Centro Tecnológico Agrario y Agroalimentario
Avda. de Madrid, 44
C.U. La Yutera, Edificio A
34004 Palencia

Teléfonos: 979.108.303/66
Fax: 979165970
Correo electrónico: info@itagra.com
www.itagra.com

MEMORIA TÉCNICA

Proyecto OZOSOL.

Aplicaciones del ozono en desinfección de suelos agrícolas destinados al cultivo de planta de fresa.

Fecha	Versión	Código	Realizado por
30/06/2011	1	-	Área de I+D+I

Contenido

1 INTRODUCCIÓN 2
2 OBJETIVO 3
3 MONTAJE DEL LABORATORIO Y ENSAYOS PREVIOS. 3
3.1 EQUIPO GENARADOR DE OZONO. 3
3.2 MONTAJE DEL EQUIPO Y SELECCIÓN DEL SUSTRATO (O DEL SUELO) 5
3.3 ENSAYOS PREVIOS. 6
4 ENSAYOS DE DESINFECCIÓN DE SUELOS. 11
4.1 RECUENTO DE MOHOS Y LEVADURAS 11
4.2 MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS A 31º 14
4.3 ANÁLISIS DE HONGOS PATÓGENOS DE LA FRESA 20
4.4 INFLUENCIA EN LA RESPIRACIÓN MICROBIANA. RESPIROMETRÍA. 26
4.5 ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS SUELOS 30
4.6 HIERBAS ADVENTICIAS 34
4.7 TEST DE ZUCCONI 36
4.8 TEST DE JUSTE 38
5 CONCLUSIONES 40
6 ACTUACIONES DE DIFUSIÓN REALIZADAS 41
7 BIBLIOGRAFÍA 3

1 INTRODUCCIÓN

La lucha reciente a nivel mundial contra el uso del Bromuro de Metilo para la desinfección crea un problema importante para los países productores de frutas y hortalizas, al mismo tiempo que se continúa la búsqueda de alternativas viables. La tendencia de la actividad agrícola en el ámbito mundial, de reducir la dependencia de químicos sintetizados y el tamaño de las áreas dedicadas a la agricultura, sin que esto afecte el volumen y la calidad de la producción de alimentos, ha impulsado a los investigadores a generar alternativas que permitan hacer más eficiente la producción con menor uso de agroquímicos.

La desinfección de los suelos, se lleva a cabo frecuentemente en cultivos intensivos, y tiene el objeto de evitar las plagas que afectan a las plantas y que pueden hacer peligrar la producción de dicho cultivo. Las técnicas de desinfección física tienen como principal problema su elevado coste de aplicación, por la cantidad de mano de obra necesaria para su aplicación o su coste energético, mientras que la desinfección química tiene dos problemas principales: la elevada toxicidad de los productos químicos utilizados, que requiere una utilización especializada y cuidadosa, y la ilegalización de muchos de los compuestos utilizados para desinfección, de acuerdo con la "Lista Única Comunitaria de Sustancias Activas" (cuyas bases fueron marcadas por la Directiva 91/414/CEE y trasladadas en España al Real Decreto 2163/94).

El ozono sin embargo, es una sustancia de rápida biodegradación, y si poseyese capacidad desinfectante, su aplicación como fitosanitario redundaría en una mejora de la salubridad de la producción. La acción biocida del ozono se debe fundamentalmente a los radicales activos que reaccionan con diversos componentes orgánicos de las células animales, vegetales y microorganismos. Estos mecanismos son muy poco conocidos, pero se basan en el alto potencial reductor o de oxidación que tienen las disoluciones de ozono. El mecanismo de desinfección de la ozonización se basa en el alto poder del ozono como oxidante protoplasmático general. Esta condición convierte al ozono en un eficiente destructor de bacterias y la evidencia sugiere que es igual de efectivo para atacar virus, esporas y quistes resistentes de bacterias y hongos.

En el presente estudio, se han investigado varios aspectos relacionados con la capacidad del ozono en la desinfección de los suelos. Sin embargo, algunos de los resultados obtenidos han dado pié a pensar que esta sustancia tiene otras aptitudes destinadas a la mejora de la agricultura, y que deben ser investigados dadas las ventajas que puede conllevar en Castilla y León. En esta memoria se han trazado hipótesis sobre ciertas aplicaciones alternativas que el ozono puede tener, y que están basadas en las experiencias recogidas de este estudio. Sin embargo, el tiempo requerido para su desarrollo e investigación hacen imposible la comprobación de su veracidad en el transcurso del

presente estudio. No obstante, ITAGRA.CT para aprovechar el potencial que el ozono tiene en el sector agrícola, pondrá todos los medios a su alcance para procurar que estas líneas de investigación continúen en estudios posteriores,

2 OBJETIVO

El objetivo general del proyecto consiste en el estudio de la aptitud del ozono como fitosanitario para la desinfección de suelos destinados al cultivo de hortícolas, orientado sobre todo a la planta de fresa. Se pretende comprobar si es una alternativa viable y medioambientalmente sostenible, mediante la realización de diversos ensayos orientados a analizar la eficacia del ozono en la eliminación de patógenos del suelo y las hierbas adventicias. Asimismo, se estudia si la aplicación de ozono produce algún efecto fitotóxico en las plantas cultivadas que dificulte su desarrollo.

3 MONTAJE DEL LABORATORIO Y ENSAYOS PREVIOS.

Previamente al inicio de los ensayos que constituyen el objetivo del proyecto, orientados a evaluar la eficacia del ozono como desinfectante, ha sido necesaria la puesta a punto de un generador de ozono así como de su circuito complementario para el tratamiento de suelos.

Posteriormente, ha sido necesaria la elección del suelo con el que realizar los ensayos, lo que ha requerido un amplio periodo de tiempo, que finalmente ha sido mayor del previsto, debido a la dificultad para encontrar un suelo que se adaptará completamente a las características requeridas.

Con ello se ha considerado necesario realizar previamente dos pruebas orientadas a evaluar la importancia de factores específicos que pudieran influir en los resultados de los ensayos que constituyen el proceso de desinfección mediante ozono: la presencia de materia orgánica y el proceso de sellado.

A continuación se describen estos extremos:

3.1 EQUIPO GENERADOR DE OZONO.

El generador de ozono utilizado en el presente estudio es de fabricación y tecnología Hindú: se trata del modelo OG100, de la marca Beta Computronincs, con una alta eficiencia, y diseñado para cumplir unas condiciones ambientales exigentes. Cuenta con un microcontrolador en el interior del circuito,

que controla todas las funciones importantes al mismo tiempo que proporciona protección frente a posibles problemas de funcionamiento.

Sus especificaciones técnicas son las siguientes:

Producción máxima O_3 :	10 g/h
Concentración máxima:	100 g/m3
Presión gas de alimentación:	hasta 2 bares
Caudal gas de alimentación:	hasta 8 l/min
Consumo eléctrico:	200 W
Dimensiones y peso:	406 x 304 x 175 mm, 16 kg

Figura 1. Generador Beta Computronincs de Fabricación y tecnología hindú.

Para llevar a cabo los ensayos, se ha optado por utilizar oxígeno como gas de alimentación a un caudal continúo de 1l/min. De este modo, se consigue que el rendimiento del generador se optimice, consiguiendo la producción máxima nominal de ozono.

Figura 2. Manorreductor acoplado en la botella de O_2 que alimenta al generador de ozono.

3.2 MONTAJE DEL EQUIPO Y SELECCIÓN DEL SUSTRATO

Con este equipo se aplica el ozono a través de un difusor. Éste se introduce en un recipiente que contiene el suelo, situándose en el centro del sustrato para que la ozonización sea homogénea. Los materiales, recipientes, manguitos, llaves, etc. deben ser resistentes al gran poder oxidante del ozono. Preferiblemente serán de polietileno o silicona por ser estos materiales más resistentes a la oxidación y a la degradación.

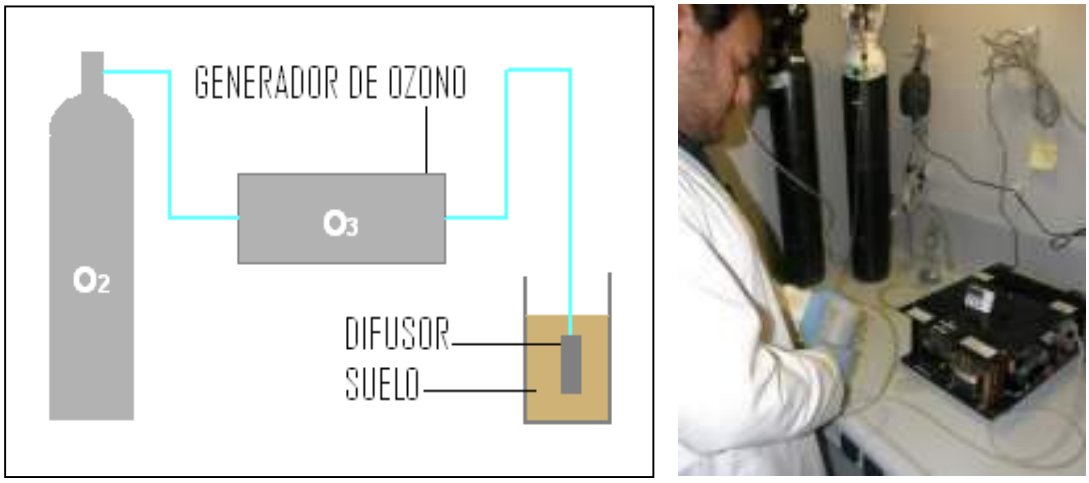


Figura 3. Esquema y fotografía del dispositivo para la aplicación de ozono en el suelo.

Los sustratos que se utilizaron, se seleccionaron de tal forma que uno de ellos fuera un suelo agrícola donde se había cultivado fresa, con un contenido en materia orgánica bajo. El otro sustrato es turba (con alto porcentaje de materia orgánica), para comprobar la reacción del ozono en un ambiente muy rico en materia orgánica.

Para la selección del suelo agrícola, se tomaron muestras de sustrato de diferentes lugares, y se analizaron los siguientes parámetros, materia orgánica, textura y aerobios mesófilos. Se escogió fundamentalmente un suelo con textura arenosa (el utilizado en el cultivo de la fresa), y con niveles altos de aerobios mesófilos. Este suelo no ha recibido tratamiento fitosanitario el año del ensayo, por lo que está libre de herbicidas, y fungicidas. Además, los patógenos que estén presentes, se presupone que son específicos de la fresa, que es el objetivo del estudio.

A continuación se muestra el análisis inicial del suelo utilizado en el estudio.

itagra.ct

101122

INFORME DE RESULTADOS

Cliente : Unidad de Agroingeniería y M. Ambiente ITAGRA
NIF : Q-3419144E
Domicilio : Avda. Madrid 44 (La Yutera)
Población : 34004 PALENCIA (PALENCIA)

Núm.Boletín: 3467 Reg. Salida: 1269

Nº Muestra: 101122

Registro muestra : 07/06/2010
Inicio análisis : 07/06/2010
Finalización análisis : 16/06/2010

Muestra de : Suelo

Referencia : Parcelas

Nombre Determinación	Resultado	Método
Arena ISSS	78.12 %	Densímetro Bouyoucos
Limo ISSS	9.00 %	Densímetro Bouyoucos
Arcilla ISSS	12.88 %	Densímetro Bouyoucos
Textura ISSS	Franco-arenoso	
Materia orgánica oxidable	0.07 %	Walkey-Black. PNT-S-06
Aerobios mesófilos	4.0x10⁶ ufc/g	

La muestra fue facilitada por el propio cliente. El análisis sólo da fe de la muestra recibida.
Este boletín no se puede reproducir parcialmente sin la aprobación por escrito de la entidad emisora.

Emitido por: Laboratorio

PALENCIA, 16 de Junio de 2010

Director técnico del laboratorio

MARTA SÁNCHEZ MARTÍN

Figura 4. Análisis inicial del suelo utilizado en el estudio.

3.3 ENSAYOS PREVIOS.

En esta fase se realizaron diferentes ensayos en laboratorio para comprobar posibles interferencias en la desinfección debido a dos factores que pueden ser de influencia: uno relacionado con la composición del suelo, y otro con la práctica de ciertas labores.

Estos factores específicos han sido los siguientes:

- Influencia del ozono en la materia orgánica presente en el suelo.
- Influencia del sellado del suelo tras la aplicación de ozono.

3.3.1 INFLUENCIA DEL OZONO EN LA MATERIA ORGÁNICA PRESENTE EN EL SUELO

A. Metodología

En experiencias anteriores realizadas por ITAGRA.CT (Proyecto OZOFIT), se observó que al aplicar ozono sobre el suelo, se producía un ascenso de la temperatura en el sustrato, lo que demuestra que el ozono reacciona con la materia orgánica de algún modo. Por este motivo, se realizaron varios ensayos donde se aplicaron diferentes tratamientos de ozono, analizando posteriormente la materia orgánica del suelo, para comprobar si varía su contenido.

Los tratamientos se llevaron a cabo variando el tiempo de aplicación de ozono en el suelo, y el contenido en materia orgánica del suelo. Para ello se utilizó el suelo agrícola anteriormente seleccionado y turba, con 0,74% y 42,43% de materia orgánica oxidable respectivamente.

B. Resultados.

En la siguiente tabla se recogen los tratamientos que se realizaron y los resultados obtenidos.

Tabla 1. Resultados de la variación de materia orgánica tras la aplicación de ozono.

Tratamiento	Tipo de sustrato	Aplicación de ozono en el suelo (minutos)	Materia orgánica tras aplicación de ozono (% sms)
Su.0	Suelo agrícola	0'	MO oxidable: 0,74
Su. 1+1	Suelo agrícola	1`+1`	MO oxidable: 0,74
Su. 2+2	Suelo agrícola	2`+2`	MO oxidable: 0,67
Su.15	Suelo agrícola	15'	MO oxidable: 0,42
Su.30	Suelo agrícola	30'	MO oxidable: 0,48
Su.45	Suelo agrícola	45'	MO oxidable: 0,42
Su.60	Suelo agrícola	60'	MO oxidable: 0,28
Su.75	Suelo agrícola	75'	MO oxidable: 0,35
Su.90	Suelo agrícola	90'	MO oxidable: 0,41
Su.105	Suelo agrícola	105'	MO oxidable: 0,3
Tu.0	Turba	0'	MO oxidable: 42,43 MO total: 82,24
Tu.1	Turba	1'	MO oxidable: 43,19 MO total: 82,39
Tu.2	Turba	2'	MO oxidable: 44,71 MO total: 81,28

Tras analizar los datos resultantes, se comprobó que las diferencias entre tratamientos no son significativas, ya que la incertidumbre del método es del 10% sobre el valor obtenido, por lo que las variaciones existentes se asumen dentro de este intervalo de incertidumbre.

Por otra parte, es evidente que el ozono reacciona con la materia orgánica del suelo, ya que la temperatura de éste aumenta cuando se aplica ozono, siendo este ascenso mayor cuanto más alto es el contenido de materia orgánica. Tras la realización del ensayo, se ha demostrado que el nivel de materia orgánica no se ve disminuido por el ozono, sin embargo, es probable que la reacción que se produce no sea la mineralización de la materia, sino un proceso de humificación. Mediante este proceso la materia orgánica se transforma, pero no se degrada hasta compuestos minerales, sino que da lugar a la formación de humus.

Mediante la humificación, la materia orgánica se va transformando de forma natural en el suelo desde materia orgánica fresca hasta humus, pasando por diferentes fases de degradación. En función de su resistencia a la degradación y grado de polimerización se pueden distinguir entre huminas, ácidos fúlvicos y ácido húmicos. Este proceso se produce gracias a la acción de procesos físicos (troceado de la materia orgánica fresca), químicos y biológicos.

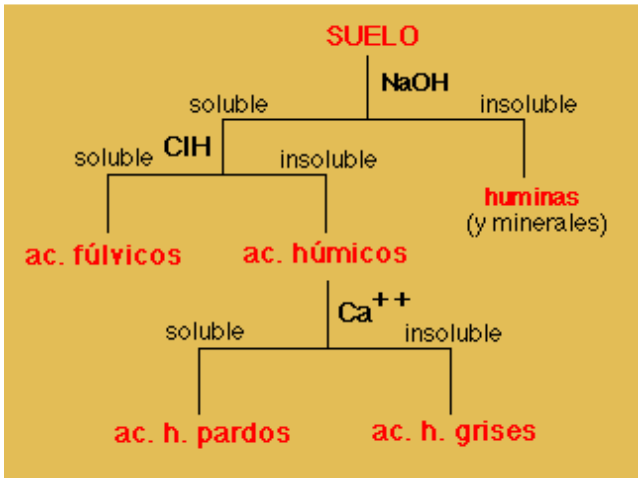


Figura 5. Degradación de la materia orgánica en el suelo.

Este hecho es muy interesante de cara a la utilización de ozono como fitosanitario y beneficioso para los suelos, ya que la humificación es responsable de la acumulación de la materia orgánica en el suelo, mientras que la mineralización conduce a su destrucción. La importancia del humus sobre las propiedades del suelo es fundamental, ya que condiciona muchos factores de calidad de los suelos, como el color, tamaño, forma y consistencia de los agregados, etc.

Estas características influyen en las propiedades del suelo de diferentes modos:

Físicas.

- El color oscuro favorece la absorción de rayos solares, calentando el suelo y favoreciendo la germinación de las semillas.
- Mejora la estructura del suelo, manteniendo una porosidad adecuada que posibilita la presencia de agua y aire en el sustrato, incrementando la capacidad de absorción de agua.
- Aumenta la resistencia a la erosión y compactación del suelo, al favorecer la formación de agregados.

Químicas

- Posee la capacidad de absorber contaminantes, como los pesticidas.
- Aumenta la disponibilidad de nutrientes para que sean absorbidos por las plantas.

Biológicas

- Fomenta la actividad biológica del suelo.
- Favorece la liberación de nutrientes para la alimentación vegetal.

3.3.2 INFLUENCIA DEL SELLADO DEL SUELO TRAS LA APLICACIÓN DE OZONO.

A. Metodología

Este apartado tiene por objeto comprobar si el sellado del suelo mejora la eficacia de la desinfección. Para ello, tras la aplicación del ozono en el suelo, se procedió a efectuar la labor de sellado mediante presión, que en la práctica se realiza en campo con un apero de rodillo. Como tratamiento de referencia se utilizó un suelo previamente esterilizado mediante autoclave, donde la temperatura alcanzó los 121ºC durante 15 minutos.

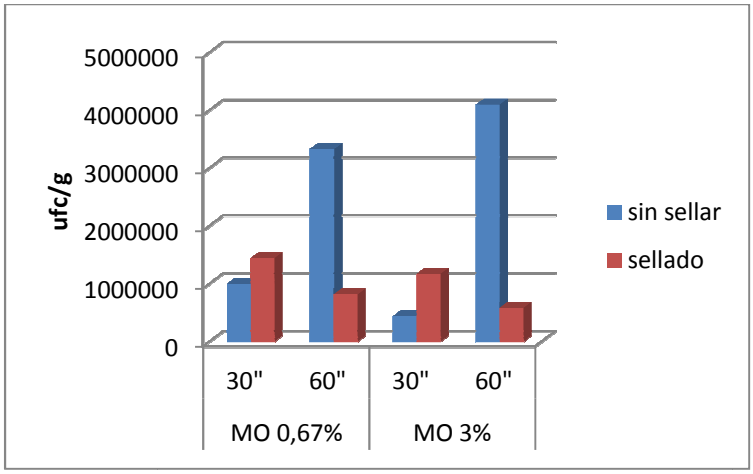
B. Resultados.

Los resultados de este apartado se muestran a continuación, siendo los datos que aparecen la media de las tres repeticiones realizadas.

Tabla 2. Influencia del sellado del suelo en la desinfección mediante ozono.

Tratamiento	Aplicación de ozono (minutos)	Sellado por presión	Materia orgánica (%)	Aerobios mesófilos (ufc/g)
T1	30′	no	0,67	1.000.000
T2			3	440.000
T3		si	0,67	1.443.333
T4			3	1.173.333
T5	60′	no	0,67	3.333.333
T6			3	4.100.000
T7		si	0,67	816.667
T8			3	583.333

En lo que al sellado se refiere, la siguiente gráfica muestra como aumenta la desinfección en las aplicaciones más largas de ozono, es decir, que cuando se utilizan tratamientos de ozono de 30", la desinfección disminuye si se realiza una labor de sellado, pero con tratamientos más largos (de 60"), el sellado aumenta la efectividad del ozono.



Gráfica 1. Influencia del sellado en la desinfección del suelo.

Por lo tanto puede considerarse que el contenido de la materia orgánica no afecta sobre el nivel de desinfección que se alcanza tras la aplicación de ozono. Y en cuanto a la influencia del sellado, no se puede concluir nada al respecto, pues los datos revelan que no existe una tendencia clara al realizar esta práctica sobre los resultados de la desinfección.

En base a los ensayos realizados, los dos factores estudiados en este apartado no se tendrán en cuenta para las pruebas de desinfección.

4 ENSAYOS DE DESINFECCIÓN DE SUELOS.

La presencia de microorganismos patógenos en diversos suelos, pueden constituir un vehículo de transmisión de enfermedades causadas por bacterias patógenas, virus y hongos. Por este motivo, los análisis de parámetros bioquímicos en el suelo, están adquiriendo una gran importancia en la actualidad.

Con los objetivos definidos y partiendo de la situación ya descrita, se afrontaron los ensayos pertinentes en el laboratorio. Estas pruebas están orientadas a esclarecer los efectos producidos por el ozono en los diferentes patógenos del suelo, así como, a evaluar su efecto fitotóxico sobre las plantas que posteriormente ocupen esa tierra de cultivo.
Alguno de los análisis realizados, estudian los procesos microbianos que se producen en el suelo de forma global, mientras que otros son indicadores de procesos específicos.
En los ensayos se ha observado el efecto que la aplicación de ozono provoca sobre:

- Mohos y levaduras
- Microorganismos aerobios mesófilos
- Diversos patógenos específicos de la fresa.
- La respiración microbiana. Respirometría.
- Las propiedades físico químicas de los suelos
- Las hierbas adventicias.

Finalmente, para analizar la fitotoxicidad que la aplicación del ozono produce sobre el cultivo posterior, se han realizado los test de Juste y Zucconi.

4.1 RECUENTO DE MOHOS Y LEVADURAS

Los hongos son organismos eucarióticos, que pueden ser unicelulares o filamentosos, de reproducción sexual o asexual, saprófitos mutualistas o parásitos. Los hongos se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, y se dispersan fácilmente por el aire.
Los hongos engloban los mohos y las levaduras. Los mohos son multicelulares filamentosos cuyo crecimiento se reconoce por su aspecto aterciopelado. Las levaduras crecen en agregados de células independientes, que cuando crecen forman colonias características.

A. METODOLOGÍA

En este primer ensayo de desinfección se orientó a comprobar si la aplicación de ozono podía influir en la población de mohos y levaduras, disminuyendo su presencia en el suelo. Para ello se tomaron cuatro muestras de suelo con alta presencia de patógenos procedentes de un cultivo de fresa. Se aplicó una dosis de ozono de 15 minutos en cada uno de los suelos, y se procedió a realizar el recuento de mohos y levaduras para estudiar la influencia de los tratamientos.

(a)

(b)

Figura 6. Aplicación de ozono en el suelo (a).Preparación de las muestras microbiológicas de mohos y levaduras (b).

Para la evaluación se utilizó la metodología para recuento de mohos y levaduras establecida en la norma ISO 7954 de 1988.

Este método se realiza en medio selectivo OGA (Oxitetraciclina, Glucosa, Agar) que lleva incorporado el antibiótico oxitetraciclina, el cual inhibe de forma eficaz el crecimiento bacteriano. Los pasos a seguir son los siguientes.

- Preparar las siguientes diluciones a partir de las muestras de tierra: 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} (2 repeticiones): 6 placas por tratamiento.
- Añadir con pipetas estériles, a partir de tres de las diluciones decimales 0,1 ml a cada placa con medio OGA.
- Incubar durante 5 días a 25 °C.
- Recuento de placas en las que el número de colonias esté comprendido entre 30 y 300 UFC.

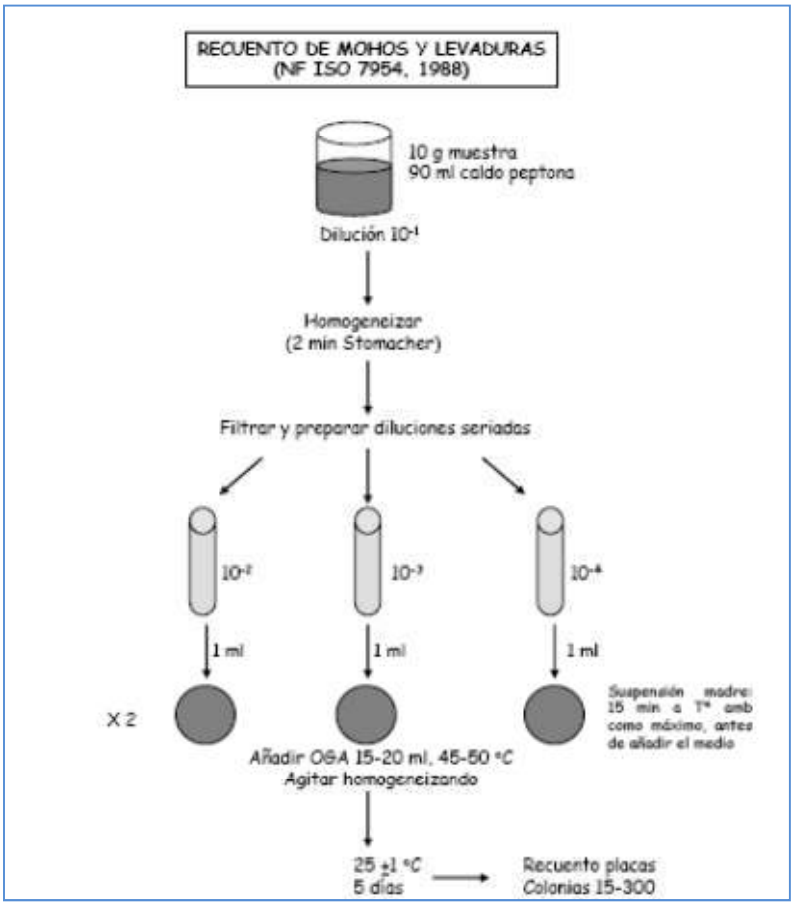


Figura 7. Esquema de la metodología para el recuento de mohos y levaduras.

B. RESULTADOS

No se aprecian variaciones significativas en cuanto a la población de mohos y levaduras, por lo que en principio, y según los resultados del estudio, este tipo de microorganismos no se ve afectado por la aplicación de ozono, en las condiciones en que se han realizado los ensayos.

Tabla 3. Resultados del recuento de mohos y levaduras.

Suelo	Sin tratamiento de ozono	Con tratamiento de Ozono 15´
S1	$2x10^4$	$4x10^3$
S2	$1x10^4$	$4x10^4$
S3	$6x10^4$	$2x10^4$
S4	$1x10^5$	$2x10^5$

4.2 MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS a 31º

En el grupo de los aerobios mesófilos se incluyen todas las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse a 31º C en las condiciones establecidas. En este recuento se estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos.

Un recuento bajo de aerobios mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, de la misma manera que un recuento elevado no significa presencia de flora patógena. Ahora bien, no son recomendables recuentos elevados, ya que puede significar una excesiva contaminación del suelo que puede extenderse a los cultivos establecidos en el terreno.

Los recuentos de microorganismos viables se basan en el número de colonias que se desarrollan en placas previamente inoculadas con una cantidad conocida de muestra e incubadas en unas condiciones ambientales determinadas.

A. METODOLOGÍA

El procedimiento metodológico utilizado es una adaptación de la norma ISO 4833:2003 para determinar los microorganismos aerobios mesófilos en suelos. El modo de proceder fue el siguiente:

- Se determinaron los tratamientos a realizar seleccionando el tiempo de aplicación de ozono en los suelos.
- Se prepararon las siguientes diluciones: 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, a partir de las muestras de tierra.
- A partir de tres de las diluciones decimales, en la cámara de flujo laminar y en condiciones asépticas, se añadieron 0,1 ml a cada placa con medio PCA con pipetas estériles.
- Se colocaron las placas en una estufa, y se incubaron durante 3 días a una temperatura de 31°C.
- Se realizó el recuento de placas de tal forma que el número de colonias esté comprendido entre 30 y 300 ufc.

En todos los ensayos se realizaron 6 repeticiones.

B. RESULTADOS

Los ensayos comenzaron con periodos largos de aplicación de ozono, que abarcaron desde 15 minutos a 1 hora.

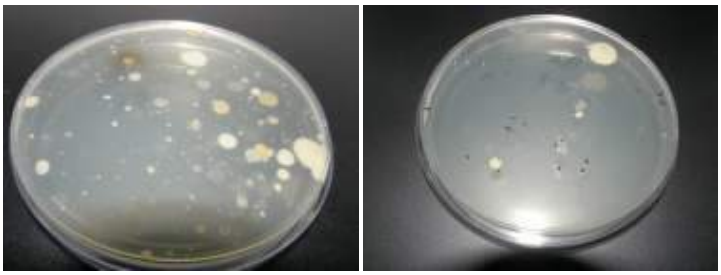


Figura 8. Presencia de aerobios mesófilos en los ensayos.

A continuación se detallan los datos de los resultados de los 5 ensayos que se llevaron a cabo.

Ensayo 1

En la primera prueba se ensayaron cuatro tratamientos que engloban 15, 30 y 60 minutos, así como el testigo, donde no se realizó aplicación de ozono.

Duración aplicación	Aerobios mesófilos (ufc/g)	Desinfección (%)
0´ (Testigo)	5.400.000	-
15´	385.000	92,87
30´	910.000	83,15
60´	775.000	85,65

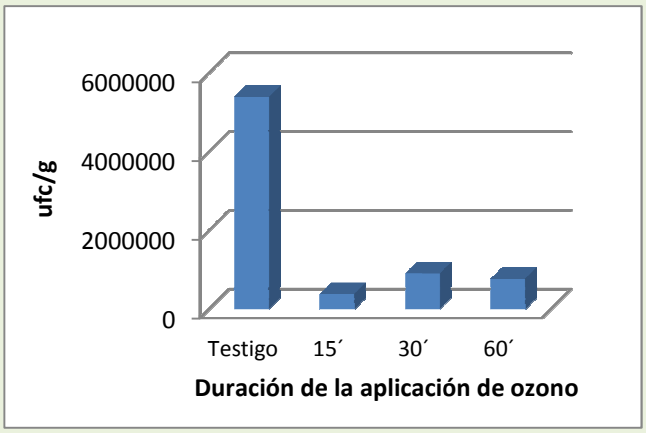


Figura 9. Resultados del ensayo 1.

Los resultados muestran una elevada disminución de la población de aerobios mesófilos, alcanzando la máxima desinfección con 15 minutos de aplicación de ozono en el suelo, que llegó al 92,87%.

Ensayo 2

Los tratamientos que mejor resultados obtuvieron en el primer ensayo se repitieron en este segundo, como se indica a continuación.

Duración aplicación	Aerobios mesófilos (ufc/g)	Desinfección (%)
0´ (Testigo)	2.100.000	-
15´	543.333	74,13
60´	283.333	86,51

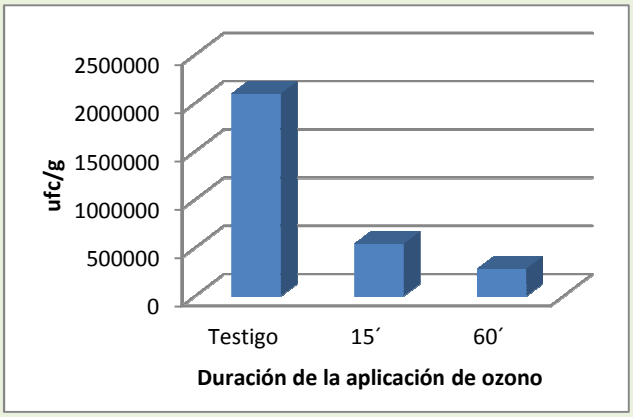


Figura 10. Resultados del ensayo 2.

Se puede observar como la desinfección conseguida fue también elevada en los dos casos estudiados, aunque la reducción de aerobios mesófilos respecto al testigo fueron algo menores que en el primer ensayo.

Ensayo 3

En este ensayo se estudió la influencia de una doble aplicación de ozono, donde se analizaron los resultados de desinfección tras tratar los suelos durante los siguientes periodos de tiempo:

- 15 minutos
- 15 + 15 minutos, donde se realizó la segunda aplicación tras un intervalo de un minuto respecto a la primera.
- 60 minutos
- 60 + 60 minutos, donde se realizó la segunda aplicación tras un intervalo de un minuto respecto a la primera.

Duración aplicación	Aerobios mesófilos (ufc/g)	Desinfección (%)
0´ (Testigo)	3.833.333	-
15	535.000	86,04
15+15	180.000	95,30
60	390.000	89,83
60+60	210.000	94,52

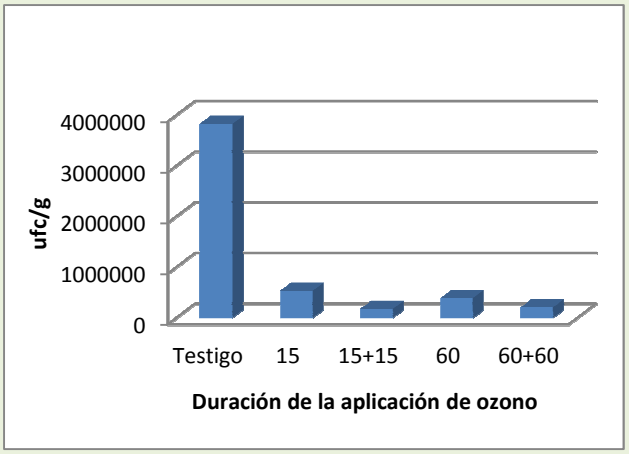


Figura 11. Resultados del ensayo 3.

En los datos obtenidos se observa como la desinfección ha sido efectiva, ya que en los cuatro tratamientos ha sido superior al 86%. Por otro lado, la influencia de una doble aplicación es positiva, ya que el porcentaje de desinfección es mayor, pero como se observa en la gráfica, la diferencia es muy pequeña entre los tratamientos 15′ y 15′+15′, así como entre 60′, 60′+60′, lo que indica que los resultados no son proporcionales al esfuerzo que conlleva la aplicación doble.

Ensayo 4

Los tratamientos que se llevaron a cabo en este ensayo se orientaron a estudiar tiempos cortos de ozonización, que daría lugar a procesos de desinfección más económicos en caso de aplicarse a escala real.

Duración aplicación	Aerobios mesófilos (ufc/g)	Desinfección (%)
0′ (Testigo)	3.336.429	-
1′	1.005.000	69,88
1+1	861.667	74,17
2	861.667	74,17
2+2	907.500	72,80

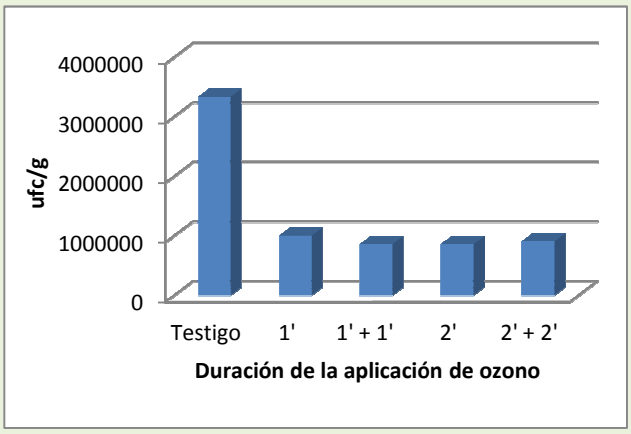


Figura 12. Resultados del ensayo 4.

Los resultados muestran como con una menor duración en la aplicación de ozono, también se alcanzan desinfecciones elevadas, aunque han sido ligeramente menores a los anteriores ensayos. No se han observado diferencias significativas entre los cuatro tratamientos.

Ensayo 5

Para verificar si la eficacia de la desinfección aumenta al realizar el tratamiento en dos fases, se llevaron a cabo dos tipos de aplicación de ozono:

- 1′+1′ con un intervalo de un minuto entre cada aplicación.
- 2′ en una sola aplicación.

Duración aplicación	Aerobios mesófilos (ufc/g)	Desinfección (%)
0´ (Testigo)	5.100.000	-
1+1	1.625.000	69,61
2	1.550.000	68,14

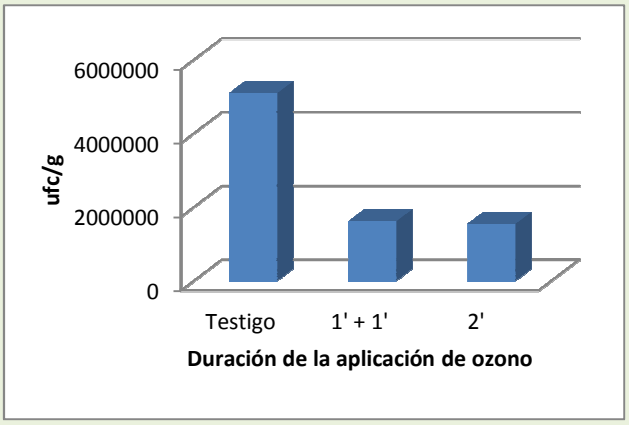


Figura 13. Resultados del ensayo 5.

Los datos indican que la aplicación de ozono en dos fases no aumenta la desinfección respecto a realizarlo de una sola vez.

Comparativa métodos de desinfección actuales.

Para otorgar a los resultados obtenidos un contexto real, se han comparado con otras sustancias activas utilizadas actualmente para la desinfección de la fresa. Los datos corresponden a un estudio de investigación donde la metodología utilizada y el objetivo fueron los mismos, pero con diferentes tratamientos de desinfección. Estos datos de referencia se han tomado del artículo de A. de Cal et al[1] donde se analizan las alternativas químicas al bromuro de metilo más utilizadas.

Tabla 4. Tratamientos químicos desinfección de suelos para fresa. Fuente: A. de Cal et al (2005)

Treatments	Active ingredient	Dose	Plastic film[a]	Application year	Formulated product manufacturer
1) 1,3-D:Pic (61:35)	1,3-Dichloropropene:chloropicrin (61:35)	35 $cm^3\ m^{-2}$	PE	1998–2002	Telopic, Dow Agrosciences
2) 1,3-D:Pic (61:35)	1,3-Dichloropropene:chloropicrin (61:35)	17.5 $cm^3\ m^{-2}$	VIF	2001–2002	Telopic, Dow Agrosciences
3) 1,3-D:Pic (83:17)	1,3-Dichloropropene:chloropicrin (83:17)	35 $cm^3\ m^{-2}$	PE	1998	Dow Agrosciences
4) Pic	Chloropicrin (trichloronitromethane)	40 g m^{-2}	PE	1998–2000	Atofina, France
5) Dazomet	Dazomet (tetrahydro-3,5-dimethyl-2H-1, 3,5-thiadiazine-2-thione)	50 g m^{-2}	PE	1999–2002	Basamid, BASF Española, S.A.
6) Metam sodium	Metam sodium (sodium *N*-methyldithiocarbamate)	125 $cm^3\ m^{-2}$	PE	2000–2002	Trimaton 50%, Desarrollo Químico Industrial S.A. (DEQUISA)
7) Metam potassium	Metam potassium (potassium *N*-methyldithiocarbamate)	160 $cm^3\ m^{-2}$	PE	2000–2002	Raisan K-50, Lainco, S.A.
8) DMDS	Dimethyl disulphide	80 g m^{-2}	PE	2002	Atofina, France
9) MB:Pic (30:70)	Methyl bromide:chloropicrin (30:70)	20 g m^{-2}	VIF	2002	,Eurobrom, BV Spain
10) MB:Pic (50:50)	Methyl bromide:chloropicrin (50:50)	20 g m^{-2}	VIF	1998–2002	Bromofifty, Eurobrom, BV Spain
11) MB:Pic (50:50)	Methyl bromide:chloropicrin (50:50)	40 g m^{-2}	PE	1998–2002	Bromofifty, Eurobrom, BV Spain
12) Untreated	–	–	–	1998–2002	–

[a] PE=polyethylene, VIF=virtually impermeable film.

Tratamiento	Desinfección (%)
1	86,3
2	85,0
3	-
4	78,0
5	94,8
6	89,3
7	89,7
8	58,0
9	98,0
10	90,7
11	85,0

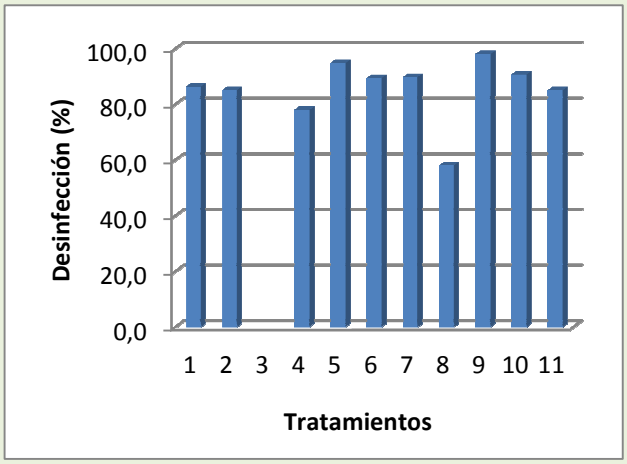


Figura 14.Desinfecciones significativas alcanzadas en el estudio de A. de Cal et.al. (2005) en la parcela de Arévalo durante los años 1998-2002.

Se puede apreciar que el mejor resultado se obtuvo al utilizar bromuro de metilo + cloropicrina, pero solo en el tratamiento 9, que lleva el contenido más elevado de cloropicrina (70%). En cuanto a los otros tratamientos cabe destacar el Dazomet que alcanzó casi un 95 % de desinfección del suelo.

Con estos datos de referencia expuestos (tabla 5), se puede comparar la efectividad de los tratamientos químicos convencionales, con la inyección de ozono en cuanto a su capacidad para la desinfección de suelos. En la tabla resumen que aparece a continuación (tabla 6) se puede apreciar como los niveles de desinfección con ozono son iguales o más altos que los químicos. Incluso, con el tratamiento de 15' + 15' se ha alcanzado un porcentaje de desinfección que solo se ha visto superado por uno de los tratamientos con bromuro de metilo.

Duración de la aplicación de ozono (minutos)	Desinfección (%)
1´	69,9
1+1	71,9
2	71,2
2+2	72,8
15	84,3
15+15	95,3
30´	83,2
60´	87,3
60+60	94,5

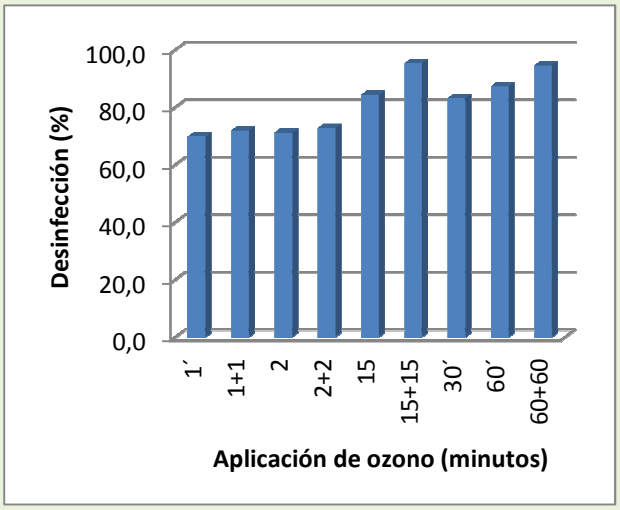


Figura 15. Resumen de tratamientos y el porcentaje de desinfección que produjeron en el suelo.

4.3 ANÁLISIS DE HONGOS PATÓGENOS DE LA FRESA

Se seleccionaron tres géneros de hongos patógenos de la fresa que más afectan a su cultivo para llevar a cabo el ensayo:

- *Fusarium*
- *Cladosporium*
- *Penicillium*

A. METODOLOGÍA

El protocolo seguido para analizar estos hongos es el siguiente:

- Aislamiento de patógenos.

  Se realizó el aislamiento de los patógenos mediante un cultivo monospórico en placas petri con medio PDA. Posteriormente se multiplicaron en varias placas (PDA) por medio de un asa de siembra a fin de obtener un micelio puro del hongo que se deseaba obtener.

- Preparación de inóculos.

  Se incubaron seis placas con cada hongo durante siete días como se describe en la siguiente tabla.

Tabla 5. Condiciones de la preparación de inóculos.

Hongo patógeno	Medio de cultivo	Temperatura	Tiempo crecimiento	Nº placas inoculadas
Fusarium	PDA	24ºC	7 dias	7
Cladosporium	PDA	24ºC	7 días	7
Penicillium	PDA	24ºC	3días	7

- A continuación se realizó una inoculación sobre trigo, colocando 7g de granos esterilizados sobre las placas petri. Se incubaron durante tres días hasta que el hongo invadió los granos.

  Se añadieron los granos de trigo inoculado a unas bolsitas de membrana de nylon de 0,45 micras de luz, y 90mm de diámetro, que al tener un poro menor que el tamaño de los microorganismos, impiden tanto la entrada como la salida de los hongos estudiados.

Figura 16. Preparación del inóculo en el ensayo de patógenos.

- Se introdujeron las bolsitas en el suelo esterilizado previamente, a 10 cm de profundidad.
- Se aplicaron entonces los tratamientos de ozono mediante un difusor de cerámica enterrado en el suelo.

  Los tratamientos fueron los siguientes:

Tabla 6. Descripción de los tratamientos en el ensayo de hongos patógenos.

Hongo	Tratamiento	Código	Nº repeticiones
Fusarium	Tratamiento testigo	Fs-T	4
	Ozono 1+1	Fs-1+1	4
	Ozono 2+2	Fs-2+2	4
	Ozono 15	Fs-15	4
Cladosporium	Tratamiento testigo	Cl-T	4
	Ozono 1+1	Cl-1+1	4
	Ozono 2+2	Cl-2+2	4
	Ozono 15	Cl-15	4
Penicillium	Tratamiento testigo	Pe-T	4
	Ozono 1+1	Pe-1+1	4
	Ozono 2+2	Pe- 2+2	4
	Ozono 15	Pe-15	4

– Tras la desinfección con ozono, se recogieron las bolsas con el trigo, y los granos se incubaron en medio PDA a 24ºC. Se realizaron cuatro repeticiones con 10 granos por placa para cada hongo. Asimismo, se incubaron un tratamiento testigo (sin aplicación de ozono), un tratamiento negativo (con granos sin inocular y sin ozono) y un último tratamiento con solo PDA, para comprobar que el proceso ha transcurrido en condiciones adecuadas, sin contaminaciones.

Figura 17. Preparación e incubación de los granos de trigo tras la aplicación de ozono.

– Se realizó el recuento de los granos infectados por los hongos en cada muestra y se observaron con la lupa electrónica para identificar el grado de desarrollo de los hongos.

Figura 18. Lupa electrónica Leica.

B. RESULTADOS

En el recuento se observó que en los cuatro tratamientos todos los granos de trigo fueron invadidos para los tres hongos estudiados. Sin embargo, en las placas testigo, proliferaron pequeñas colonias aisladas de los granos, mientras que en los demás tratamientos, en los cuales se había aplicado ozono, el hongo solo estaba presente en los granos y las zonas circundantes a éstos. El comportamiento fue similar en todos los hongos, aunque en el *Penicillium* y *Cladosporium* fue más acusado.

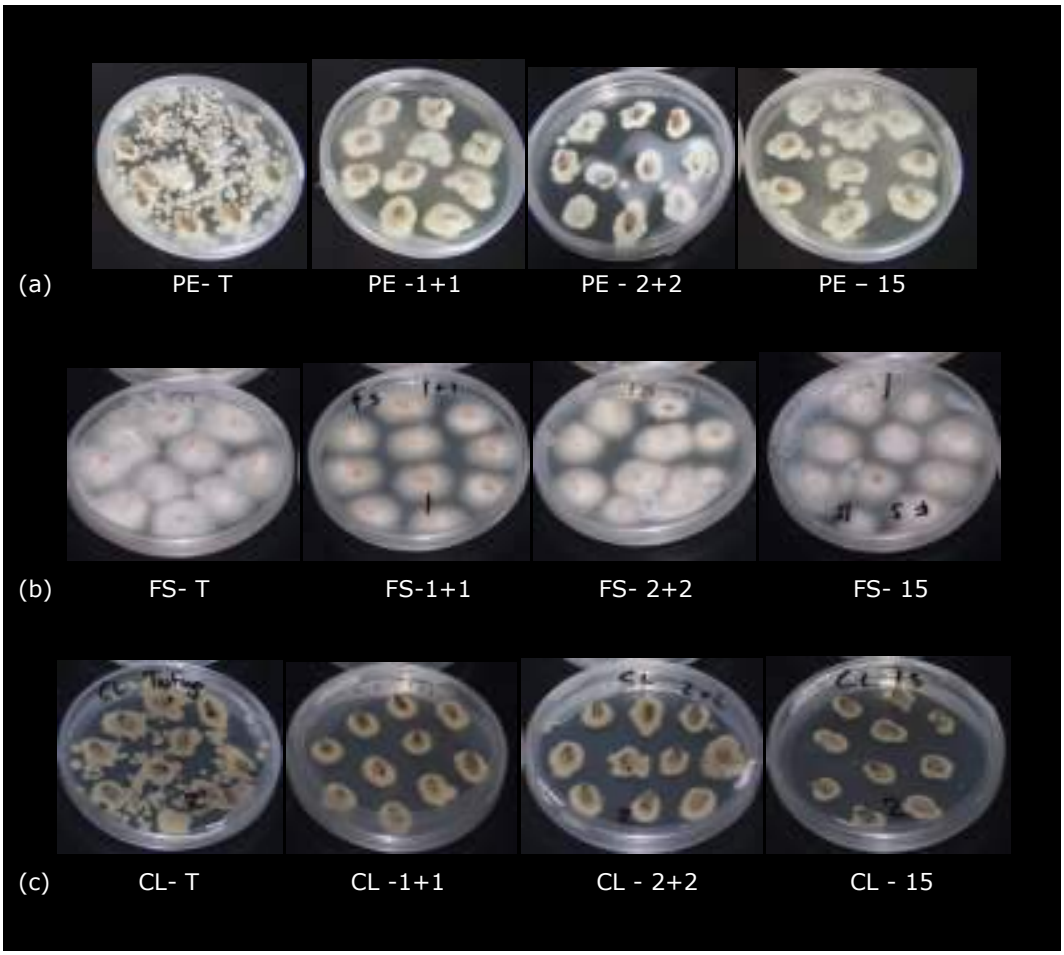


Figura 19. Resultados del ensayo con *Penicillium* (a), *Fusarium* (b) y *Cladosporium* (c).

Según los resultados de este estudio, esto puede ser debido a que el ozono desinfecta la superficie del grano, pero no logra penetrar en su interior con las dosis aplicadas. De este modo, en el testigo (sin ozono), el hongo comienza a invadir antes el medio, se desarrolla más rápido, y produce esporas rápidamente que se diseminan por el medio, lo que da lugar a las colonias

aisladas de los granos. En el resto de tratamientos, el ozono ha desinfectado la superficie, y el hongo tiene que desarrollarse desde el interior del grano. Así la esporulación se produce más tarde y no aparecen las colonias aisladas observadas en el testigo. En la observación realizada con la lupa electrónica se puede apreciar que las estructuras de los hongos están algo más desarrolladas en el testigo.

Penicillium

PE- T

PE- 1+1

PE –T

PE- 1+1

Figura 20. Imágenes de los ensayos de *Penicillium* tomadas con la lupa electrónica.

Fusarium

FU- T

FU- 15

FU- 15

Figura 21.Imágenes de los ensayos de *Fusarium* tomadas con la lupa electrónica.

Cladosporium

CL- T

CL- 15

Figura 22. Imágenes de los ensayos de *Cladosporium* tomadas con la lupa electrónica.

4.4 INFLUENCIA EN LA RESPIRACIÓN MICROBIANA. RESPIROMETRÍA.

La respiración microbiana del suelo es un concepto que hace referencia a la actividad de la población microbiana presente en el suelo. Está muy ligado a la ecología de este medio, y es una herramienta muy utilizada para conocer su salud y su calidad.

El término respiración microbiana se puede definir como el consumo de O_2 por parte de los microorganismos, y la consecuente emisión de CO_2. Con este método se pretende medir el estado biológico de los microorganismos presentes en el suelo tras la aplicación de ozono, estimando la biomasa microbiana que el ozono es capaz de inactivar.

A. METODOLOGÍA

La respirometría es un método analítico indicador de la actividad microbiológica de un sustrato. Los microorganismos heterótrofos obtienen de este modo como producto final la energía que necesitan para su desarrollo a través de la descomposición de compuestos orgánicos. En estas reacciones redox de oxidación de la materia por los microorganismos, llamada respiración microbiana, el oxígeno funciona como aceptor final de electrones obteniéndose como producto final del proceso CO_2 y agua. La reacción descrita es la siguiente:

$$MO + O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O + \text{Energía}$$

En esta ecuación se observa como la actividad metabólica puede calcularse a través del CO_2 desprendido, o del consumo de O_2. Este ensayo consiste en la medición de la cantidad de CO_2 que los microorganismos emiten en el proceso de degradación de la materia orgánica.

Para ello se utilizó el equipo Oxitop Control AN12 y el controlador OC 110, que básicamente constan de unos recipientes de vidrio cerrados herméticamente, con unos cabezales manométricos que miden la diferencia de presión entre el interior y el exterior del recipiente periódicamente hasta que la reacción termina. El CO_2 emitido se recoge en un vaso interior que contiene NaOH, y que absorbe el gas. La siguiente ecuación describe la reacción:

$$CO_2 + 2\ NaOH \rightarrow Na_2CO_3 + H_2O$$

Esto a su vez produce una depresión en el recipiente, que es recogido por el sensor manométrico del cabezal. Los cabezales poseen una interfaz de infrarrojos mediante la cual se comunica con el controlador OC 110, y los datos son recogidos para poder descargarlos posteriormente en el ordenador.

Figura 23. Ensayo de respirometría con el equipo Oxitop Control.

Se realizaron cuatro tratamientos, donde el factor estudiado es la duración de la aplicación de ozono al suelo. A continuación se detallan los tratamientos.

Tabla 7. Descripción de los tratamientos de respirometría.

TRATAMIENTO	APLICACIÓN DE OZONO (minutos)	SUELO (g)	H_2O	NaOH (ml)
T1	0	30	20	5
T2	1+1	30	20	5
T3	2+2	30	20	5
T4	15	50	20	5

Los pasos a seguir durante el ensayo se han basado en la norma DIN 19737, adaptándola a los condicionantes particulares y son los siguientes:

1. Se toma una porción de suelo y se deja secar a temperatura ambiente.
2. Se introduce la muestra de suelo (30g) en el recipiente del equipo de Oxitop Control, con 1 litro de capacidad.
3. Se añaden 5 ml de agua para que los microorganismos tengan la humedad adecuada para su desarrollo.
4. Se introduce el recipiente de absorción con 10ml de NaOH 1M.
5. Se cierra el recipiente de forma hermética y se introduce en una incubadora a temperatura constante de 20ºC.
6. Se programa el equipo para que realice la medición en modo presión, y se inicia el proceso.
7. El control de la respiración se lleva a cabo periódicamente para que el proceso evolucione de forma adecuada. Si se aprecia que la presión no varía, puede que el oxígeno del recipiente se

haya agotado, y será necesario airearlo. También puede deberse a que el álcali haya superado su capacidad de absorción de CO_2, en ese caso habrá que reponer el absorbente, añadiendo NaOH otra vez.

8. Cuando la presión se estabilice, habrá alcanzado la fase de meseta, marcando la finalización del ensayo.

Para calcular la respiración del suelo se aplica la siguiente fórmula:

$$BA = \frac{MR(O_2)}{R \cdot T} \cdot \frac{V_{fr}}{m_{Bt}} \cdot \Delta P$$

Donde:

BA = respiración del suelo [en mgO2 / Kg suelo seco]

MR (O_2) = masa molar del oxígeno: 32000 mg/mol

V_{fr} = Volumen del espacio de cabeza [en L]

R = constante general del gas: 83,14 L mbar mol-1 K-1

T = temperatura del ensayo [en K]

mBt = masa del suelo seco

Δp = reducción de la presión [en mbar]

B. RESULTADOS

La duración del ensayo fue de 15 días. Durante el proceso se detectó una parada en la respiración de las muestras, por lo que se procedió a realizar una aireación y al mismo tiempo la reposición del álcali absorbente de CO_2.

En las siguientes gráficas se muestra la variación de presión durante todo el proceso. Cada gráfica corresponde a un tratamiento, donde se muestra el progreso de las tres repeticiones de cada uno.

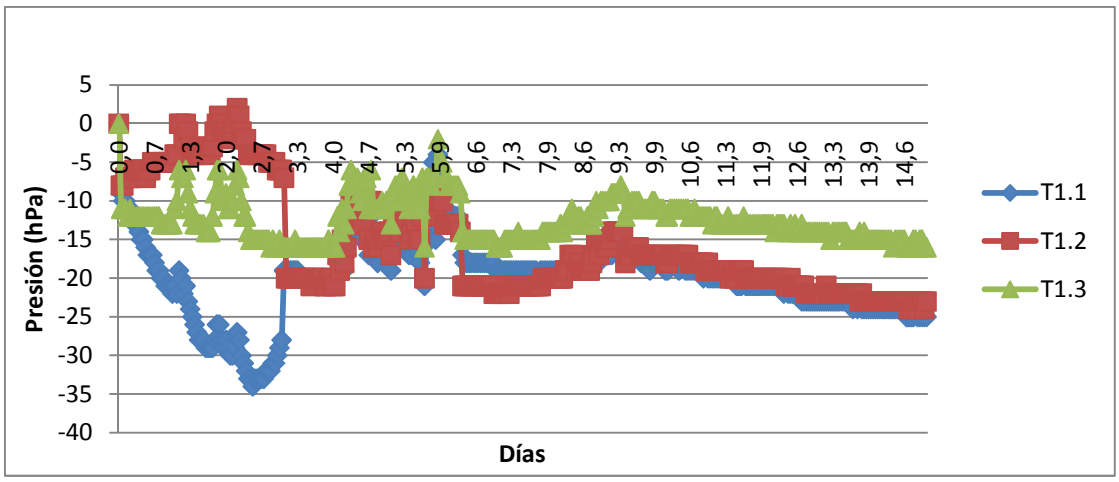


Figura 24. Resultado del testigo en el ensayo de respirometría.

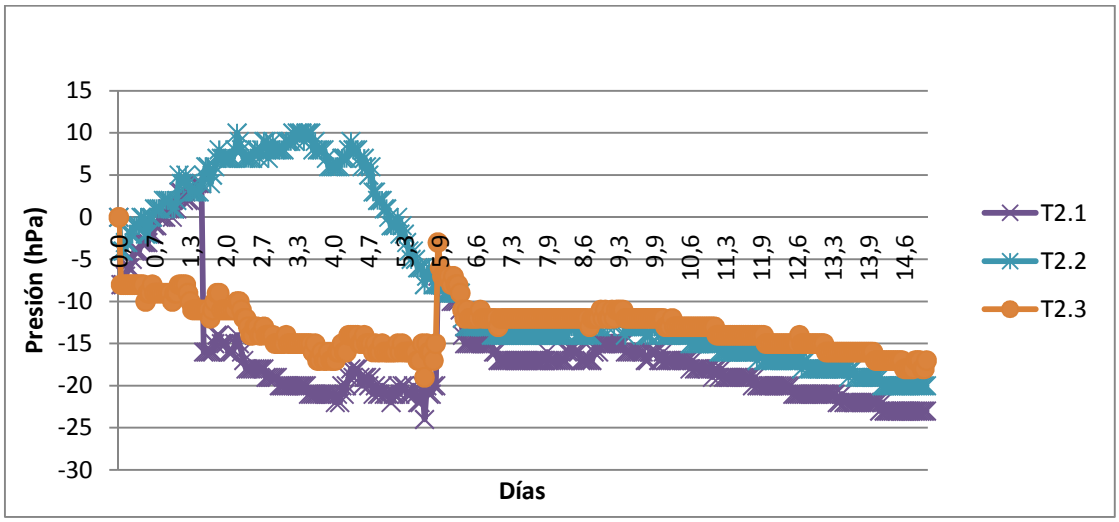


Figura 25. Resultado del tratamiento T2 en el ensayo de respirometría.

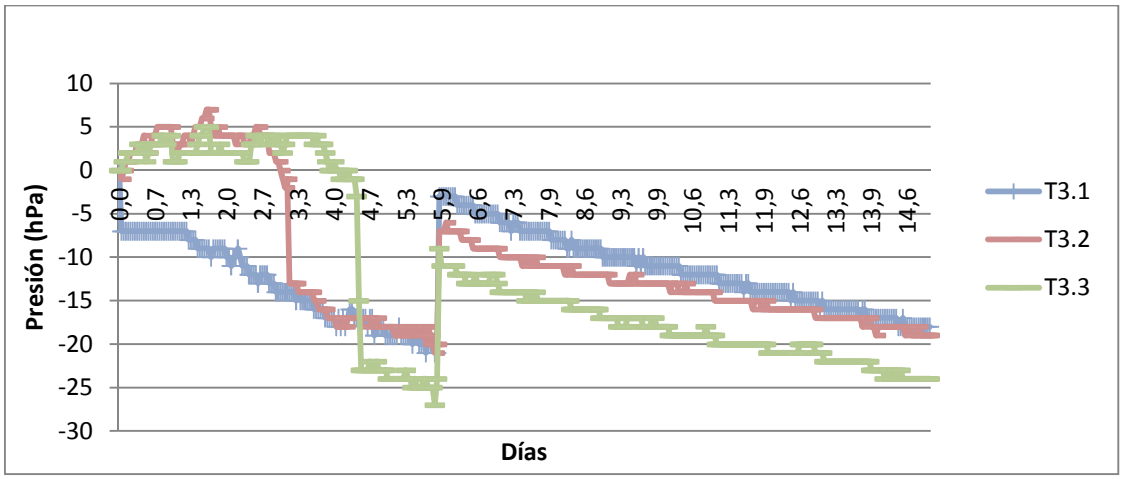


Figura 26. Resultado del tratamiento T3 en el ensayo de respirometría.

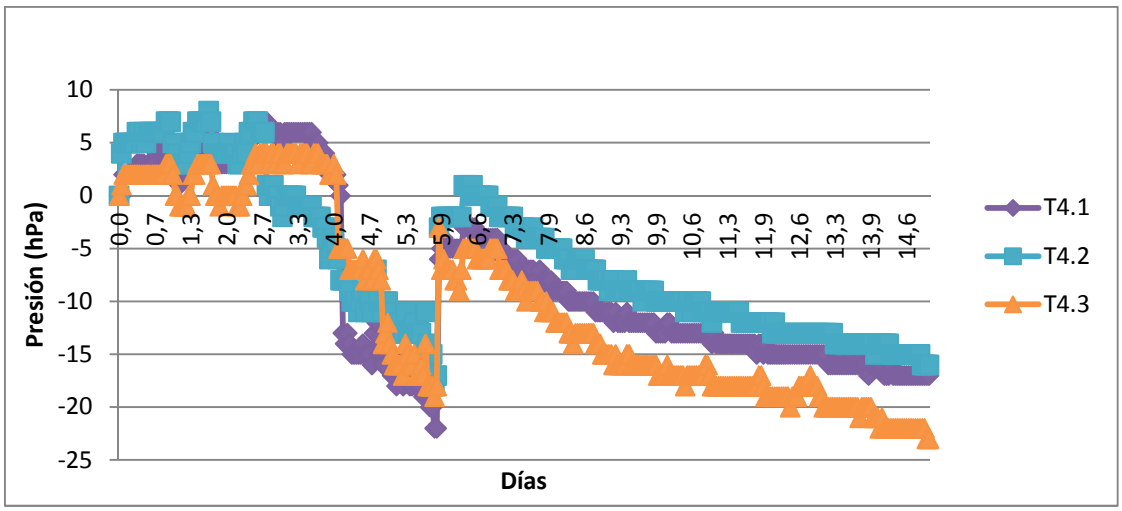


Figura 27. Resultado del tratamiento T4 en el ensayo de respirometría.

La evolución de la presión fue irregular en la fase inicial del análisis, sin embargo tras la aireación, la tendencia de las tres repeticiones de cada tratamiento se mantuvieron en el mismo rango con comportamientos muy similares, lo que prueba que el proceso transcurrió de forma adecuada.

Tabla 8. Resultados de la respirometría del suelo.

Tratamiento	ΔP (hPa)	Respiración del suelo (mg O_2/Kg MS)	Reducción del O_2 consumido (%)
T1	131,3	6319,3	0
T2	79,0	3801,2	60,2
T3	74,0	3560,6	56,3
T4	85,0	4089,9	64,7

Los datos del consumo de oxígeno indican que la actividad microbiana del suelo disminuye de forma significativa al aplicar ozono. El mayor descenso se ha producido en el tratamiento T4, que corresponde con el de mayor duración (15 minutos de aplicación de ozono), con un consumo de oxígeno 64,7% menor que el testigo. No obstante, los tres tratamientos alcanzaron una reducción similar, siempre por encima del 55%.

4.5 ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS SUELOS

Se realizaron varios tratamientos aplicando ozono al suelo durante diferentes intervalos de tiempo, y posteriormente se analizaron los parámetros físico-químicos de los sustratos.

A. METODOLOGÍA

Los tratamientos fueron los mismos que los utilizados en los otros ensayos.

T: Testigo. Sin aplicación de ozono.
O1: Aplicación de ozono durante 1+1 minuto.
O2: Aplicación de ozono durante 2+2 minutos.
O3: Aplicación de ozono durante 15 minutos

En el laboratorio de ITAGRA.CT se analizaron los siguientes parámetros en el suelo antes y después de los tratamientos de ozono: pH, conductividad eléctrica, materia orgánica oxidable, nitrógeno total, fósforo asimilable, potasio asimilable y carbonatos.

B. RESULTADOS

Los resultados de los análisis muestran que algunos parámetros no varían en función del tratamiento, como es el caso de la materia orgánica oxidable, el potasio asimilable, y el nitrógeno total

Tabla 9. Resultados de los análisis fisico-químicos.

Tratamiento	pH	Conductividad (mS/cm)	MO oxidable (%)	Carbonatos (%)	Fósforo asimilable (mg/kg)	Potasio asimilable (mg/kg)	Nitrógeno total (%)
T	6,86±0,11	0,14	0,74	no detectable	51,3±5,6	178±22	0,07
O1	6,11±0,10	0,27	0,74	no detectable	54,0±5,6	178±22	0,07
O2	5,60±0,10	0,26	0,67	no detectable	58,1±5,6	173±22	0,07
O3	4,98±0,10	0,34	0,67	no detectable	66±5,6	170±22	0,06

Sin embargo, al aumentar la duración de la aplicación de ozono, se observa que el suelo se acidifica, y el fósforo asimilable aumenta. La conductividad sigue también una tendencia a aumentar con el tiempo de ozonización, pero el ascenso no es tan claro como en los otros dos casos.

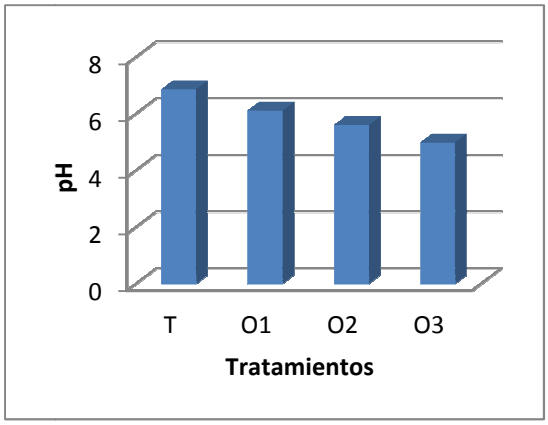
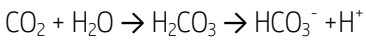


Figura 28. Valores del pH de los suelos en cada tratamiento.

La disminución del pH puede estar causada por la descomposición de la materia orgánica del suelo provocado por la oxidación del ozono. En este proceso se produce la siguiente reacción:

$$R\text{-}COOH \longrightarrow R\text{-}COO^- + H^+$$

Asimismo, la degradación de materia orgánica produce CO_2, que en contacto con el agua, provoca la formación de ácido carbónico en el suelo. Este fenómeno también causa la acidificación del sustrato, que se describe de la siguiente forma:



$$CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO_3 \rightarrow HCO_3^- + H^+$$

Mediante estas dos rutas, la degradación de la materia orgánica da lugar a la liberación de hidrogeniones, que desplazan las bases de intercambio catiónico al ocupar su lugar.

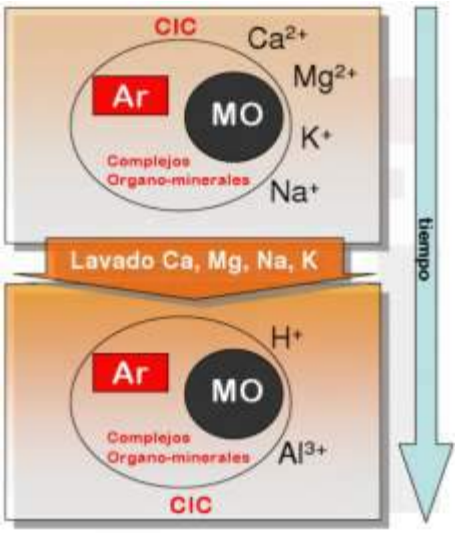


Figura 29. Esquema del desplazamiento de las bases de intercambio catiónico.

Para comprobar si el valor del pH vuelve a cambiar tras un periodo de tiempo, al cabo de un mes tras la aplicación de ozono se analizó nuevamente este parámetro, obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 10. Resultados del análisis del pH tras la aplicación del ozono (1º análisis), y un mes después (2º análisis).

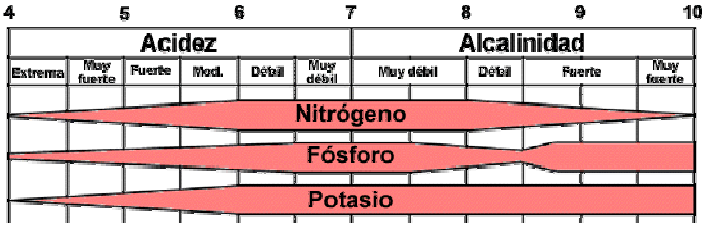
Tratamiento	pH	
	1º análisis	2º análisis
T	6,86±0,11	6,84±0,11
01	6,11±0,10	6,15±0,10
02	5,6±0,10	5,71±0,10
03	4,98±0,10	5,18±0,10

En los datos se puede comprobar que el descenso de pH permanece en el tiempo, manteniéndose estable en el suelo, lo que resulta de gran interés en zonas de pH básico como la mayor parte de Castilla y León.

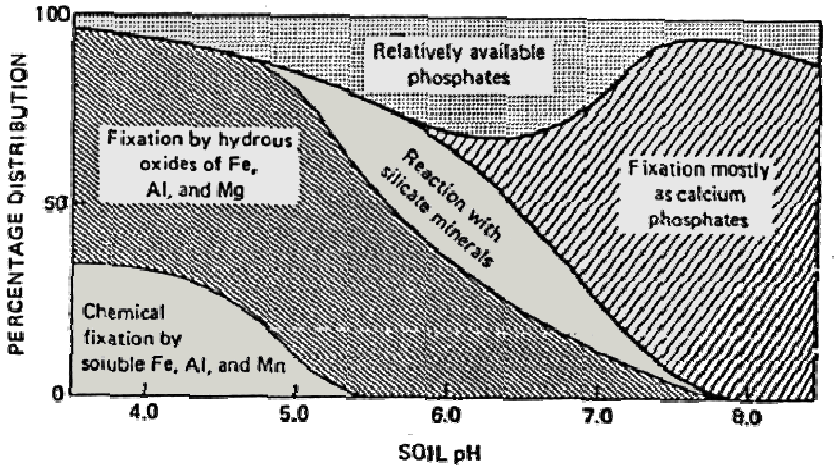
En cuanto al fósforo, el rango óptimo de pH del suelo donde existe mayor cantidad disponible se encuentra entre 6 y 7. Por lo general, al aumentar la acidez, se reduce la disponibilidad de éste nutriente, ya que el Fe, Al, y Mn presentes en la solución del suelo, reaccionan con el ácido fosfórico, dando lugar a la formación de fosfatos hidróxidos insolubles.

La dependencia del comportamiento del fósforo con el pH se resume a continuación:

pH = 3-4. Mínima solubilidad.
pH > 4 el fósforo disminuye la capacidad fijadora.
pH = 5,5 mucho del fósforo está químicamente combinado con Fe y Al.
pH = 6 comienza la precipitación como fosfato cálcico
pH = 6,5 se forman sales de Ca insolubles por lo que el fósforo no es disponible.
pH > 7 puede formarse incluso apatito como ejemplo de compuestos muy insolubles.



(a)



(b)

Figura 30 . Capacidad de asimilación del N, P y K (a) y y porcentaje de distribución del P (b) en función del pH. (Fuente: N.V.Brady.1984. The nature and properties of soils.)

La complejidad de la dinámica química del fosforo en el suelo, provoca grandes variaciones en el tenor de fósforo disponible y asimilable para los cultivos. Asimismo, es el nutriente que más sufre los efectos de transformaciones, de sus formas lábiles en no lábiles.

A pesar de que generalmente, un descenso del pH disminuye la disponibilidad del fósforo asimilable, en el caso que nos ocupa se produce el efecto contrario.

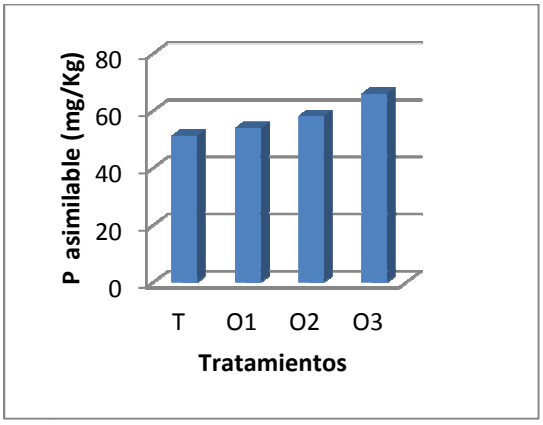


Figura 31. Fósforo asimilable de los suelos en función de los tratamientos.

Este comportamiento, puede estar causado por la reactividad indirecta del ozono con la materia orgánica. Esta se produce a través de la descomposición del ozono, donde se produce la formación de radicales libres altamente reactivos como los radicales hidroxil (.OH) o hidroperoxil (.HO_2), que oxidan la materia orgánica.

$$O_3 \xrightarrow{OH^-} OH^- \xrightarrow{M} Mox$$

La oxidación de la materia orgánica incrementa la disponibilidad del fósforo, disminuyendo la precipitación de fosfatos con el hierro y el aluminio.

Asimismo, la liberación de grupos hidroxilo da lugar a que los ácidos orgánicos formen, con cationes hidroxilados como $Fe(OH)_2$ y $Al(OH)_2$, combinaciones complejas que inmovilizan dichos iones, dejando en libertad los iones fosfato.

4.6 HIERBAS ADVENTICIAS

Con el objetivo de cuantificar el efecto del ozono sobre las semillas de hierbas adventicias presentes en el sustrato se ha realizado esta prueba.

A. METODOLOGÍA

Para este ensayo se ha utilizado un suelo de una parcela parcialmente abandonada, donde existe una amplia y diversa colonia de malas hierbas. Las muestras de suelo superficial se han tamizado a fin de eliminar los áridos de mayor tamaño así como otros restos vegetales importantes.

Los tratamientos fueron los mismos que los utilizados en los otros ensayos.

T: Testigo. Sin aplicación de ozono.
O1: Aplicación de ozono durante 1+1 minuto.
O2: Aplicación de ozono durante 2+2 minutos.
O3: Aplicación de ozono durante 15 minutos

Con el suelo obtenido se procedió a realizar dos semilleros diferentes. El tamaño de alveolo de (3cm x 1,5cm x 1,5cm). En el caso de los alveolos pequeños, se realizó un número mayor de repeticiones, alcanzando las 112, mientras que con el tamaño mayor solo se han realizado 6 repeticiones. En ambos casos se utilizó una cantidad de suelo similar para realizar los semilleros. Para la toma de datos se ha realizado un seguimiento continuo.

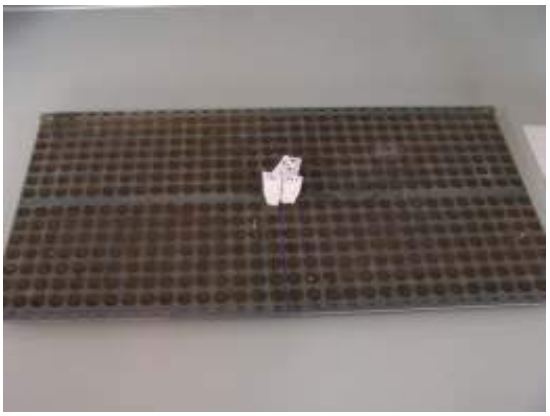


Figura 32. Montaje del ensayo de hierbas adventicias.

B. RESULTADOS

En la siguiente tabla se muestran los resultados alcanzados:

Tabla 11. Resultados del ensayo de germinación de hierbas adventicias.

Tratamiento	Germinación respecto al testigo (%)
T	100
O.1	175
O.2	200
O.3	50

Los resultados obtenidos no son concluyentes debido a la falta de homogeneidad en la germinación de las plantas silvestres. Por lo tanto es posible que las semillas no se hayan inactivado y continúen en estado latente dentro del suelo.

4.7 TEST DE ZUCCONI

Tras realizar todos los muestreos mencionados anteriormente, el suelo restante de cada tratamiento se homogeneizó y posteriormente se llevaron a cabo los test de fitotoxicidad de Zucconi y de Juste.

Mediante el test de Zucconi se determina el índice de germinación, un buen indicador de la presencia de fitotoxinas en un sustrato. Este ensayo puede ayudar a comprobar si el sustrato donde se ha aplicado ozono es apto para su utilización en el establecimiento de plantas, ya que es capaz de detectar la presencia de sustancias con potencialidad fitotóxica.

A. METODOLOGÍA

Para la realización de este ensayo, se utilizó agua ozonizada, obtenida mediante burbujeo continuo de ozono a través de un difusor cerámico sumergido en el agua durante un determinado tiempo.

Se aplicaron tres ml del agua ozonizada en un papel de filtro (Whatmann nº4) situado en una placa petri con 10 semillas de berro *Lepidium Sativum* L.) De igual manera se preparó una prueba en blanco sustituyendo el extracto por agua destilada. Se incubó a 27ºC y en la oscuridad durante cinco días.

Los tratamientos se llevaron a cabo preparando agua ozonizada con diferentes dosis de ozono. Con un caudal de oxígeno de 1l/minuto, y una producción de ozono de 10g/h, se realizaron cuatro tratamientos:

B: Blanco. Agua destilada sin aplicación de ozono.
O1: Agua destilada ozonizada durante 1+1 minuto.
O2: Agua destilada ozonizada durante 2+2 minutos.
O3: Agua destilada ozonizada durante 15 minutos.

Se hizo un recuento de las semillas germinadas y se midió la longitud de las raíces el 5º día tras el inicio del test. Se realizaron 5 repeticiones de cada extracto y del blanco.

El índice de germinación (IG) se determinó aplicando la siguiente fórmula:

$$IG\ (\%) = (N/No)\times(L/Lo) \times 100$$

donde:
No: número de semillas germinadas en el ensayo en blanco.
N: número de semillas germinadas en el extracto del compost.
Lo: longitud de la raíz en el blanco.
L: longitud de la raíz en el ensayo en el extracto del compost.

La evaluación de los resultados se realizó en función del número de semillas germinadas y la elongación de las raíces el día 5 tras la siembra.

Figura 33. Ensayo test de Zucconi.

B. RESULTADOS

Los datos obtenidos en el ensayo se recogen en la siguiente tabla.

Tabla 12. Resultados del test de Zucconi.

Tratamiento	Germinación (%)	IG (%)
Testigo	100	100
O.1 (1'+1')	106,4	105,4
O.2 (2'+2')	97,9	86
O.3 (15')	91,5	74,9

Zucconi considera que valores de índices de germinación del berro superiores al 50 %, indicarían ausencia de fitotoxicidad en la muestra. En este caso todos los resultados están por encima de esta cifra, aproximándose e incluso superando el valor del testigo. Esto se aprecia en el tratamiento 1'+1' donde el índice de germinación supera el 100% (105,4%) lo que sugiere que esta aplicación tiene un efecto estimulante en el crecimiento de la planta.

En conclusión, aunque se aprecia una pequeña disminución en el índice de germinación a medida que aumenta el tiempo de aplicación, el ozono en suelo no produce efectos fitotóxicos, ya que los valores superan con amplio margen el 50% en este índice.

Figura 34. Toma de datos finales del test de Zucconi.

4.8 TEST DE JUSTE

A. METODOLOGÍA

Se realizaron ensayos de siembra con semillas de berenjena (*Solanum melongea*) estudiando la aplicación de ozono al suelo durante diferentes intervalos de tiempo. Los tratamientos son los siguientes:

T: Testigo. Sin aplicación de ozono.
O.1: Aplicación de ozono durante 1+1 minuto.
O.2: Aplicación de ozono durante 2+2 minutos.
O.3: Aplicación de ozono durante 15 minutos

Estos sustratos se llevaron a diferentes semilleros donde se depositó una semilla de berenjena (*Solanum melongea*) por alveolo (de dimensiones: 4 x 4 x 7,5 cm^3). De cada uno de estos tres tratamientos se hicieron 6 repeticiones. Se llevaron a una cámara de germinación a 20ºC.

Se realizó el conteo de las semillas germinadas al décimo día de su plantación, obteniendo los resultados mediante comparación entre los ensayos con compost y la muestra testigo.

Figura 35- Preparación del ensayo de Juste.

B. RESULTADOS

Como se observa en los datos resultantes, el porcentaje de germinación respecto al testigo ha sido superior o igual al 100% en los tratamientos 0.2 y 0.3, lo que indica que el ozono no ha causado fitotoxicidad en las plantas, sino un efecto estimulante en la germinación. Sin embargo, en el tratamiento 0.1, el porcentaje disminuye hasta un 33,3%, por lo que habría que realizar un estudio más amplio para comprobar que factores han causado este descenso.

Tabla 13. Datos obtenidos en el test de Juste

Tratamiento	Germinación respecto al testigo (%)	pH	Ce
T	100,0	6,86	0,14
0.1	33,3	6,11	0,27
0.2	166,7	5,60	0,26
0.3	100,0	4,98	0,34

5 CONCLUSIONES

El ozono produce una reacción con el suelo, y según los datos resultantes del estudio, la causa más probable es la transformación de la materia orgánica vía humificación. La formación de humus es muy beneficiosa para el suelo y los cultivos, por lo que se trata de un efecto altamente positivo de la aplicación de ozono. Este hecho está relacionado con la variación del pH que se ha observado en los análisis físico-químicos, según los cuales al aumentar la dosis de ozono, disminuye el pH del suelo. La degradación de la materia orgánica produce la liberación de hidrogeniones por diferentes procesos, que finalmente genera la acidificación del sustrato. Se ha comprobado que el descenso de pH permanece en el tiempo, manteniéndose estable en el suelo, al menos durante un mes tras la aplicación del ozono. Esto puede suponer una gran ventaja para zonas donde los suelos se caracterizan por ser muy básicos, como en gran parte de la tierra de cultivo de Castilla y León, donde los valores altos de pH dificultan la asimilación de nutrientes. La aplicación de ozono en estos casos aumentaría la calidad de las producciones agrícolas, pues mejoraría notablemente la disponibilidad de nutrientes en el suelo, con el consecuente ahorro de gastos en productos fertilizantes y enmiendas que ahora son necesarios, y la disminución de los impactos ambientales que se derivan de ello.
Desde ITAGRA.CT se aunarán esfuerzos para que este interesante resultado derive en otro estudio más amplio, orientado a investigar los beneficios que puede aportar la modificación del pH sobre los cultivos de Castilla y León en especial, y del resto de Comunidades en general.

El ozono también facilita la disponibilidad del fósforo. Aún disminuyendo el pH hasta valores donde dicho nutriente es poco asimilable, las formas disponibles aumentan, lo que provoca un aumento de fertilidad en el sustrato tratado.

En lo que respecta a la desinfección de los suelos, los análisis de aerobios mesófilos muestran que la aplicación de ozono disminuye en gran medida la presencia de microorganismos, logrando diferentes niveles de desinfección en función del tiempo de ozonización. En los tratamientos con tiempos cortos de aplicación de ozono ensayados (1 y 2 minutos) se ha alcanzado una desinfección máxima del 74,17%, mientras que los tratamientos con tiempos largos (15, 30 y 60 minutos) se tiene una eficacia algo mayor, obteniéndose una reducción máxima de aerobios mesófilos del 94% en el ensayo donde el ozono se aplicó durante 15+15 minutos.

Mediante las pruebas de respirometría microbiana, se corrobora la disminución de microorganismos del suelo que provoca la aplicación de ozono, aunque en menor medida que la observada para solo los aerobios mesófilos. El mejor resultado se alcanzó al aplicar 15 minutos del gas, con una reducción del 64,7%.

Los resultados del estudio de patógenos llevan a la hipótesis de que el ozono desinfecta la superficie del grano de trigo, pero no tiene eficacia en el interior del mismo. Asimismo, al aplicar este compuesto, se consigue que el hongo se desarrolle más lentamente y esporule más tarde, pero la infección no se erradica.

Los resultados del ensayo de Zucconi y Juste, no indican que el ozono provoque problemas de fitotoxicidad, e incluso en algunos tratamientos estimula la germinación. De este modo y según los datos obtenidos en este estudio, la aplicación de ozono en el suelo no produce efectos adversos en las primeras etapas de desarrollo de las plantas.

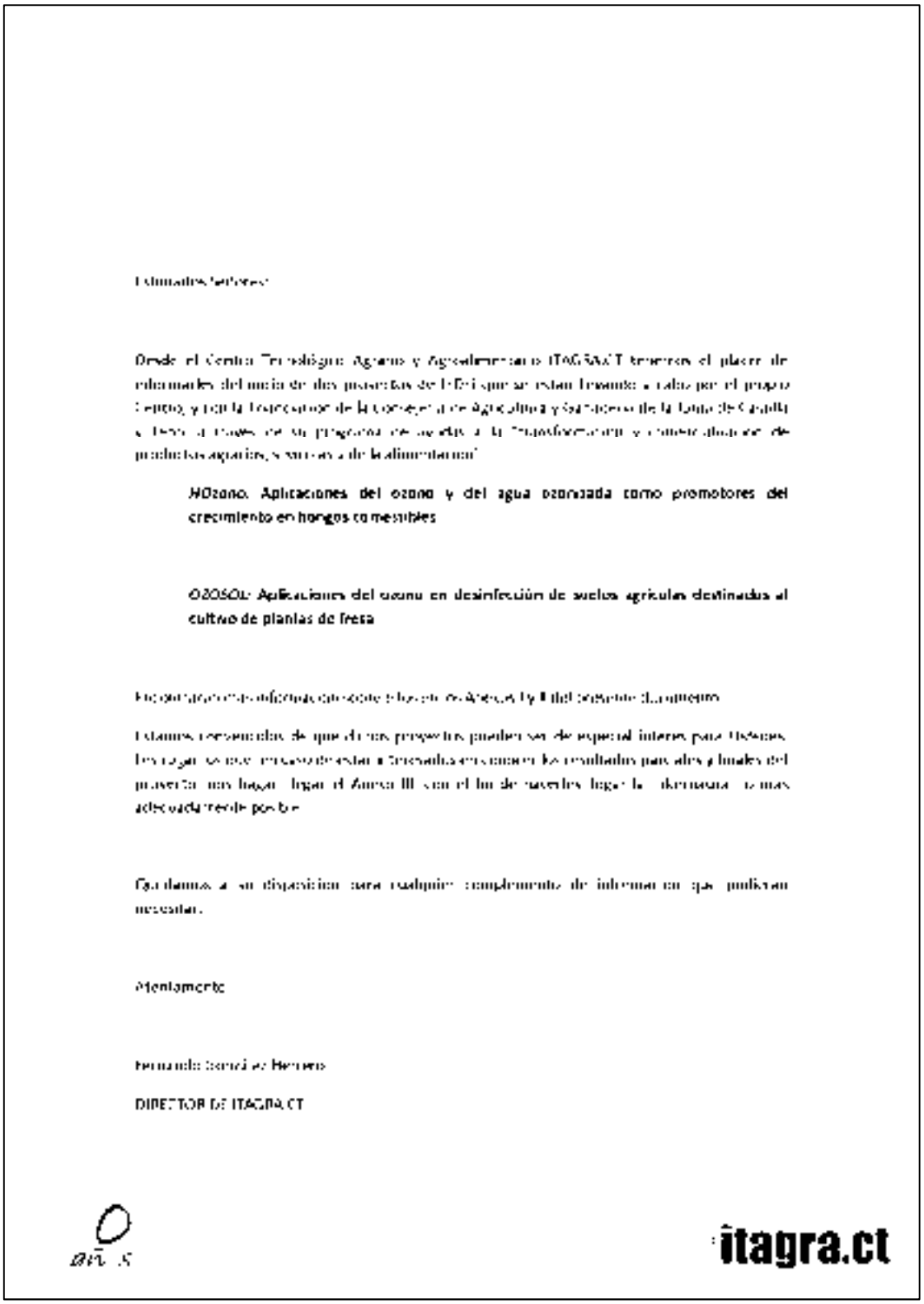
En el presente documento se han descrito las actividades y resultados obtenidos en la investigación sobre, la desinfección con ozono en suelos. Sin embargo, en vista de ciertos datos resultantes que se han obtenido del estudio, se han derivado ciertas hipótesis aquí esbozadas, que necesitan ser investigadas más detenidamente. Estas hipótesis tienen entidad propia para considerar un estudio que aborde y desarrolle de forma más amplia las experiencias aquí realizadas, y el trabajo necesario para ello, requiere nuevos ensayos, así como una interrelación con los resultados de otros proyectos ya realizados. Asimismo, para este tipo de estudios, es fundamental la difusión de las hipótesis que se derivan de los datos obtenidos, mediante la publicación de artículos, que las describan de forma meticulosa, en diferentes medios relacionados con la comunidad científica, como revistas o congresos especializados. Las actividades mencionadas, escapan del ámbito del presente trabajo, ya que por las razones descritas, requiere un tiempo de análisis y estudio muy superior. Sin embargo desde ITAGRA.CT, se pretende llevar a cabo investigaciones posteriores que estudien los aspectos más interesantes derivados del trabajo, como el poder acidificante del ozono en el suelo, y que a su vez aumentará la eficacia de los esfuerzos realizados en este estudio.

6 ACTUACIONES DE DIFUSIÓN REALIZADAS

Conforme a los compromisos establecidos en la propuesta presentada, a lo largo de la vida del proyecto se han ejecutado diversas actuaciones dirigidas a difundir las actividades que se han venido realizando y, especialmente, los resultados obtenidos.
A continuación se exponen las actividades realizadas con el objetivo de difundir el proyecto y sus resultados:

En su inicio, se ha realizado una campaña de lanzamiento, enviando información a todas aquellas empresas susceptibles de estar interesadas en los resultados, especialmente productores de

hortícolas. La ficha de proyecto, que adjuntamos, se envió por correo ordinario. Además, se publicó la noticia del inicio de los trabajos en el Boletín informativo de ITAGRA, dando a conocer detalles sobre el proyecto y sus objetivos.



Estimados señores:

Desde el Centro Tecnológico Agrario y Agroalimentario ITAGRA/CT tenemos el placer de informarles del inicio de dos proyectos de I+D+i que se están llevando a cabo por el propio Centro, y con la participación de la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León, a través de su programa de ayudas a la transformación y comercialización de productos agrarios, silvícolas y de la alimentación:

WOzono. Aplicaciones del ozono y del agua ozonizada como promotores del crecimiento en hongos comestibles

OZOSOL: Aplicaciones del ozono en desinfección de suelos agrícolas destinados al cultivo de plantas de fresa

Encontrarán información concreta sobre ambos proyectos en el anexo del presente documento.

Estamos convencidos de que dichos proyectos pueden ser de especial interés para ustedes. Les rogamos que, en caso de estar interesados en conocer los resultados parciales y finales del proyecto, nos hagan llegar el Anexo III con el fin de poderles hacer la información lo más adecuada posible.

Quedamos a su disposición para cualquier complemento de información que pudieran necesitar.

Atentamente

Fernando González Herrero

DIRECTOR DE ITAGRA/CT

itagra.ct

ANEXO I:

Proyecto HOzono: Aplicaciones del ozono y del agua ozonizada como promotores del crecimiento en hongos comestibles

OBJETIVOS:

Investigar las cualidades del ozono, tanto gaseoso como disuelto en agua (agua ozonizada) para promover el crecimiento de setas o hongos comestibles, debidamente aplicado durante su proceso de desarrollo.

ACCIONES:

- Determinación de dosis, modo y momento de aplicación del ozono para favorecer el crecimiento de las especies de hongos estudiados.
- Determinación de la estrategia más eficaz de la aplicación del ozono para evitar posibles contaminaciones por parte de otros hongos o microorganismos indeseables.
- Transferir los conocimientos adquiridos para su utilización en condiciones reales de campo.

RESULTADOS ESPERADOS:

- Lograr una mayor diversificación de la producción en el sector agrario de Castilla y León.
- Obtener un medio de producción de alimentos de alta calidad.
- Adelantar las cosechas de setas.
- Dotar al sector de una tecnología eco-respetuosa.

ANEXO II:

Proyecto OZOSOL: Aplicaciones del ozono en desinfección de suelos agrícolas destinados al cultivo de plantas de fresa

OBJETIVOS:

[illegible] destinados al cultivo de hortícolas particularmente a fresa, comprobando si es una alternativa viable y [illegible] actuales.

ACCIONES.

- Determinación de dosis, modo y tiempos de aplicación del ozono para producir un efecto de desinfección en suelo.
- Comparar la eficacidad de ambos tratamientos con el cultivo de hortícolas más fácil actualmente.
- Evaluar la aplicabilidad en condiciones de campo [illegible]
- Transferir los conocimientos adquiridos a sector.

RESULTADOS ESPERADOS:

Reducir [illegible] tratamientos químicos que se realizan en la actualidad a los suelos destinados a hortícolas [illegible] cada vez más exigentes [illegible] cada vez más exigentes [illegible] cultivos agrícolas [illegible] el coste [illegible] y se reduzcan los riesgos del uso de la [illegible] en el alto [illegible] [illegible] el tiempo de [illegible] del suelo [illegible] hasta la siembra o trasplante.

itagra.ct

ANEXO III:

DATOS DE CONTACTO PARA RECIBIR INFORMACIÓN Y RESULTADOS DEL PROYECTO:

NOMBRE DE LA EMPRESA:

PERSONA DE CONTACTO

E-MAIL:

CIF:

TELEFONO: FAX:

SECTOR DE ACTIVIDAD

OBSERVACIONES

itagra.ct

Figura 36. Ficha de proyecto enviada en la campaña de lanzamiento inicial.

Para facilitar la puesta en conocimiento del grueso del proyecto, y dando protagonismo a los resultados obtenidos, utilizables por las empresas a quienes se dirige el trabajo realizado, se ha redactado un documento técnico-científico, de fácil lectura, que está disponible a través de la página web de ITAGRA. Además, se han buscado distintos medios de difusión a través de la Red, para intentar así llegar a más destinatarios. Se pone a disposición de la Consejería de Agricultura y Ganadería una copia de dicho documento, para que lo difunda como se considere oportuno.

El proyecto tiene un apartado específico dentro de la página web de ITAGRA, donde se puede encontrar el resumen del proyecto y la ficha explicativa, así como el documento técnico-científico resultante. Dicha información está accesible a todos los interesados, de forma directa y gratuita.
El Boletín de noticias de ITAGRA ha servido para dar información sobre el proyecto, no sólo su inicio, sino también su evolución y finalización, manteniendo a las empresas potencialmente interesadas al corriente del desarrollo de las actuaciones, con la vista puesta en la transferencia tecnológica.

Con el objetivo de llegar no sólo a los empresarios destinatarios de los resultados del proyecto, por razón de actividad, sino también a la sociedad en general, e incluso a otras empresas a las que el mailing y el resto de acciones no hubiera llegado, se han procurado sendas notas de prensa, habiendo habido posterior respuesta de los medios de comunicación de distinta índole, destacando los que se indican a continuación:

- Televisión de Castilla y León: con el reportaje emitido en el programa "SURCOS", del día 26 de marzo de 2011. Este programa, además, se puede visitar en el siguiente enlace web.

http://www.youtube.com/watch?v=ZdpCRZzD4_A&feature=player_embedded#at=1143

- Artículo en periódico Carrión, con fecha de 3 de enero de 2011
- Interempresas.net: Artículo de 2 de septiembre de 2010
- Periódico Carrión, artículo de julio de 2010
- Artículo en el portal informativo www.trops.es, de 17 de agosto de 2010
- Artículo en www.boletinagrario.com, a 17 de agosto de 2010
- A través de la plataforma de información científica SINC se ha publicado en varios medios, entre ellos en www.freshplaza.es, en fecha de 16 de julio de 2010; o en www.agroterra.com, a 15 de julio de 2010; o en www.ellibrepensador.com, a 15 de julio de 2010. La propia plataforma informativa ha publicado la información a 13 de julio de 2010.
- A través de la agencia de noticias DICYT, se ha publicado información sobre el proyecto en varios medios, como en www.clustic.org, a 17 de agosto de 2010 (la propia agencia lo ha publicado el día 9 de julio de 2010). También ha sido publicado en el blog www.manipulacionplaguicidas.wordpress.com, a 14 de julio de 2010.

- También ha sido subido a la prestigiosa plataforma de información compartida www.meneame.net, a 26 de julio de 2010
- A nivel internacional, la información se ha publicado en el portal agrario www.viveagro.cl, en julio de 2010
- La empresa Ozono 21 recoge un artículo en su web sobre el proyecto, a 10 de julio de 2010
- www.ecoticias.com es otro de los portales que se ha hecho eco del proyecto, el día 10 de julio de 2010
- Prueba de la buena acogida que la idea del proyecto ha tenido entre la comunidad agroecológica es el artículo publicado en la web www.helpingnature.net el 10 de julio de 2010
- La agencia generalista Ical News ha publicado información referente al proyecto en su web, a 22 de junio de 2010
- En el Diario Palentino, publicación de un reportaje sobre el proyecto el 5 de junio de 2011
- En El Norte de Castilla, el día 4 de junio de 2011

En el momento de finalización del proyecto se ha realizado un mailing informativo a las empresas potencialmente destinatarias de los resultados, indicando en él el enlace al documento electrónico donde se recogen los resultados, especificando la posibilidad de su descarga gratuita. Asimismo, se plantean posibilidades de continuidad de los trabajos, bien desde el punto de vista de la I+D+, bien desde la aplicación directa de los resultados de este proyecto.

Todas las reuniones científicas que se identifiquen desde la finalización del proyecto, donde tenga cabida su presentación, serán tenidas en cuenta para presentar los resultados obtenidos, si bien se ha considerado prioritario el traslado de los resultados a las empresas potencialmente usuarias de dichos resultados.

7 BIBLIOGRAFÍA

Czeslaw S., Stanislaw J. P.. Combined application of dazomet and Trichoderma asperellum as an efficient alternative to methyl bromide in controlling the soil-borne disease complex of bell pepper. Crop Protection 28. 668–674. 2009.

De Cal, A., Martinez-Treceño, A., Lopez-Aranda, J.M., Melgarejo, A. Effect of chemical fumigation on soil fungal communities in Spanish strawberry nurseries. Applied Soil Ecology 28,47-56. 2005.

De Cal, A., Martinez-Treceño, A., Lopez-Aranda, J.M., Melgarejo, P. Chemical alternatives to methyl bromide in Spanish strawberry nurseries. Plant Dis 88, 210–214. 2004.

Di Vito, M., Puglia, A.P., Saccardo, F. Pepper varieties and resistance to soilborne pathogens of pepper in greenhouse. In: Methyl Bromide Alternatives for North African and Southern European Countries. UNEP DTIE. United Nations Publication, p. 49–60. 2000.

FAO. Manual alternatives to replace methyl bromide for soil-borne pest control in east and central Europe. R. Labrada. http://www.fao.org. 2007.

Fuertes González, F.J., Sanz Sanchez, A., Alves Santos, F.M., García Zumel, M., Gonzalez Herrero, F. Aplicaciones fitosanitarias del agua ozonizada. Tierras de Castilla y León. 2006.

Minuto, A., Gilardi, G., Gullino, M.L., Garibaldi, A. Reduced dosages of methyl bromide applied under gas-impermeable plastic films for controlling soilborne pathogens of vegetable crops. Crop Protection 18, 365-371. 1999.

Takayama, M., Ebihara, K., Stryczewska, H., Ikegami, T., Gyoutoku, Y., Kubo, K., Tachibana, M. Ozone generation by dielectric barrier discharge for soil sterilization. Thin Solid Films 506-507, 396-299. 2006.