayo planteado y de las mediciones realizadas. Vistoso *et al.*, (2012) asociaron los picos en las emisiones de N<sub>2</sub>O con eventos de lluvia, relacionados con la aireación restringida y el alto contenido de agua en el suelo. Por otro lado, Mathieu *et al.*, (2006) señalaron que la proporción de N emitido como N<sub>2</sub>O varía según la humedad del suelo, donde en condiciones no saturadas, el 60% de N-N<sub>2</sub>O se origina por nitrificación, mientras que en condiciones saturadas, la desnitrificación aporta alrededor del 85-90% del flujo de N-N<sub>2</sub>O.

Sin embargo, en este ensayo llevado a cabo bajo condiciones controladas los factores mencionados por estos autores no son variables que puedan influir.

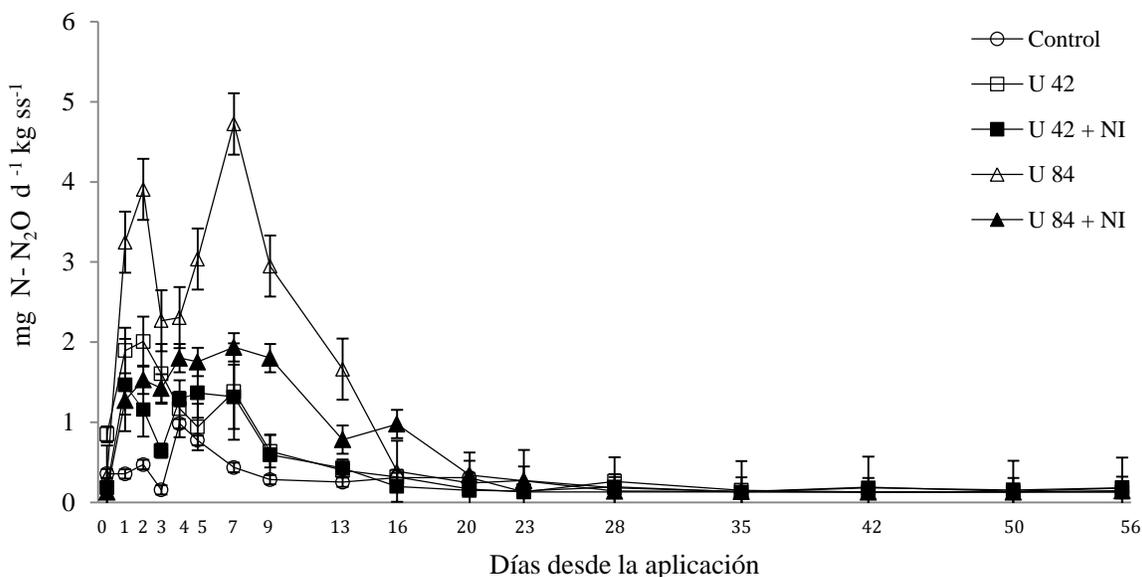


Figura 8. Flujo promedio de emisiones de N-N<sub>2</sub>O para los tratamientos control, urea (U) y urea con nitrapirina (U+NI). Las barras verticales corresponden al error estándar.

Los tratamientos U42 y U42+NI, únicamente mostraron diferencias significativas entre sí ( $P < 0,05$ ) el día 0. Fecha en que los flujos de N<sub>2</sub>O fueron U42 ( $0,86 \pm 0,14$ ) mg N-N<sub>2</sub>O d<sup>-1</sup> kg<sub>ss</sub><sup>-1</sup> y U42+NI ( $0,19 \pm 0,04$ ) mg N-N<sub>2</sub>O d<sup>-1</sup> kg<sub>ss</sub><sup>-1</sup>. Comportamiento similar fue encontrado en el ensayo de campo realizado<sup>5</sup> en la EEAVM.

En general, al comparar los tratamientos U84 y U84+NI (Figura 8) se observaron flujos menores con la adición de nitrapirina, siendo las diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) el día 0 ( $0,33 \pm 0,03$  y  $0,13 \pm 0,005$  mg N-N<sub>2</sub>O d<sup>-1</sup> kg<sub>ss</sub><sup>-1</sup>, respectivamente) y el día 7 ( $4,86 \pm 1,61$  y  $1,94 \pm 0,86$  mg N-N<sub>2</sub>O d<sup>-1</sup> kg<sub>ss</sub><sup>-1</sup>, respectivamente).

<sup>5</sup> Pérez *et al.* 2018. Nitrapyrin did not affect yield-scaled nitrogen gaseous emissions in a tropical grassland. Sometida a Pedosphere.

Los flujos de  $N_2O$  tienden a la línea base entre el día 16 y el día 20, momento en que las emisiones por día de todos los tratamientos se igualan con el control (Figura 8). Esta condición probablemente responda al agotamiento de las fuentes de N debido al consumo del pasto y a las pérdidas vía emisiones gaseosas.

#### 6.4 Emisiones acumuladas de $N_2O$

Las emisiones de  $N_2O$  del tratamiento U84 se acumularon mayoritariamente durante los 20 días posteriores a la aplicación del fertilizante, aunque fueron significativamente mayores respecto a U84+NI y al resto de tratamientos, a partir del día 3 (Figura 9). Las emisiones acumuladas de U84 correspondientes a  $(1,72 \pm 0,46)$  mg N- $N_2O$   $kg_{ss}^{-1}$  disminuyeron a  $(0,76 \pm 0,06)$  mg N- $N_2O$   $kg_{ss}^{-1}$ , o sea 18,25%, cuando se aplicó la urea con nitrapirina. Resultado que concuerda con el estudio realizado por Abbasi *et al.*, (2003). en un suelo con 4,73% de C total y pH 5,1, donde la aplicación de la nitrapirina produjo una reducción sustancial sobre la emisión de  $N_2O$  en comparación con el tratamiento sin inhibidor, también señala que la pérdida total de N como  $N_2O$  fue de 0,12 mg  $kg^{-1}$ , equivalente al 0,06% del N aplicado.

En contraposición a los resultados expuestos, los tratamientos U42 y U42+NI no mostraron diferencias significativas en las emisiones acumuladas de  $N_2O$  hasta el día 28 después de la aplicación del fertilizante (Figura 9). En vista de que a estos tratamientos se les aplicó una dosis fraccionada de urea equivalente a un valor cercano a la tasa de extracción de N del pasto, según datos en publicación<sup>6</sup> (entre 236 y 216  $kg$  N  $ha^{-1} año^{-1}$  durante los seis meses de la época lluviosa), es probable que la limitada

---

<sup>6</sup> Pérez *et al.* 2018. Nitrapyrin did not affect yield-scaled nitrogen gaseous emissions in a tropical grassland. Sometida a Pedosphere.

disponibilidad de N en exceso evite que la nitrapirina actúe significativamente sobre la reducción de las emisiones de N<sub>2</sub>O.

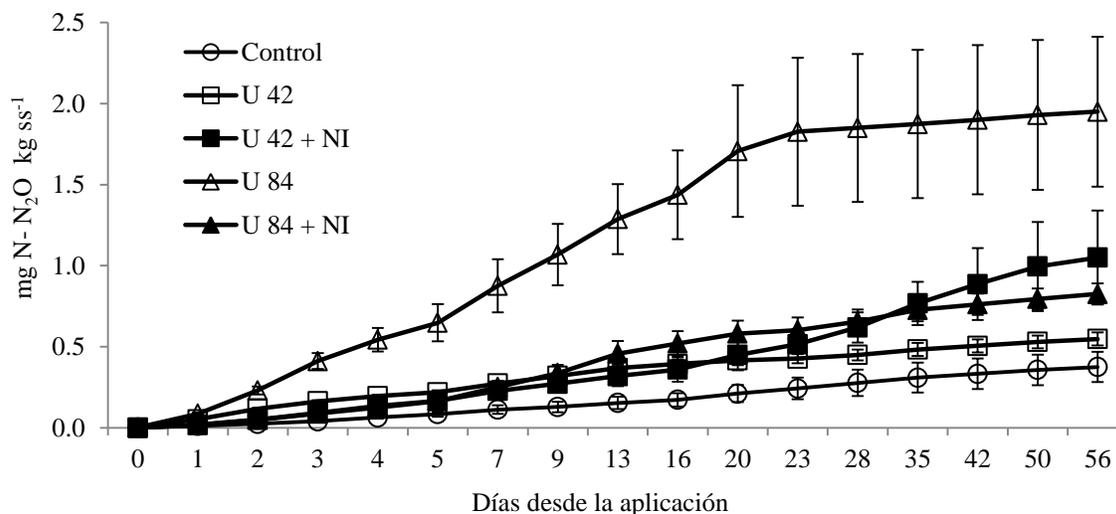


Figura 9. Emisiones acumuladas de N- N<sub>2</sub>O (mg N- N<sub>2</sub>O kg<sub>ss</sub><sup>-1</sup>) a los 56 días de aplicado los para los tratamientos control, urea (U) y urea con nitrapirina (U+NI). Las barras verticales corresponden al error estándar.

Nauer *et al.*, (2018) aplicaron urea y el inhibidor de la nitrificación DMPP, a una dosis de 46 kg N ha<sup>-1</sup>, en fincas de ganadería de leche y al igual que en este estudio, el tratamiento con el inhibidor no mostró reducción sobre las emisiones. Sin embargo, los autores atribuyeron este resultado a la humedad del suelo (de 30 a 40% hasta cerca del punto de saturación) señalando que el DMPP era menos efectivo en suelos con alta humedad. De igual manera, Dougherty *et al.*, (2016) evaluaron el efecto del DMPP con urea sobre pastizales y no observaron ningún efecto sobre el N mineral del suelo, el rendimiento de los pastos o los flujos de N<sub>2</sub>O, lo que atribuyeron igualmente a un alto EPLA (mayor al 60%), e indicaron que las emisiones de N<sub>2</sub>O están relacionadas con la magnitud y la duración de los eventos de lluvia.

Las emisiones acumuladas de N<sub>2</sub>O del tratamiento U42+NI del día 29 al 56, período transcurrido luego del primer corte del pasto, aumentaron en 7,82% (diferencia no significativa) respecto a U42. Esta diferencia puede deberse a la incidencia de los bajos flujos y al distanciamiento entre mediciones. En primera instancia, como los flujos de N<sub>2</sub>O se mantuvieron alrededor del límite de detección, algunos datos por debajo de dicho límite se igualaron con este valor (0,13 μg - N<sub>2</sub>O kg<sub>ss</sub><sup>-1</sup>) lo que redujo la variabilidad de los datos y ello aumentaría la probabilidad de encontrar una diferencia significativa. Por otra parte, el cálculo promedio, para la evaluación del acumulado, que hace que un pequeño cambio se magnifique.

Las emisiones de N<sub>2</sub>O provenientes de U42+NI y U84+NI no mostraron diferencias significativas entre sí, a pesar de que en el segundo tratamiento el ingreso de N se duplicó (Figura 9Figura 9). Esta observación sería congruente con la no diferencia en las concentraciones de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el suelo entre ambos tratamientos y la hipótesis planteada de que la nitrapirina tiene un efecto significativo cuando se tiene un exceso de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en suelo (Figura 7).

## **6.5 Porcentaje de emisiones de óxido nitroso originadas del fertilizante**

La formación de N<sub>2</sub>O con una firma isotópica donde la relación <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N es mayor que 0,3663% pero menor al % átomos <sup>15</sup>N exceso del fertilizante refleja que parte del N involucrado en su producción provino de la aplicación de urea enriquecida con <sup>15</sup>N (IAEA, 2001). En el caso del Andisol en estudio, hasta un máximo de aproximadamente 85 % del N<sub>2</sub>O producido se origina del fertilizante (Figura 10), y el resto de fuentes no enriquecidas. Estas emisiones de N<sub>2</sub>O podrían ser consecuencia de la oxidación del N orgánico o de su producción vía desnitrificación heterotrófica en micrositios anaeróbicos que coexisten en el

perfil del suelo (Sey *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2017). Lo anterior contrasta con los resultados de Abbasi y Adams (2000), quienes en una incubación de suelo con un pH 5,1 y 3,3 % de C total encontraron que todo el N<sub>2</sub>O emitido se originaba a partir de la <sup>15</sup>N-urea añadida.

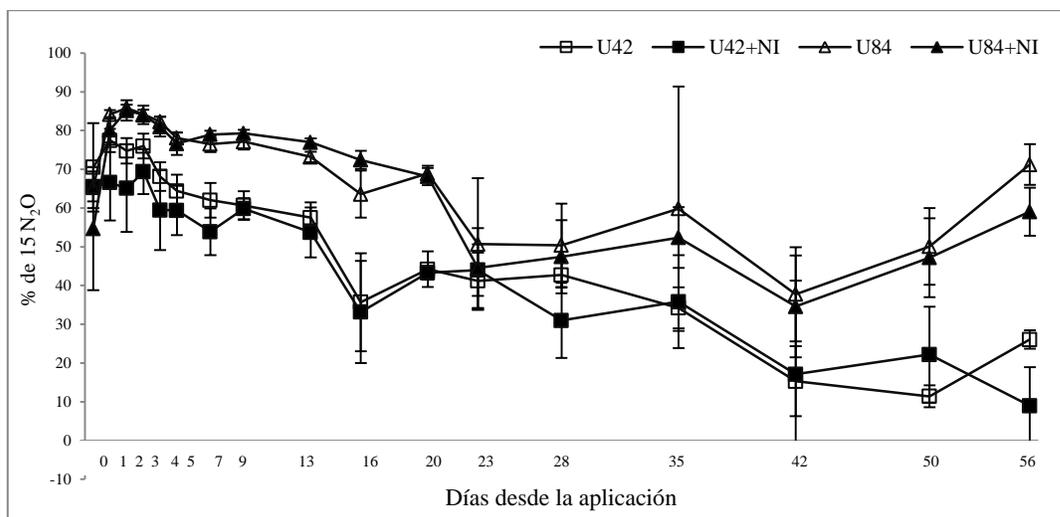


Figura 10. Porcentaje de <sup>15</sup>N<sub>2</sub>O originado a partir del fertilizante para los tratamientos urea (U) y urea con nitrapirina (U+NI). Las barras verticales corresponden al error estándar.

El porcentaje de <sup>15</sup>N<sub>2</sub>O originado a partir de urea aplicada, fue siempre menor en U42 y U42+NI respecto a U84 y U84+NI (Figura 10), con una diferencia significativa (P<0,05) los días 7, 9, 13, 20 y 56. Resultado que reafirma la condición de menor disponibilidad de N en los tratamientos con la dosis más baja y una mayor participación de la nitrificación heterotrófica.

## 6.6 Uso eficiente del fertilizante nitrogenado

Con el uso de la técnica isotópica, aplicando urea enriquecida con  $^{15}\text{N}$ , no se observaron diferencias significativas en la EUN entre las dos dosis de fertilizante aplicadas, ni tampoco como resultado de la aplicación de la nitrapirina (Cuadro 3). No obstante, contrario a lo esperado, la EUN de los tratamientos con sólo urea mostró valores más altos (sin diferencias significativas) que los tratamientos de urea con nitrapirina.

Cuadro 3. Porcentaje de eficiencia en el uso del nitrógeno para los tratamientos urea (U) y urea con nitrapirina (U+NI). La incertidumbre se expresa como  $\pm$  desviación estándar (n=3)

Tratamiento	Técnica isotópica $^{15}\text{N}$			Técnica indirecta
	28 ddf*	56 ddf*	Total	28 ddf
U 42	24,10 $\pm$ 4,10	8,48 $\pm$ 1,48	32,6 $\pm$ 5,6	62,18 $\pm$ 4,28
U 42+NI	21,93 $\pm$ 6,67	7,82 $\pm$ 4,18	29,8 $\pm$ 10,9	60,40 $\pm$ 8,59
U 84	29,31 $\pm$ 7,35	11,67 $\pm$ 2,35	41,0 $\pm$ 9,7	50,36 $\pm$ 4,91
U 84+NI	20,75 $\pm$ 1,90	9,54 $\pm$ 1,81	30,3 $\pm$ 3,7	54,21 $\pm$ 4,41

\*ddf: días después de fertilización.

Mediante el seguimiento del  $^{15}\text{N}$ , la EUN promedio del primer ciclo (corte a los 28 días) fue de 24 %, en tanto que para el segundo ciclo (corte de pasto a los 56 días) fue de 9,4 %, con un promedio global de 33 %. Estos resultados, con respecto a el estudio realizado por Hashim *et al.*, (2015) en arroz, en donde obtuvo una EUN de 50%, obtuvieron valores muy bajos, siendo el tratamiento U84 (41,0  $\pm$  9,7 %) con la EUN acumulada más alta.

Al comparar los porcentajes de la EUN (Cuadro 3) se encuentra que la técnica indirecta sobreestima dichos porcentajes, con un promedio de 59,79% en general, en vista de que considera el N total absorbido por la planta como proveniente del fertilizante, y no discrimina entre el N en el suelo y el N del fertilizante, esta técnica no permite un seguimiento hasta el día 56 como sí lo permite la técnica isotópica. Sin embargo, retomando la Figura 10, el  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  que se generó en el primer ciclo de producción fue de entre 30 a 85 % proveniente del fertilizante, por lo que la planta no podría absorber tal cantidad de N únicamente del fertilizante.

## 7 Conclusiones

En un suelo con una EPLA del 60% la concentración del  $\text{NH}_4^+$  se incrementa rápidamente en las primeras 48 h desde la aplicación de urea. De acuerdo con los resultados, en un Andisol y a una dosis de N de  $0,065 \text{ (g N kg}_{\text{ss}}^{-1})$  la nitrapirina no generó diferencias significativas en la acumulación de  $\text{NH}_4^+$  en el suelo.

El aumento en la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en suelo no presenta un retraso producto de la acción de la nitrapirina entre los días 0 y 5 en los tratamientos U42, U42+NI y U84+NI. La no existencia de diferencias significativas en la acumulación de  $\text{NO}_3^-$  se asocia con flujos similares de  $\text{N}_2\text{O}$  entre dichos tratamientos.

En un Andisol, bajo las condiciones experimentales, la tasa de cambio de  $\text{NO}_3^-$  frente a la variación en la concentración de  $\text{NH}_4^+$  en los tratamientos U42 y U42+NI señala que el aumento en el  $\text{NO}_3^-$  se origina no solo vía nitrificación de  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$  sino probablemente también por nitrificación heterotrófica.

La nitrapirina no reduce las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  cuando la fertilización nitrogenada se da una dosis equivalente de  $42 \text{ kg de N ha}^{-1}$ , pero si reduce las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  si la dosis aumenta el doble.

La EUN no aumenta significativamente con la aplicación de nitrapirina cuya eficacia se ve estrechamente afectada por las características del suelo y variables ambientales.

## **8 Recomendaciones**

Sobre futuras investigaciones en este tema, se recomienda, aplicar la nitrapirina y la urea a distintas dosis, para conocer su interacción y efecto sobre las emisiones de GEI y sobre la EUN.

Por el alto contenido de materia orgánica del suelo en estudio, se recomienda utilizar suelo de otras zonas ganaderas del país, con menor cantidad de materia orgánica, para conocer el impacto de la nitrapirina sobre este.

## 9 Literatura citada

- Abalos, D., Jeffery, S., Sanz-Cobena, A., Guardia, G., y Vallejo, A. (2014). Meta-analysis of the effect of urease and nitrification inhibitors on crop productivity and nitrogen use efficiency. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 189, 136–144.
- Abbasi, M. K., y Adams, W. A. (2000). Estimation of simultaneous nitrification and denitrification in grassland soil associated with urea-N using N-15 and nitrification inhibitor. *Biology and Fertility of Soils*, 31(1), 38–44.
- Abbasi, M. K., Shah, Z., y Adams, W. A. (2003). Effect of the nitrification inhibitor nitrapyrin on the fate of nitrogen applied to a soil incubated under laboratory conditions. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*.
- Alonso-Ayuso, M., Gabriel, J. L., y Quemada, M. (2016). Nitrogen use efficiency and residual effect of fertilizers with nitrification inhibitors. *European Journal of Agronomy*, 80, 1–8.
- Bertsch, F. (1998) La fertilidad de los suelos y su manejo. Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo. San José, Costa Rica. 157 p.
- Chen, Z. M., Ding, W. X., Luo, Y. Q., Yu, H. Y., Xu, Y. H., Müller, C., ... Zhu, T. Bin. (2014). Nitrous oxide emissions from cultivated black soil: A case study in Northeast China and global estimates using empirical model. *Global Biogeochemical Cycles*, 27, 1311–1326.
- Christiansen, J. R., Outhwaite, J. and Smukler, S. M. (2015). Comparison of CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O soil-atmosphere exchange measured in static chambers with cavity ring-down spectroscopy and gas chromatography. *Agricultural and Forest Meteorology*. Elsevier B.V., 211–212, pp. 48–57.

- Mata, R., Vázquez, A., Rosales, A., y Salazar, D. (2016). Mapa digital de suelos de Costa Rica. *Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo, San José, CRC*. Escala, 1, 200000.
- CORFOGA. (2013). Informe encuesta ganadera 2012. San José. Costa Rica.
- CORFOGA. (2015). Análisis del Censo Ganadero 2014. Para el Sector Ganadero. San José. Costa Rica. pp.1-39.
- De Klein, C. a. M., y Harvey, M. (2012). *Nitrous Oxide Chamber Methodology Guidelines. Global Reserch Alliance on Agricultural Greenhouse Gases.*
- Dougherty, W. J., Collins, D., Van Zwieten, L., y Rowlings, D. W. (2016). Nitrification (DMPP) and urease (NBPT) inhibitors had no effect on pasture yield, nitrous oxide emissions, or nitrate leaching under irrigation in a hot-dry climate. *Soil Research, 54(5), 675–683.*
- Duncan, E., Sullivan, C. O., Roper, M., y Peoples, M. (2016). The effect of nitrification inhibitors on wheat crop performance on coarse- grained soils in Mediterranean environments, (December), 3–6.
- Fenilli, T. A. B., Reichardt, K., Bacchi, O. O. S., Trivelin, P. C. O., y Dourado-Neto, D. (2007). The <sup>15</sup>N isotope to evaluate fertilizer nitrogen absorption efficiency by the coffee plant. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias, 79(4), 767–776.*
- Fisk, L. M., Maccarone, L. D., Barton, L., y Murphy, D. V. (2015). Nitrapyrin decreased nitrification of nitrogen released from soil organic matter but not amoA gene abundance at high soil temperature. *Soil Biology and Biochemistry, 88, 214–223.*
- Grosso, S. J. Del, y Parton, W. J. (2011). Quantifying Nitrous Oxide Emissions from Agricultural Soils and Management Impacts.
- Grove, J. H. (2006). Nitrapyrin (N-Serve) With Anhydrous Ammonia At/Near Corn

- Planting Introduction and Background. *Agronomy notes*, 36(1).
- Hashim, M. M. az, Yusop, M. K., Othman, R., y Wahid, S. A. (2015). Characterization of Nitrogen Uptake Pattern in Malaysian Rice MR219 at Different Growth Stages Using  $^{15}\text{N}$  Isotope. *Rice Science*, 22(5), 250–254.
- Hayatsu, M., Tago, K., Saito, M. (2008). Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition* 54, 33–45. Japón.
- Henríquez, C., Cabalceta, G. 2012. Guía práctica para el estudio introductorio de los suelos con un enfoque agrícola. Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo. San José. Costa Rica.
- IAEA. (2001). *Use of isotope and radiation methods in soil and water management and crop nutrition*. (Vol. 2856). Vienna, Austria.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). (2006). Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories. National Greenhouse Gas Inventories Programme. IGES, Japon.
- Jena, J., Ray, S., Srichandan, H., Das, A., y Das, T. (2013). Role of Microorganisms in Emission of Nitrous Oxide and Methane in Pulse Cultivated Soil Under Laboratory Incubation Condition. *Indian Journal of Microbiology*, 53(1), 92–99.
- Li, B., Fan, C. H., Xiong, Z. Q., Li, Q. L., y Zhang, M. (2015). The combined effects of nitrification inhibitor and biochar incorporation on yield-scaled  $\text{N}_2\text{O}$  emissions from an intensively managed vegetable field in southeastern China. *Biogeosciences*, 12(6), 2003–2017.
- MAG. (2008). Agro-cadena de la ganadería bovina de carne de la Región Chorotega: Manual de recomendaciones para el manejo sostenible de la ganadería bovina de carne en la Región Chorotega. San José, C.R. pp. 72.

- Martineau, H., Wiltshire, J., Webb, J., Hart, K., Keenleyside, C., Baldock, D., ... Watterson, J. (2016). Effective performance of tools for climate action policy - meta - review of Common Agricultural Policy (CAP) mainstreaming, (340202), 287.
- Martins, M. R., Sant'Anna, S. A. C., Zaman, M., Santos, R. C., Monteiro, R. C., Alves, B. J. R., ... Urquiaga, S. (2017). Strategies for the use of urease and nitrification inhibitors with urea: Impact on N<sub>2</sub>O and NH<sub>3</sub> emissions, fertilizer-15N recovery and maize yield in a tropical soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 247(June), 54–62.
- Mata, R., Vázquez, A., Rosales, A., y Salazar, D. (2016). Mapa digital de suelos de Costa Rica. *Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo, San José, CRC*. Escala, 1, 200000.
- Mathieu, O., Hénault, C., Lévêque, J., Baujard, E., Milloux, M. J., y Andreux, F. (2006). Quantifying the contribution of nitrification and denitrification to the nitrous oxide flux using 15N tracers. *Environmental Pollution*, 144(3), 933–940.
- McTaggart, I. P., Clayton, H., Parker, J., Swan, L., y Smith, K. A. (1997). Nitrous oxide emissions from grassland and spring barley, following N fertilizer application with and without nitrification inhibitors. *Biology and Fertility of Soils*, 25(3), 261–268.
- Montenegro, J., y Herrera, J. (2013). Emisión del óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) en el sistema de producción café sin sombra en Costa Rica. *Tópicos Meteorológicos y Oceanográficos del IMN*, 12(ISSN 1409-2034), 22–34.
- Montenegro, J., y Abarca, S. (2002). Los sistemas silvopastoriles y el calentamiento global: un balance de emisiones. *Agronomía Costarricense*, 26(1), 17–24.
- Müller, C., Laughlin, R. J., Spott, O., y Rütting, T. (2014). Quantification of N<sub>2</sub>O emission

- pathways via a  $^{15}\text{N}$  tracing. *Soil Biology y Biochemistry*, 72(3), 44–54.
- Nauer, P. A., Fest, B. J., Visser, L., y Arndt, S. K. (2018). On-farm trial on the effectiveness of the nitrification inhibitor DMPP indicates no benefits under commercial Australian farming practices. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 253(September 2017), 82–89.
- Nilson, V., Sanchez, P., Manfredi, R. 2005. Hierbas y arbustos comunes en cafetales y otros cultivos: Guía para su identificación. San José, Costa Rica. pp. 13.
- Ruser, R., y Schulz, R. (2015). The effect of nitrification inhibitors on the nitrous oxide ( $\text{N}_2\text{O}$ ) release from agricultural soils-a review. *Plant Nutrition and Soil Science*.
- Saggar, S., Jha, N., Deslippe, J., Bolan, N. S., Luo, J., Giltrap, D. L., ... Tillman, R. W. (2013). Denitrification and  $\text{N}_2\text{O}$ :  $\text{N}_2$  production in temperate grasslands: Processes, measurements, modelling and mitigating negative impacts. *Science of the Total Environment*, 465, 173–195.
- Sey, B. K., Manceur, A. M., Whalen, J. K., Gregorich, E. G., y Rochette, P. (2008). Small-scale heterogeneity in carbon dioxide, nitrous oxide and methane production from aggregates of a cultivated sandy-loam soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9), 2468–2473.
- Smith, P., Martino, D., Howden, M., Rypdal, K., wa Githendu, M., Martino, D., ... Kumar, P. (2007). Coordinating Lead Authors: Contributing Authors. *Canada*), *Genxing Pan*.
- Snyder, C. S. (2017). Enhanced nitrogen fertiliser technologies support the “4R” concept to optimise crop production and minimise environmental losses. *Soil Research*, 55(5–6), 463–472.
- Sutka, R., Ostrom, N., Ostrom, P., Gandhi, H., Breznak, J. (2003) ‘Nitrogen isotopomer site

- preference of N<sub>2</sub>O produced by *Nitrosomonas europaea* and *Methylococcus capsulatus bath*’, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17 (738–745).
- Trenkel. (2013). Slow and Controlled-Release and stabilized Fertilizers. *Chemical Information and Modeling* (Vol. 53).
- Verhulst, N., Grahmann, K., Cox, R., y Govaerts, B. (2015). Eficiencia del uso de nitrógeno y optimización de la fertilización nitrogenada en la agricultura de conservación. *Mas Agro*, 12.
- Villalobos, L. y Arce, J. (2014). Evaluación agronómica y nutricional del pasto estrella africana (*Cynodon nlemfuensis*) En la zona de Monteverde, Puntarenas, Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 38(1), 133–145.
- Vistoso, E., Alfaro, M., Saggat, S., y Salazar, F. (2012). Effect of Nitrogen Inhibitors on Nitrous Oxide Emissions and Pasture Growth After an Autumn Application in Volcanic Soil. *Chilean journal of agricultural research*, 72(1), 133–139.
- Wang, J., Wang, L., Feng, X., Hu, H., Cai, Z., Müller, C., y Zhang, J. (2016). Soil N transformations and its controlling factors in temperate grasslands in China: A study from 15N tracing experiment to literature synthesis. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 121(12), 2949–2959.
- Zaman, M., Nguyen, M. L.(2012). How application timings of urease and nitrification inhibitors affect N losses from urine patches in pastoral system. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 156, 37– 48
- Zaman, M., Nguyen, M. L., Šimek, M., Nawaz, S., Khan, M. J., Babar, M. N., y Zaman, S. (2012). Emissions of Nitrous Oxide (N<sub>2</sub>O) and Di-Nitrogen (N<sub>2</sub>) from the Agricultural Landscapes, Sources, Sinks, and Factors Affecting N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub>

Ratios. *Greenhouse Gases – Emission, Measurement and Managemen.*

Zhang, J., Müller, C., y Cai, Z. (2015). Heterotrophic nitrification of organic N and its contribution to nitrous oxide emissions in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 84, 199–209.

Zhu, X., Burgerb, M., Doane, T., Horwath, W. (2013) Ammonia oxidation pathways and nitrifier denitrification are significant sources of N<sub>2</sub>O and NO under low oxygen availability. *PNAS*.110 (16) 6328–6333

## 10 Anexos

### Anexo 1. Cálculos para dosificación de Urea

<b>a. Determinación de la cantidad de N por aplicar en ensayos con <sup>15</sup>N.</b>  Fuente: Cabrera & Kissel 1989. Review and simplification of calculations in <sup>15</sup> N tracer studies. Fertilizer Research 20: 11-15  1 mol N = 14,0067 g	<b>b. Determinación de % abundancia de <sup>15</sup>N necesaria en el fertilizante marcado</b>  Espectrómetro de masas puede determinar la abundancia natural de <sup>15</sup> N con una precisión de 0,366 % átomos <sup>15</sup> N Para una precisión en la medición de 10% El valor más bajo de cualquier muestra de suelo o planta evaluada debería ser ≥ 0,376 % átomos <sup>15</sup> N (Nivel final At % ab) Si deseamos detectar la incorporación de 4.61 mmoles de fertilizante N por kg de suelo en un suelo con 399.8 mmoles de N por kg de suelo Incorporación de 4,6132 mmoles Inventario N orgánico 399,8 mmoles N/kg suelo Prop Fert = 0,011 0,989 Moles x detectar 0,0005 Fert At % ab.= <b>1,243 % at. <sup>15</sup>N en abundancia</b>														
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th colspan="2" style="text-align: center;">En campo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="width: 70%;">Dosis de N a aplicar / ha</td> <td style="text-align: right;">42 kg N/ha</td> </tr> <tr> <td>Área de la parcela</td> <td style="text-align: right;">1 m<sup>2</sup></td> </tr> <tr> <td>Cantidad N a aplicar</td> <td style="text-align: right;">0,300 moles de N/m<sup>2</sup></td> </tr> <tr> <td>Densidad aparente del suelo</td> <td style="text-align: right;">0,65 kg/dm<sup>3</sup></td> </tr> <tr> <td>kg suelo</td> <td style="text-align: right;">650000 kg/ha</td> </tr> <tr> <td>Cantidad N a aplicar</td> <td style="text-align: right;">0,00461 moles N/kg suelo</td> </tr> </tbody> </table>	En campo		Dosis de N a aplicar / ha	42 kg N/ha	Área de la parcela	1 m <sup>2</sup>	Cantidad N a aplicar	0,300 moles de N/m <sup>2</sup>	Densidad aparente del suelo	0,65 kg/dm <sup>3</sup>	kg suelo	650000 kg/ha	Cantidad N a aplicar	0,00461 moles N/kg suelo	
En campo															
Dosis de N a aplicar / ha	42 kg N/ha														
Área de la parcela	1 m <sup>2</sup>														
Cantidad N a aplicar	0,300 moles de N/m <sup>2</sup>														
Densidad aparente del suelo	0,65 kg/dm <sup>3</sup>														
kg suelo	650000 kg/ha														
Cantidad N a aplicar	0,00461 moles N/kg suelo														
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th colspan="2" style="text-align: center;">En invernadero</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="width: 70%;">% N suelo</td> <td style="text-align: right;">0,56</td> </tr> <tr> <td>N total/kg</td> <td style="text-align: right;">0,0056 kg N/kg suelo</td> </tr> <tr> <td>Inventario N suelo</td> <td style="text-align: right;">0,400 moles N/kg suelo</td> </tr> <tr> <td>Masa suelo</td> <td style="text-align: right;">0,943 kg suelo</td> </tr> <tr> <td>N total/maceta t=0</td> <td style="text-align: right;">0,005278 kg N 0,0609 g N/maceta</td> </tr> <tr> <td>Cantidad N a aplicar</td> <td style="text-align: right;"><b>0,0043</b> moles de N/maceta</td> </tr> </tbody> </table>	En invernadero		% N suelo	0,56	N total/kg	0,0056 kg N/kg suelo	Inventario N suelo	0,400 moles N/kg suelo	Masa suelo	0,943 kg suelo	N total/maceta t=0	0,005278 kg N 0,0609 g N/maceta	Cantidad N a aplicar	<b>0,0043</b> moles de N/maceta	
En invernadero															
% N suelo	0,56														
N total/kg	0,0056 kg N/kg suelo														
Inventario N suelo	0,400 moles N/kg suelo														
Masa suelo	0,943 kg suelo														
N total/maceta t=0	0,005278 kg N 0,0609 g N/maceta														
Cantidad N a aplicar	<b>0,0043</b> moles de N/maceta														
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th colspan="3" style="text-align: center;">Masa de macetas</th> </tr> <tr> <th style="width: 30%;">Código</th> <th style="width: 30%;">kg s seco</th> <th style="width: 40%;">Unidad</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>MA</b> (Maceta condición A)</td> <td style="text-align: center;">0,943</td> <td style="text-align: center;">kg suelo</td> </tr> </tbody> </table>	Masa de macetas			Código	kg s seco	Unidad	<b>MA</b> (Maceta condición A)	0,943	kg suelo						
Masa de macetas															
Código	kg s seco	Unidad													
<b>MA</b> (Maceta condición A)	0,943	kg suelo													

## Anexo 2. Cálculos para dosificación de Urea

<b>Preparación del fertilizante marcado</b>			
Fuente: Cabrera & Kissel 1989. Review and			
<b>a. Proporción de átomos de N necesarios a partir de fuente marcada y sin marcar</b>			
Abundancia natural	0.366 % de átomos <sup>15</sup> N		
Si tenemos una fuente de fertilizante que contiene	5.23 % at <sup>15</sup> N en abundancia		
y se desea preparar un fertilizante marcado que conteng	2 % at <sup>15</sup> N en abundancia		
	proporción de todos los		
E =	0.336 átomos de N en la		
1-E =	0.664 proporción de átomos de N procedentes de la fuente de dilución		
Los moles necesarios de cada fuente son los siguientes:			
moles provenientes de 0.366 at % <sup>15</sup> N ab =	0.00289	moles provenientes de	0.00146
		5.23 at % <sup>15</sup> N ab.=	
<b>b. Peso de N necesario de cada fuente</b>			
1 mol <sup>15</sup> N =	15.000 g	1 mol <sup>14</sup> N =	14.003 g
MM (diluido) =	14.007 g	urea no marcada	60.05 g
MM (enriquecido) =	14.055 g	MM urea marcada	60.15 g
g N de fuente con 0.366 % <sup>15</sup> N ab.	0.040 g	g N total	0.06097 g
g N de fuente con 5.27 % <sup>15</sup> N ab.	0.021 g		
<b>c. Preparación de disoluciones</b>			
Número unidades experimentales. Ej macetas	40	Volumen mínimo balón de aforo	2
Volumen máximo a aplicar	0.050		
		g urea /L	g N/L
Urea NO marcada	0.08670 g/maceta	<b>3.4681</b>	1.61774456
Urea marcada 15N	0.04401 g/maceta	<b>1.7605</b>	0.8227364
Total urea	0.13072	5.2287	2.44048096
Vol aplicado disolución MA	0.050 L	g N aplic/maceta	<b>0.12202 g</b>

Anexo 3. Hoja de Cálculo para “Análisis de Datos Picarro G5102-i”

**Anexo**

=Dato ingresado por el usuario

Parámetro	Valor	Unidad
Radio de la maceta	0.0717	m
Altura de la Maceta	0.094	m
Volumen muerto	0.00006	m <sup>3</sup>
Radio superior de la cámara	0.125	m
Radio inferior de la cámara	0.115	m
Altura de la cámara	0.272	m
Presión atmosférica	88200	Pa
Temperatura Ambiente	24.50	°C
Constante del gas ideal	8.31	J/mol K
Diámetro interno de manguera 1:	0.318	cm
Longitud de manguera 1:	0.9	m
Diámetro interno de manguera 2:	0.635	cm
Longitud de manguera 2:	1.08	m

Parámetro	Fórmula	Resultado	Unidad
Volumen del sistema	$V = V_c - V_m + E$	0.0109	m <sup>3</sup>
kg suelo	MA	0.9425	kg
Volumen de la cámara	$V_c = \pi [r_c]^2 h_c$	0.0123	m <sup>3</sup>
Volumen de manguera	$E = \pi \left(\frac{D_i}{2}\right)^2 L$	0.00004133	m <sup>3</sup>

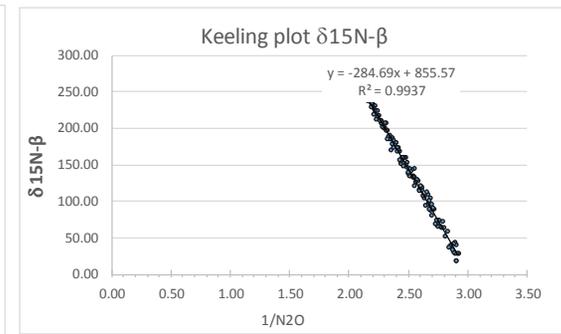
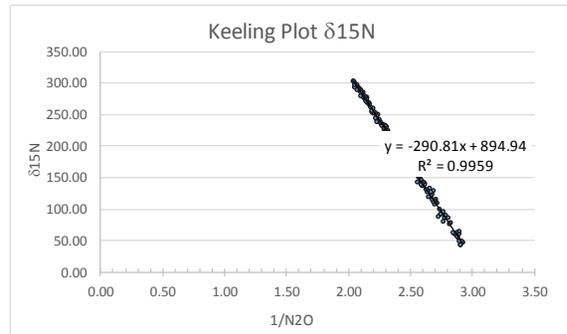
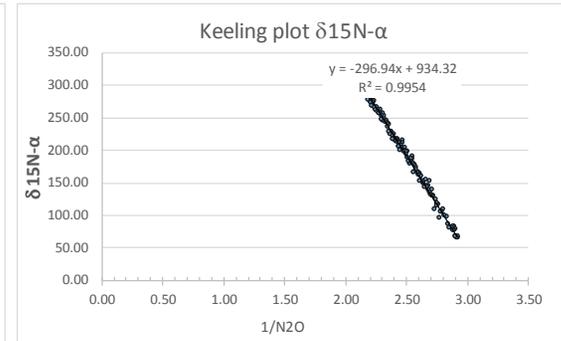
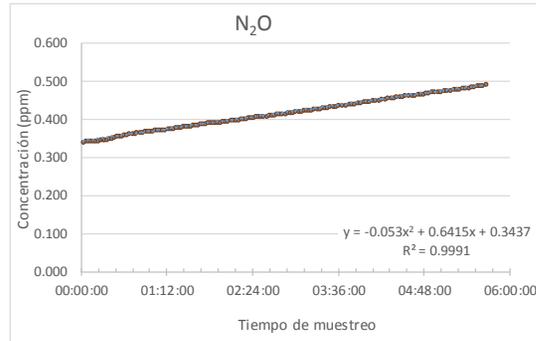
Moles de aire	$n_A = (PV)/(RT)$	0.38782	mol
---------------	-------------------	---------	-----

Parámetro	Fórmula	Resultado	Unidad
		N2O	
Flujo de gas	---	0.00064	ppm/h
Fracción molar	$Y = f / (1x[10]^6)$	6.41E-10	mol/(mol h)
Masa molar	---	28.0134	g/mol
Tasa de emisión*	$E = (Y n_A MM) / kg_{ss}$	0.007394	µg N-N <sub>2</sub> O/(kg <sub>ss</sub> h)

\*=no se admiten valores negativos de emisión de N2O, en caso de

En campo  $E = (Y n_A MM) / A$

Anexo							
Tiempo		Unidad	N° de fila				
Hora de inicio	19:41:16	min	32				
Duración medición	14.0						
Inicio del cálculo	19:43						
Fin del cálculo	19:57						
Cálculo de Regresión	<b><math>Cn=At+B</math></b>						
		A	B	R <sup>2</sup>			
	N <sub>2</sub> O	0.629	0.344	0.999			
	Keeling Plot 15N	-290.8	895	0.996			
	Keeling plot δ15N α	-296.9	934	0.995			
				Keeling plot δ15N β	-284.7	856	0.994
Cálculo de regresión <b><math>Cn=At^2+Bt+C</math></b>							
	A	B	C				
N <sub>2</sub> O	-0.053	0.641	0.344				
R <sup>2</sup>	0.999						
Sugerido	EXP						



**Anexo**  
**Resumen de resultados**

English version

Día de última fertiliza: **31/08/2016**    **Unidad**  =Dato ingresado por el usuario

Número de maceta	19	---
Tiempo inicial	2.5	min
Presión atmosférica	882	hPa
Temperatura ambiente	24.5	°C

**RESULTADOS**

fecha del análisis	Código archivo	Días después de fertilización	Maceta N°	Emisión de N-N <sub>2</sub> O µg/(kg ss h)	δ <sup>15</sup> N	δ <sup>15</sup> N-α	δ <sup>15</sup> N-β	α-β	R <sup>2</sup> N <sub>2</sub> O	R <sup>2</sup> d <sup>15</sup> N	R <sup>2</sup> δ <sup>15</sup> N-α	R <sup>2</sup> δ <sup>15</sup> N-β
20/09/2016	07:41:16 p.m.	20	19	0.00739	895	934	856	79	0.999	0.996	0.995	0.994