

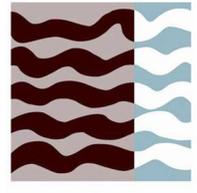


Universidad
Politécnica
de Cartagena



UPCT

Escuela Técnica Superior de
Ingeniería Agronómica



ETSIA

*Máster Universitario
en Técnicas Avanzadas en Investigación
y Desarrollo Agrario y Alimentario*

Optimización del riego con agua ozonizada en
pimiento mediante su combinación con el uso de
bioestimulantes

Autora: Dña Elia Molina Menor

Dirección: D Victoriano Martínez Álvarez

Codirección: Dña M^a Pilar Fernández Flores-
Villamil, Dña M^a Pilar Hellín García

Cartagena, Septiembre de 2022

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 Edafología y climatología de la Región de Murcia	4
1.2 Problemática de los suelos de la Región de Murcia.....	6
1.3 Fertilidad del suelo	7
1.4 Índices de calidad del suelo.....	8
1.5 Actividades enzimáticas del suelo.....	10
1.6 Bioestimulantes.....	13
1.6.1 Tipos de bioestimulantes	14
1.7 Ozono	16
2 OBJETIVOS	18
3 MATERIAL Y MÉTODOS	20
3.1 Descripción de la zona de estudio.....	20
3.2 Diseño experimental	20
3.2.1 Fertirrigación	21
3.2.2 Ozono	23
3.2.3 Bioestimulantes.....	23
3.3 Toma de muestras.....	24
3.3.1 Muestras para el análisis de la composición del suelo	24
3.3.2 Muestras para el análisis de actividades enzimáticas.....	24
3.4 Métodos analíticos.....	25
3.4.1 Suelos	25
3.4.2 Actividades enzimáticas	25
3.5 Análisis estadístico	27
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1 Efecto del tratamiento con bioestimulantes y/o agua ozonizada sobre la composición del suelo	27
4.2 Efecto del tratamiento con bioestimulantes y/o agua ozonizada sobre el rendimiento del cultivo.....	28
4.3 Efecto del tratamiento con bioestimulantes y/o agua ozonizada sobre la actividad microbiológica del suelo	29
4.3.1 Actividad enzimática β -glucosidasa	30
4.3.2 Actividad enzimática fosfatasa ácida y alcalina	31
4.3.3 Actividad enzimática deshidrogenasa.....	35
4.3.4 Actividad enzimática ureasa.....	37
5 CONCLUSIONES	39
6 BIBLIOGRAFÍA	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacción elementos del ecosistema. Fuente: http://edafologia.ugr.es/introeda/tema01/procgen.htm	3
Figura 2. Fases del suelo. Fuente: Estudio del suelo. Cuadrado y Lorenzo (1980).	4
Figura 3. Diagrama bioclimático de Murcia. Fuente: Sistema de clasificación bioclimática mundial. Rivas-Martínez y Rivas-Sáenz (2009).....	6
Figura 4. Fuente y estados de las enzimas en el suelo. Fuente: Ochoa et al. (2007). ...	10
Figura 5. Reacción de hidrólisis de la urea. Fuente: Alef y Nannipieri, 1995.....	11
Figura 6. Reacción de hidrólisis de la celulosa. Fuente: Alef y Nannipieri, 1995.....	12
Figura 7. Reacción de hidrólisis de éster sulfato. Fuente: Alef y Nannipieri, 1995.....	12
Figura 8. Reacción de hidrólisis de ésteres fosfatos. Fuente: Alef y Nannipieri, 1995..	13
Figura 9. Imagen aérea de la ubicación de la finca. Fuente: Google Maps.	20
Figura 10. Mapa de distribución de los tratamientos en el invernadero.	22
Figura 11. Relación entre el potencial redox y la concentración de ozono.....	23
Figura 12. Fotografía del método de muestreo.	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividades enzimáticas relacionadas con los principales ciclos de nutrientes.	11
Tabla 2. Propiedades del suelo antes y después de los tratamientos con bioestimulantes y riego sin ozono.....	27
Tabla 3. Propiedades del suelo antes y después de los tratamientos con bioestimulantes y riego con agua ozonizada.	28

RESUMEN

El cultivo de pimiento bajo invernadero tiene una gran importancia económica y social tanto a nivel internacional como nacional, especialmente en la Región de Murcia. Las particulares condiciones edafoclimáticas de la Región y, concretamente, del Campo de Cartagena, la han hecho idónea para la producción de esta hortícola. Sin embargo, el incremento actual de las temperaturas y la escasez hídrica, unido al aumento de la salinidad de los suelos, está afectando de forma negativa tanto a la calidad como a la fertilidad de estos, disminuyendo la productividad de los cultivos. Por otra parte, el desarrollo sostenible de la Región de Murcia requiere la implantación de técnicas respetuosas con el medio ambiente, como son el uso de bioestimulantes o el empleo de agua ozonizada, permitiendo así el mantenimiento y mejora de la producción y calidad de los cultivos. Por este motivo, el principal objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del riego con agua ozonizada y su combinación con bioestimulantes sobre la fertilidad del suelo en un cultivo de pimiento bajo invernadero. Para este fin, se diseñaron seis tratamientos que incluyeron la aplicación de diferentes combinaciones bioestimulantes utilizando hongos micorrízicos arbusculares (HMA), rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (BPCV) y ácidos húmicos y fúlvicos combinados o no con agua ozonizada. En las muestras de suelo, tomadas al inicio y final del ensayo para cada tratamiento, se estudió la composición química y la actividad de los enzimas β -glucosidasa, fosfatasa ácida y alcalina, deshidrogenasa y ureasa. En general, la aplicación de bioestimulantes junto con agua ozonizada no afectó a las actividades enzimáticas relacionadas con el ciclo de carbono (actividad β -glucosidasa). Sin embargo, la actividad de las enzimas relacionadas con el ciclo del fósforo (fosfatasas), la respiración microbiana (actividad deshidrogenasa) y la actividad ureasa (ciclo de nitrógeno), sí que se vieron favorecidas por los tratamientos aunque este hecho no se tradujo en un aumento del rendimiento del cultivo.

Palabras clave: Bioestimulantes, Ozono, Enzimas, Hortícolas.

ABSTRACT

Pepper cultivation under greenhouse is very important from the economic and social points of view, both internationally and in Spain, particularly in the Region of Murcia. The special soil and climatic conditions of the area and, specially, of the farmland near Cartagena (*Campo de Cartagena*), make it ideal for the production of this crop. However, increasing annual temperatures and water scarcity, together with increasing soil salinity, negatively affect both soil quality and soil fertility, thus reducing crop productivity. Moreover, sustainable development in the Region of Murcia requires the implementation of environmentally friendly techniques such as the use of biostimulants or the use of ozonised water, allowing the maintenance and improvement of crop production and quality. For this reason, the main objective of this work was to evaluate the effect of irrigation with ozonised water and its combination with biostimulants on soil fertility in a greenhouse pepper crop. For this purpose, six treatments were designed that included the application of different biostimulant combinations using arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and humic and fulvic acids combined or not with ozonised water. In the soil samples taken at the beginning and end of the experiment for each treatment, the chemical composition and activity of the enzymes β -glucosidase, acid and alkaline phosphatase, dehydrogenase and urease were studied. In general, the application of biostimulants in combination with ozonised water did not affect enzyme activities related to the carbon cycle (β -glucosidase activity). However, the activity of enzymes related to the phosphorus cycle (phosphatases), microbial respiration (dehydrogenase activity) and urease activity (nitrogen cycle) were enhanced by the treatments, although this did not translate into an increase in crop yield.

Keywords: Biostimulants, Ozone, Enzymes, Horticultural Crops.

1 INTRODUCCIÓN

El término “suelo” (del latín *solum*=piso) tiene múltiples definiciones según el campo de estudio. En términos generales puede definirse como la capa superficial de la corteza terrestre ubicada entre la atmósfera y la litosfera cuyo material proviene de la meteorización (física o química) de las rocas y la alteración producida por las actividades humanas que en él se desarrollan. Además, los suelos están directamente relacionados con otros elementos del ecosistema terrestre como la hidrosfera y la biosfera (Figura 1).

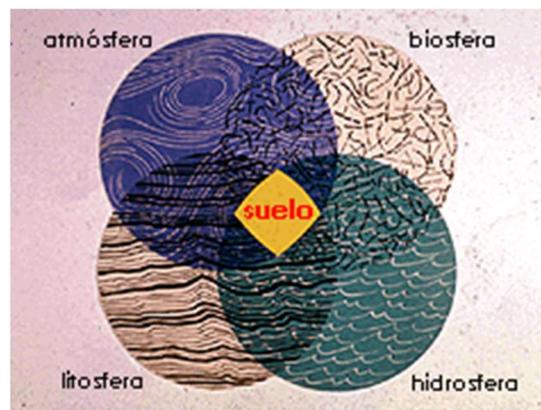


Figura 1. Interacción elementos del ecosistema. Fuente: <http://edafologia.ugr.es/introeda/tema01/procgen.htm>

Desde una óptica agronómica, el suelo es considerado un cuerpo natural, no consolidado, compuesto por materia mineral y orgánica, en el que se lleva a cabo el crecimiento vegetal. En este sentido, el suelo suministra a las plantas anclaje, nutrientes esenciales, agua, aireación y amortiguación de la temperatura radicular, parámetros imprescindibles para el desarrollo vegetal. El suelo, junto con el agua, es considerado uno de los recursos naturales esenciales y un manejo apropiado de éste es indispensable para la alimentación de la población mundial y el desarrollo sostenible (Arshad y Martin, 2002).

Al igual que otros recursos naturales, el suelo se degrada cuando las condiciones no son las adecuadas y es necesario un periodo variable para su recuperación. En este sentido podemos clasificar los recursos naturales en renovables o no, teniendo en cuenta dicho periodo de recuperación; es decir, si este es permanente a escala temporal humana o no. De este modo, el suelo se consideraría un recurso natural no renovable puesto que la velocidad de restauración natural es menor a la de consumo por parte de

los seres humanos. Un manejo no sostenible e inadecuado de este recurso puede llevar a su degradación y a la pérdida de biodiversidad.

1.1 Edafología y climatología de la Región de Murcia

Para entender la problemática actual de los suelos, es necesario comprender su composición y características generales. La interacción de la roca madre, clima, relieve, seres vivos y tiempo, da lugar a la formación de un suelo a través de procesos de meteorización, física y química, y descomposición, dando lugar a la diferenciación de los distintos estratos del suelo denominados horizontes. En general, los suelos están compuestos por tres fases: líquida, sólida y gaseosa (Figura 2) (Cuadrado y Lorenzo, 1980), siendo la primera de ellas el conjunto de partículas inorgánicas de tamaño variable, producto de la meteorización, y la materia orgánica formada por residuos orgánicos parcialmente descompuestos de plantas y animales, ambos componentes indispensables en la formación del suelo. La fase líquida, está constituida principalmente por agua y sales minerales disueltas que ocupan los poros que las partículas de la fase sólida generan. Por último, la fase gaseosa posee una composición similar al aire atmosférico con un contenido variable de oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono y vapor de agua. Esta fase ocupa los espacios libres que la anterior deja y está en constante variación como consecuencia de los distintos procesos biológicos que se producen en el suelo (Ortiz, 2015).



Figura 2. Fases del suelo. Fuente: Estudio del suelo. Cuadrado y Lorenzo (1980).

La textura de un suelo está definida por el tamaño de partículas que éste posee. Dichas partículas se clasifican en arena, limo y arcilla, cuyo tamaño está comprendido entre 2-0,05 mm, 0,05-0,002 mm y partículas de tamaño inferior a 0,002 mm, respectivamente. Atendiendo a su estructura, los suelos pueden clasificarse en arenosos, limosos y arcillosos. Los suelos arenosos son un tipo de suelo con poca capacidad de retención de nutrientes y agua. Los suelos arcillosos son poco permeables al agua, con mayor capacidad de retención de nutrientes que los arenosos y como consecuencia, más fértiles. Los suelos limosos constituyen un tipo de suelos con partículas de tamaño medio con una capacidad de retención del agua media y con materia orgánica que se descompone con rapidez, por lo que son suelos ricos en nutrientes (Gisbert et al., 2010).

En general, la Región de Murcia posee suelos con horizontes de difícil diferenciación y poco evolucionados, siendo el tipo de sustrato sobre el que se asientan el que determina la cantidad de carbonato cálcico de éstos. El contenido de materia orgánica presente en los suelos de la Región es a rasgos generales bajo, al igual que los niveles de nitrógeno y de fósforo asimilable (*Murcianatural*, 2004a). Son suelos calizos y margosos de poca profundidad, en los que aparecen afloramientos de rocas volcánicas en la zona litoral mayoritariamente. La profundidad de los suelos en la Región de Murcia es escasa y se pueden encontrar los suelos más estructurados, desarrollados y de mayor fertilidad en los bosques de la Región, al igual que los presentes en las ramblas cuyo origen se debe al depósito de los materiales resultado de la erosión a través del tiempo (Correal et al., 2007).

Respecto a su climatología, la Región de Murcia está localizada al Sureste de la Península Ibérica, dentro del área de clima subtropical. El clima que predomina es el mediterráneo semiárido, con dos estaciones bien diferenciadas, invierno y verano, y dos de transición, primavera y otoño. Las temperaturas, en general, son suaves, con una amplitud térmica diaria moderada y una amplitud térmica anual muy pequeña, hecho que explica la ausencia de una verdadera estación fría (*Murcianatural*, 2004b). Las temperaturas poseen un gradiente oeste-este, donde podemos encontrar las zonas más frías de la Región, con temperaturas medias anuales que no superan los 14 °C, hasta llegar a la costa donde la temperatura media alcanza los 17 °C. Se trata de una región

muy cálida, sobre todo en verano ya que en esta época se llegan a alcanzar temperaturas superiores a los 40 °C. Es una de las regiones de España con mayor número de días de sol al año.

Al igual que las temperaturas, las precipitaciones poseen un patrón oeste-este, con precipitaciones en las sierras occidentales que no superan los 700 mm anuales, alcanzando las precipitaciones medias de la Región el valor de aproximadamente 300 mm anuales (Figura 3). La mayor parte de los eventos de lluvias se concentran en los meses de primavera y otoño, épocas en las que se pueden dar episodios de gota fría, provocando precipitaciones fuertes. Los meses más áridos son los comprendidos entre mayo y septiembre (Rivas-Martínez y Rivas-Sáenz, 2009).

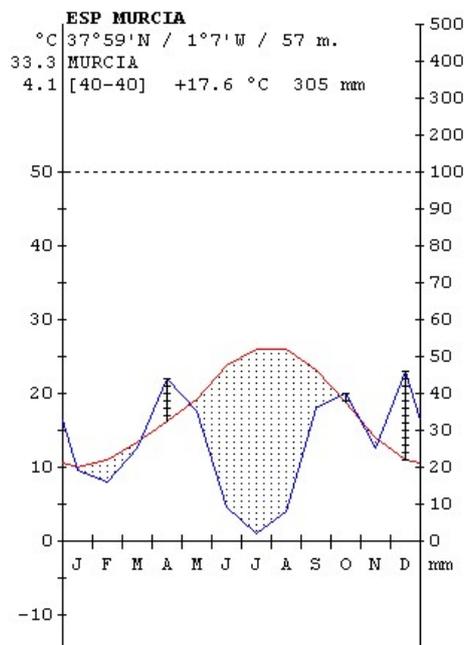


Figura 3. Diagrama bioclimático de Murcia. Fuente: Sistema de clasificación bioclimática mundial. Rivas-Martínez y Rivas-Sáenz (2009).

1.2 Problemática de los suelos de la Región de Murcia

El clima de la Región de Murcia junto con las características físicas que posee el territorio regional y la histórica explotación de los suelos han dado lugar, en determinadas zonas, a la degradación de éstos. Dicha degradación tiene un efecto negativo sobre la estructura y estabilidad del suelo, vegetación, capacidad de almacenamiento de agua y nutrientes, materia orgánica, capacidad de amortiguación y actividad biológica, con la consiguiente pérdida de productividad. Concretamente, en el

Campo de Cartagena, dicho proceso se ha visto favorecido por la erosión acelerada, consecuencia de las escorrentías producidas por los episodios de fuertes lluvias que tienen lugar en determinados meses del año. Estos episodios provocan la pérdida de nutrientes que junto a la alta salinidad de las aguas subterráneas de la zona provocan una pérdida de fertilidad del suelo que se ve favorecida por la sobreexplotación y el monocultivo.

1.3 Fertilidad del suelo

La fertilidad es la capacidad que posee el suelo para sustentar el crecimiento vegetal. De este modo se considera un suelo fértil aquel que es capaz de suministrar, no solo los nutrientes esenciales para la vegetación, si no también aportar sostén, aireación y agua a éstos (Schroth y Sinclair, 2003). Un suelo cubierto de forma natural por vegetación mantiene su fertilidad ya que las raíces y copas de los árboles y arbustos permiten que la lluvia y el viento no erosionen el terreno. Además, las hojas que caen sobre éste se descomponen por la acción de la microfauna edáfica, dando lugar al humus que aporta materia orgánica al suelo. De este modo, la porosidad del suelo mejora permitiendo que éste retenga más humedad y evita el arrastre de materiales. Por el contrario, la fertilidad de las tierras de cultivo disminuye como consecuencia de la labranza y las prácticas agrícolas, además de los efectos que sobre la estructura y porosidad del suelo tienen (Mrabet et al., 2001). Desde el punto de vista agronómico, una disminución de la fertilidad edáfica afecta de manera negativa a la productividad y sustentabilidad de los cultivos, ya que la capacidad natural que posee el suelo de procesar los nutrientes para su posterior utilización por parte de los microorganismos es menor que la de un suelo fértil.

Existen diversos factores internos que pueden afectar a la fertilidad de un suelo, entre éstos se encuentran factores físicos como la textura, estructura y porosidad. Estos factores influyen en la fertilidad ya que tienen efectos en la aireación y capacidad de retención de agua y nutrientes. Con relación a los factores químicos, el pH afecta a la solubilidad de los elementos nutritivos, al desarrollo de microorganismos, a la velocidad de los procesos de mineralización y humidificación, a la conductividad eléctrica (propiedad química relacionada con el contenido de sales de un suelo puede afectar al crecimiento vegetal) y a la capacidad de intercambio catiónico (propiedad que indica la

habilidad de los suelos para retener cationes y su disponibilidad). En cuanto a los factores biológicos, los microorganismos presentes en el suelo afectan directamente al contenido de materia orgánica del suelo, ya que la descomponen liberando nutrientes que pueden ser asimilados por las plantas, además de favorecer la estabilización de la estructura del suelo y la capacidad de retención de agua, factores que contribuyen a una mayor fertilidad y crecimiento vegetal (FAO, 2017). Además, participan en la degradación de residuos tanto animales como vegetales, en la descomposición de moléculas orgánicas e inorgánicas y en el reciclaje de nutrientes, cooperando así al mantenimiento de la fertilidad del suelo. La presencia de elementos nutritivos disponibles para las plantas, entre los que se encuentran elementos esenciales como el potasio, el fósforo y el nitrógeno, es indispensable para el crecimiento y desarrollo vegetal puesto que poseen un papel esencial en distintos procesos metabólicos como la fotosíntesis, metabolismo de carbohidratos y proteínas, apertura de estomas y asimilación de dióxido de carbono, entre otros (Rodríguez y Florez, 2004). Por todo esto, la diversidad microbiana es una herramienta digna de consideración a la hora de evaluar la fertilidad y calidad de un suelo, puesto que afecta de forma directa a la productividad de los cultivos.

Existen diferentes parámetros que nos permiten conocer los procesos microbiológicos que se desarrollan en el suelo y pueden afectar a la fertilidad de éste, como la respiración microbiana, el contenido de nitrógeno y carbono, la mineralización del nitrógeno y las actividades enzimáticas, entre otros. Una de las principales fuentes de enzimas del suelo son los microorganismos, por lo que la interacción y actividad de éstos, son fundamentales para el mantenimiento de los ciclos biogeoquímicos. Cambios en dicha actividad pueden afectar a la disponibilidad de elementos esenciales y como consecuencia, a las funciones del suelo (Subhani et al., 2001). El estudio de las actividades enzimáticas permite monitorear la salud y fertilidad edáfica ya que pueden ser indicativos de variaciones en la calidad del suelo.

1.4 Índices de calidad del suelo

El concepto calidad del suelo tiene múltiples definiciones y en la última década han surgido diversas interpretaciones, todas ellas con elementos comunes. El comité para la calidad del suelo de la *Soil Science Society of America*, la definió como “la

capacidad de un suelo específico para funcionar dentro de los límites de los ecosistemas naturales o gestionados, mantener la productividad vegetal y animal, mantener o mejorar la calidad del agua y del aire, y mantener la salud y asentamientos humanos” (Karlen et al., 1997).

En este sentido, es fundamental identificar aquellas propiedades del suelo que sirvan como indicadores de la calidad de éste. Estos indicadores son aquellos parámetros medibles que influyen en la productividad o funciones medioambientales del suelo. Dichos indicadores pueden ser físicos, químicos o biológicos. Las propiedades físicas del suelo susceptibles de ser utilizadas como indicadores de calidad edáfica son la textura, porosidad, infiltración, densidad aparente y capacidad de retención de agua. En cuanto a los indicadores químicos son aquellos que están relacionados con la interacción suelo-planta, disponibilidad de agua y nutrientes. Algunos indicadores de este tipo son el pH, conductividad eléctrica y capacidad de intercambio catiónico. Estas funciones regulan el flujo de elementos tóxicos y nutrientes que las plantas toman de la solución del suelo. Mientras que los indicadores biológicos son aquellos relacionados con la fauna edáfica e incluyen funciones como la tasa de respiración, contenido de nitrógeno y carbono de la masa microbiana y actividades enzimáticas (Seybold et al., 1997; Bautista et al., 2004).

Los indicadores de calidad del suelo basados en las propiedades físico-químicas de éste, integran características que cambian lentamente por lo que la evaluación de la calidad a través de estos indicadores, requiere el análisis conjunto de diferentes parámetros físicos y químicos. De este modo, el uso de indicadores biológicos supone una herramienta útil para evaluar la calidad del suelo como consecuencia de su alta sensibilidad y rápida respuesta a los cambios (Wolinska y Stepniewsk, 2012). Dichos indicadores miden la respuesta de los organismos del suelo frente a cambios en su entorno. El uso de este tipo de indicadores aporta información que integra múltiples factores medioambientales (Alkorta et al., 2003). Dentro de la microbiota edáfica del suelo, se pueden incluir, además de bacterias, hongos actinomicetos y protozoos, aquellos microorganismos que por su pequeño tamaño no pueden separarse del suelo a través de herramientas mecánicas, tales como: algas, nematodos, ácaros, rotíferos y colémbolos (Conrad, 1996). Todos estos microorganismos y su actividad metabólica son

responsables de procesos de gran relevancia en el suelo como la humificación y mineralización de la materia orgánica, además de aquellos procesos en los que intervienen elementos esenciales como el carbono, nitrógeno, azufre y fósforo. Dado el papel fundamental de los microorganismos en la dinámica del suelo, las actividades enzimáticas asociadas a éstos pueden utilizarse como indicadores de calidad, ya que aportan una visión integral de las funciones del suelo, en especial aquellas enzimas relacionadas con procesos biológicos esenciales, como los ciclos biogeoquímicos (Figura 4).

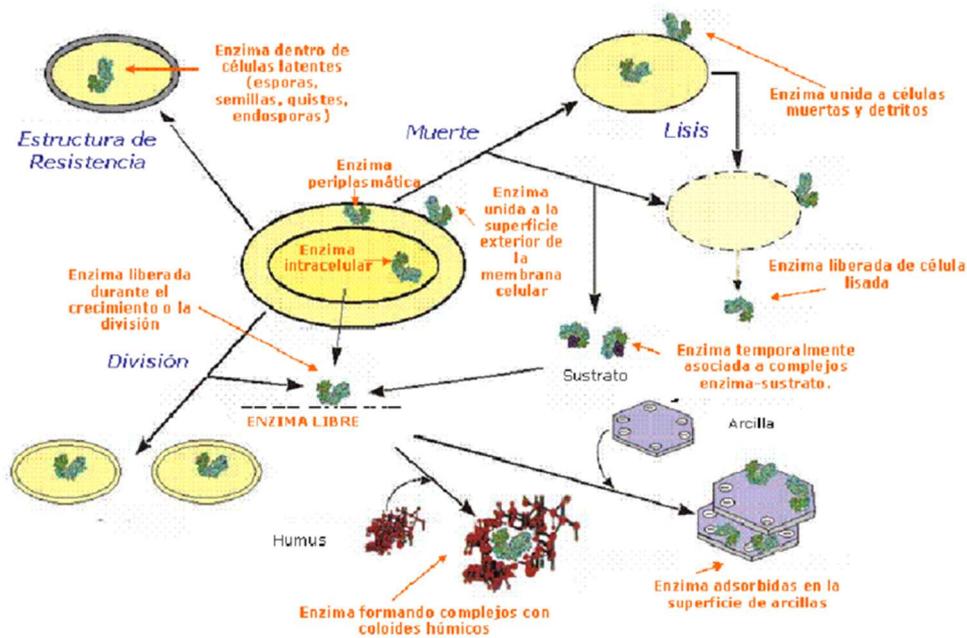


Figura 4. Fuente y estados de las enzimas en el suelo. Fuente: Ochoa et al. (2007).

1.5 Actividades enzimáticas del suelo

Las enzimas del suelo poseen un papel fundamental en los principales ciclos de nutrientes, transformando los sustratos específicos en productos asimilables por las raíces de las plantas o los microorganismos del suelo. Su actividad puede estar influenciada por las prácticas agrícolas, la contaminación ambiental o la actividad humana (Karaca et al., 2010). Su determinación es relativamente sencilla, rápida y barata y constituye una herramienta capaz de detectar los cambios producidos en el suelo, con mayor sensibilidad que otro tipo de parámetros, como por ejemplo el contenido de carbono orgánico (Aon y Colaneri, 2001; Alkorta et al., 2003).

Pueden clasificarse en seis grupos principales según la reacción que catalizan: oxidorreductasas (reacción oxidación-reducción), transferasas (transferencia de grupos funcionales), hidrolasas (reacción de hidrólisis), liasas (ruptura o adición de sustratos), isomerasas (isomerización) y ligasas (unión de dos sustratos a través de la hidrólisis de ATP). Dentro de las oxidorreductasas, las más estudiadas son deshidrogenadas, catalasas y peroxidasas y, en el caso de las hidrolasas son fosfatasas, proteasas, β -glucosidasa y ureasa. En la Tabla 1 se presentan las actividades enzimáticas más estudiadas en relación con los ciclos de nutrientes en el suelo.

Tabla 1. Actividades enzimáticas relacionadas con los principales ciclos de nutrientes.

Ciclo	Tipo de enzima	Modo de acción	Bibliografía relacionada
Ciclo del nitrógeno	Ureasa	Hidrólisis de urea a CO ₂ y NH ₃	(Sinsabaugh et al., 2000)
	Proteasa	Hidrólisis de proteínas a aminoácidos o péptidos sencillos	(Ladd y Butler, 1972)
Ciclo de carbono	β -glucosidasa	Hidrólisis de celulosa a glucosa	(Eivazi y Tabatabai, 1988)
Ciclo del azufre	Arilsulfatasa	Hidrólisis de éster de sulfato a anión arilsulfato	(Tabatabai y Bremner, 1970a)
Ciclo del fósforo	Fosfatasas ácida y alcalina	Hidrólisis de glicerofosfatos a fósforo inorgánico	(Eivazi y Tabatabai, 1977)

La ureasa (EC 3.5.1.5) es una enzima relacionada con el ciclo del nitrógeno que cataliza la reacción de hidrólisis de urea en dióxido de carbono y amoníaco (Figura 5). Su evaluación está basada en la determinación del amonio presente en los suelos (Sinsabaugh et al., 2000). Esta enzima está ampliamente distribuida en la naturaleza, pudiendo encontrarse en células animales, vegetales y microbianas. Dicha actividad no tiene una correlación significativa con la biomasa microbiana y está afectada por la disponibilidad del nitrógeno en los diferentes tipos de suelo y la concentración de oxígeno (Alef y Nannipieri, 1995).

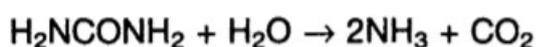


Figura 5. Reacción de hidrólisis de la urea. Fuente: Alef y Nannipieri, 1995.

Las proteasas (EC 3.4), enzimas relacionadas con el ciclo del nitrógeno, presentes en microorganismos, plantas y animales, catalizan la reacción de hidrólisis de proteínas a aminoácidos o péptidos sencillos. En el suelo se pueden encontrar tanto en células vivas como muertas, como enzimas libres o absorbidas en partículas orgánicas e inorgánicas. Concretamente, en los suelos están involucradas en la hidrólisis de los componentes proteicos del nitrógeno orgánico a aminoácidos simples (Rangaswamy et al., 1994).

La β -glucosidasa (EC 3.2.1.21) está relacionada con el ciclo del carbono y tiene un papel importante en la degradación de carbohidratos presentes en el suelo. Concretamente cataliza la degradación de la celulosa cuyo producto final de la hidrólisis es la glucosa (Figura 6), utilizada como fuente principal de energía por parte de los microorganismos del suelo (Eivazi y Tabatabai, 1990; Sinsabaugh et al., 2008). La actividad de esta enzima es proporcional al contenido en carbono orgánico, por lo que disminuye conforme profundizamos en este. Además se ha correlacionado de forma inversa con el pH del suelo (Eivazi y Tabatabai, 1990). La actividad de la β -glucosidasa muestra la capacidad que posee el suelo de estabilizar la materia orgánica y responde muy bien a los efectos del manejo del suelo.

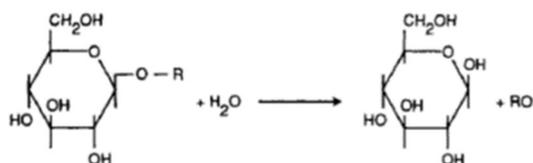


Figura 6. Reacción de hidrólisis de la celulosa. Fuente: Alef y Nannipieri, 1995.

En el ciclo del azufre, la arilsulfatasa (EC 3.1.6.1) cataliza la reacción irreversible de hidrólisis del éster sulfato (Figura 7). Esta enzima puede permanecer asociada a los compuestos húmicos del suelo y se reduce con la profundidad lo que se relaciona con un menor contenido de materia orgánica (Whalen y Warman, 1996; Tabatabai y Bremner, 1970b).



Figura 7. Reacción de hidrólisis de éster sulfato. Fuente: Alef y Nannipieri, 1995.

Las fosfatasa son enzimas relacionadas con el ciclo del fósforo, concretamente catalizan la transformación del fósforo orgánico a inorgánico en los suelos haciendo que éste sea asimilable por las raíces de las plantas (Figura 8). Estas enzimas se clasifican en ácidas (EC 3.1.3.2), predominantes en suelos ácidos, y alcalinas (EC 3.1.3.1), predominantes en suelos alcalinos (Eivazi y Tabatabai, 1977). La mayor actividad de estas enzimas se desarrolla en los primeros centímetros del suelo, disminuyendo conforme se avanza en el perfil de éste. Dicho comportamiento es debido a que la actividad enzimática de las fosfatasa está relacionada con los microorganismos del suelo, la actividad rizosférica y el contenido de materia orgánica, que disminuyen con la profundidad (Yoshioka et al., 2006).

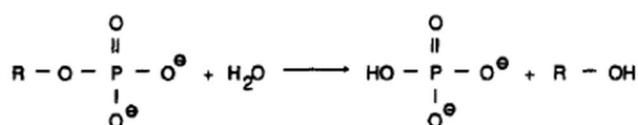


Figura 8. Reacción de hidrólisis de ésteres fosfatos. Fuente: Alef y Nannipieri, 1995.

Una enzima que no está relacionada con los ciclos de nutrientes pero es clave para entender el metabolismo microbiano es la deshidrogenasa (EC 1.2.1.12), perteneciente al grupo de las oxidoreductasas. Participa en la oxidación biológica de compuestos orgánicos y es utilizada como indicador de la respiración de microorganismos del suelo (Casida et al., 1964). Esta actividad está conectada con las células microbianas vivas, por lo que depende de los mismos factores medioambientales que afectan a la cantidad de microorganismos, así como a su actividad y procesos vitales. Al igual que las enzimas anteriormente nombradas, la actividad deshidrogenasa disminuye a medida que avanzamos en el perfil, como consecuencia de la menor abundancia de microorganismos en profundidad.

1.6 Bioestimulantes

El concepto de bioestimulante incluye cualquier sustancia, microorganismo o combinación de ambos, aplicado a plantas, semillas o sistema radicular con el propósito de estimular procesos naturales en la planta que mejoren su eficiencia nutricional, tolerancia a estreses abióticos y/o atributos de calidad, con independencia del contenido nutricional (du Jardin, 2015; Le Mire et al., 2016). Debido a la naturaleza

diversa de los bioestimulantes, ya que pueden ser microorganismos, extractos de plantas, sustancias o mezclas de éstos, los mecanismos de acción y sus efectos son igualmente diversos. Diferentes autores señalan la activación de mecanismos celulares que desencadenan procesos fisiológicos en la planta como aumento del crecimiento radicular, mejora de la composición mineral en los tejidos, incremento de la tolerancia a estreses abióticos y mejora de la concentración de nutrientes (Billard et al., 2013; du Jardin, 2015). Los efectos de los bioestimulantes sobre la fisiología de las plantas dependen de múltiples factores como el modo de aplicación, dosis, las condiciones medioambientales, la disponibilidad de nutrientes, etc. (du Jardin, 2012). Bajo condiciones de estrés abiótico, los bioestimulantes pueden aumentar el rendimiento de los cultivos y el contenido de compuestos bioactivos, además de mejorar la transpiración y aumentar la cantidad de biomasa (Dalal et al., 2019; Hernández, 2017).

Como consecuencia de la diversidad de los bioestimulantes, diferentes autores los han clasificado atendiendo a distintos criterios. Pueden clasificarse según la naturaleza de las materias primas utilizadas en la obtención de éstos, el mecanismo de acción, la formulación de uno o varios de sus componentes, etc. (du Jardin, 2012; Yakhin et al., 2017).

1.6.1 Tipos de bioestimulantes

Ácidos húmicos y fúlvicos

Los productos finales de la descomposición y degradación química de la microbiota del suelo llevada a cabo por los microorganismos presentes en él son las sustancias húmicas. Estas son el constituyente principal de la materia orgánica del suelo y están formadas por moléculas complejas de estructura heterogénea. Se clasifican en base a su peso molecular y solubilidad en ácidos húmicos y fúlvicos. Ambos son solubles en medios básicos, pero los ácidos fúlvicos también lo son en medios ácidos. Otra diferencia entre ellos es que los ácidos húmicos poseen mayor peso molecular que los ácidos fúlvicos (du Jardin, 2012; Calvo et al., 2014). La composición y estructura de estos ácidos depende del origen del material orgánico y del tiempo de transformación.

Proteínas hidrolizadas y aminoácidos

Dentro de los bioestimulantes formulados a base de proteínas encontramos dos categorías; por un lado, proteínas hidrolizadas a partir de la mezcla de péptidos y

aminoácidos animales y vegetales, y por otro, aminoácidos individuales como el glutamato, prolina, glutamina o glicina betaína. Existen evidencias de que la aplicación de aminoácidos y proteínas tienen efectos sobre el metabolismo de las plantas, como la estimulación de determinadas enzimas involucradas en la ruta de asimilación del nitrógeno. Además de mejorar la tolerancia a estreses bióticos y abióticos (du Jardin, 2012, 2015; Calvo et al., 2014)

Extractos de algas y botánicos

La utilización de algas como fuente de materia orgánica y fertilizante en agricultura no es reciente pero el estudio de sus efectos bioestimulantes sí lo son. La mayoría de los extractos utilizados pertenecen a las algas pardas o feofíceas como *Laminaria*, *Fucus* o *Turbinaria*. Los componentes presentes en las algas marinas como macro y micronutrientes, auxinas, citoquininas, vitaminas y polisacáridos únicos de éstas (laminarina y alginatos), tienen efectos sobre el metabolismo celular de las plantas, mejorando el crecimiento y rendimiento de los cultivos, además de estimular respuestas de defensa natural (Khan et al., 2009; Calvo et al., 2014; du Jardin, 2015).

Compuestos inorgánicos

Elementos como el aluminio, cobalto, sodio o selenio no son esenciales para las plantas, pero están considerados beneficiosos para los cultivos y pueden promover el crecimiento vegetal. Entre los efectos beneficiosos que se han descrito está el aumento de la tolerancia frente a estreses bióticos y abióticos, mejora del crecimiento vegetal y la calidad de los frutos (Pilon-Smits et al., 2009; Kaur et al., 2015).

Hongos

La relación que establecen los hongos con las raíces de las plantas va desde la simbiosis hasta el parasitismo. Concretamente, los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) representan un grupo extenso y heterogéneo de microorganismos del suelo con importantes efectos sobre diferentes procesos que tienen lugar en el ecosistema. En particular, tienen un papel importante en la nutrición vegetal de las plantas ya que sus hifas actúan de manera similar a la que lo hacen los pelos radiculares. La aplicación combinada de estos hongos con bacterias beneficiosas puede aumentar la absorción de nutrientes como el fósforo, hierro, calcio y manganeso. Estos hongos poseen un papel

clave en la adaptación de la vegetación a las condiciones de estrés abiótico propia de sistemas semiáridos (Alguacil et al., 2016).

Bacterias

La aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) en plantas, semillas o suelo puede favorecer la disponibilidad y absorción de nutrientes como el nitrógeno, fósforo y potasio y aumentar la biomasa y el área radicular. Bacterias pertenecientes a géneros como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, han desarrollado estrategias de adaptación para sobrevivir en condiciones adversas y tienen la capacidad de actuar como bioestimulantes. Uno de los géneros más estudiados por tener la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico es *Azospirillum*, para lo que crea una estrecha relación con el tejido radicular de las plantas. En cuanto a los mecanismos de solubilización de nutrientes, por un lado, encontramos aquellas bacterias capaces de solubilizar fósforo mediante la producción de ácidos orgánicos y fosfatasas, y por otro lado, las solubilizadoras de potasio, cuyo mecanismo consiste en la solubilización de rocas ricas en potasio, como la mica, excretando ácidos orgánicos que disuelven las rocas o quelatan los iones de silicio (Calvo et al., 2014). Existen evidencias del aumento del área foliar y la biomasa total de la planta y de una mayor acumulación de prolina cuando se inoculan ciertas bacterias a plantas que están sometidas a diferentes estreses abióticos (Van Oosten et al., 2017).

1.7 Ozono

El ozono (O₃) es una molécula en la que el oxígeno se disocia en su forma atómica y a su vez ésta reacciona con otras moléculas de oxígeno circundantes. Debido a la inestabilidad de su estructura, el ozono reacciona con el agua formando radicales hidroxilo. Por ello, es la forma más oxidante de este elemento con la particularidad de ser parcialmente soluble en agua y muy inestable, de modo que no deja residuos tóxicos (Langlais et al., 1991). Debido a su efecto oxidante es utilizado de forma efectiva para el control del crecimiento de microorganismos en la industria alimentaria y el tratamiento de agua potable (Wang et al., 2006), además de ser utilizado para aumentar la vida útil de frutas y vegetales en postcosecha (Guzel-Seydim et al., 2004; Naito y Takahara, 2006).

Recientemente el uso del ozono en la agricultura está generando gran interés por las posibilidades que éste posee en el control de plagas y enfermedades. Se ha descrito la utilidad de las pulverizaciones aéreas en la reducción de germinación de conidios de hongos del género *Alternaria* (Ames et al., 2013). Además, ha mostrado un efecto insecticida sobre especies de áfidos (Ebihara et al., 2013). En cuanto a la aplicación de agua ozonizada al suelo, existen evidencias de la disminución de conidios de *Fusarium oxysporum* (Igura et al., 2004; Fujiwara et al., 2006), además de la disminución de poblaciones de bacterias y nemátodos en el suelo (Bucio et al., 2016). Sin embargo, son escasos los estudios científicos que demuestran los posibles efectos del riego con agua ozonizada sobre la fertilidad de éste, como puede ser el aumento de la capacidad de infiltración debido a la oxidación de la materia orgánica presente en el suelo (Raub et al., 2001) o la oxigenación del suelo debido al aumento de otras formas activas de oxígeno y el consecuente aumento de la productividad de biomasa (Peykanpour et al., 2016). A pesar de estas ventajas, también se han descrito algunos efectos negativos sobre el suelo como la disminución del pH, afectando así a la disponibilidad de nutrientes, además de cambios en la conductividad eléctrica y en las actividades enzimáticas (Díaz-López et al., 2021; Ebihara et al., 2012). Estos cambios pueden afectar a la interacción suelo-planta haciendo que el funcionamiento de las comunidades microbianas y el ecosistema edáfico se vean alterados.

2 OBJETIVOS

La intensificación de los cultivos y la erosión provocada por causas naturales afectan de forma negativa a la calidad y fertilidad del suelo, con la consiguiente pérdida de productividad de los cultivos. El desarrollo sostenible de la Región de Murcia y en particular del sector agroalimentario, requiere la implantación de estrategias sostenibles que permitan mantener y optimizar la producción, calidad y estado sanitario de los cultivos, minimizando el riesgo medioambiental.

Los bioestimulantes vegetales son una herramienta cada vez más utilizada en agricultura por su capacidad de estimular el sistema de defensa de la planta frente a diversos estreses bióticos y abióticos, además de mejorar su eficiencia nutricional y combatir plagas y enfermedades, sin afectar de forma negativa al medio ambiente ni a la salud. Dentro de la amplia gama de bioestimulantes existentes, los productos a base de microorganismos y los compuestos procedentes de la descomposición de la materia orgánica juegan un papel relevante para aumentar la tolerancia al estrés, además de mejorar mecanismos como la absorción y solubilización de nutrientes. A pesar de su creciente empleo, existe escasa información sobre su eficacia bajo condiciones y cultivos específicos y sobre aspectos tan importante como es la fertilidad del suelo.

Asimismo, la aplicación de agua ozonizada a los cultivos ha despertado recientemente gran interés por sus posibilidades dentro del control de plagas y enfermedades, como elicitador de la respuesta de la planta al estrés oxidativo y para la eliminación de una amplia gama de contaminantes orgánicos, entre ellos, plaguicidas. Sin embargo, la naturaleza oxidante del ozono podría afectar, cuando es aplicado a través del agua de riego, a la calidad y fertilidad del suelo e interactuar con los microorganismos beneficiosos del suelo, aspecto del que existe escasa información.

Dada la importancia económica del cultivo de pimiento para la Región Murcia y la necesidad de herramientas respetuosas con el medioambiente y la salud que contribuyan al aumento de la productividad y calidad de los cultivos, el objetivo principal del presente trabajo es evaluar el efecto del riego con agua ozonizada y su combinación con bioestimulantes vegetales sobre la fertilidad del suelo en un cultivo de pimiento

bajo invernadero. Para conseguir el objetivo general se llevan a cabo los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la evolución de la fertilidad del suelo durante un ciclo de cultivo de pimiento bajo invernadero, utilizando como indicadores de calidad las actividades enzimáticas β -glucosidasa, fosfatasa ácida y alcalina, deshidrogenasa y ureasa en el suelo.
2. Conocer el efecto de bioestimulantes microbianos (hongos micorrízicos arbusculares, bacterias fijadoras de nitrógeno y bacterias solubilizadoras de fósforo y potasio) sobre las actividades enzimáticas del suelo.
3. Conocer el efecto de bioestimulantes a base de constituyentes naturales de la materia orgánica del suelo (ácidos húmicos y fúlvicos) sobre las actividades enzimáticas del suelo.
4. Valorar la interacción de los bioestimulantes microbianos y ácidos fúlvicos y húmicos con el uso de agua ozonizada a través del riego, sobre la fertilidad del suelo.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Descripción de la zona de estudio

El ensayo fue llevado a cabo en el Centro de Demostración y Transferencia Tecnológica (CDTA) “El Mirador”, perteneciente a la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, situado en San Javier (Murcia). Las coordenadas de la ubicación de la finca son las siguientes: 37°50'52.2"N 0°52'58.3"W (Figura 9).



Figura 9. Imagen aérea de la ubicación de la finca. Fuente: Google Maps.

El cultivo se realizó en suelo, entre diciembre y julio, en un invernadero multitúnel, utilizando pimiento de la variedad comercial Maestral (Fitó).

3.2 Diseño experimental

Los tratamientos incluyeron el uso de agua ozonizada y el uso de diferentes combinaciones bioestimulantes (estrategias) utilizando hongos micorrízicos arbusculares (HMA), rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (BPCV) y ácidos húmicos y fúlvicos. En concreto, las diferentes estrategias bioestimulantes fueron: Estrategia 0 (control), en la que no se aplicó ningún bioestimulante; Estrategia 1, en la que se combinó la aplicación HMA con BPCV y la Estrategia 2 en la que se aplicaron de forma conjunta ácidos húmicos y fúlvicos y BPCV. Como resultado de la

combinación de dichas estrategias con el uso de agua ozonizada a través del riego, resultaron un total de seis tratamientos:

- ✓ T1: Estrategia 0
- ✓ T2: Estrategia 1
- ✓ T3: Estrategia 2
- ✓ T1-O₃: Estrategia 0 + riego con agua ozonizada
- ✓ T2-O₃: Estrategia 1 + riego con agua ozonizada
- ✓ T3-O₃: Estrategia 2 + riego con agua ozonizada

Los tratamientos se distribuyeron según un diseño de bloques al azar (3 bloques), de acuerdo con el esquema representado en la Figura 10. En cada uno de los extremos del invernadero se dejaron tres líneas que no se consideraron para la realización de los muestreos (bordes). Después del trasplante, se procedió a realizar un riego con agua a capacidad de campo y, posteriormente, las plantas fueron sometidas a un período de sequía de 67 días para favorecer el desarrollo radicular y la colonización de las micorrizas.

3.2.1 Fertirrigación

La dosis de agua aportada durante todo el ciclo de cultivo fueron 2400 m³ha⁻¹. En los tratamientos regados sin agua ozonizada, las unidades fertilizantes totales fueron 80 N, 190 P₂O₅, 360 K₂O, 90 CaO y 13 MgO, aportadas como nitrato potásico, nitrato cálcico, fosfato monopotásico y nitrato de magnesio. En el caso de los tratamientos regados con agua ozonizada, la disolución de riego se mezcló, antes de ser aplicada a las plantas, con agua ozonizada en una proporción de un 20 %, por lo que la dosis de fertilizantes fue un 20 % menor que en los tratamientos sin ozono.

Puerta	Fila	Tratamiento	Tratamiento	Bloque	N.º de plantas
CAMINO	1	Borde	Borde	BLOQUE 1	35
	2	Borde	Borde		35
	3	Borde	Borde		35
	4		1		35
	5		1-O ₃		35
	6		3-O ₃		35
	7		3		35
	8		2		35
	9		2-O ₃		35
	10		1-O ₃	BLOQUE 2	35
	11		2		35
	12		3-O ₃		35
	13		1		35
	14		2-O ₃		35
	15		3		35
	16		3-O ₃	BLOQUE 3	35
	17		3		35
	18		1		35
	19		2-O ₃		35
	20		2		35
	21		1-O ₃		35
	22		Borde	Borde	35
	23		Borde	Borde	35
	24		Borde	Borde	35

Figura 10. Mapa de distribución de los tratamientos en el invernadero.

3.2.2 Ozono

Los riegos con agua ozonizada comenzaron 67 DDT, coincidiendo con la finalización del periodo de sequía. La concentración de O_3 en el agua empleada para el riego fue de 180 ppb O_3 y se aplicó, en una proporción del 20 %, en cada evento de riego.

Para la ozonización del agua se empleó un generador de ozono ASP SP45-plus (Asepsia, España) que transforma el oxígeno previamente inyectado hasta su forma triatómica a través de descargas eléctricas que activan energicamente los átomos de la molécula de oxígeno, haciendo que estos se unan de tres en tres. El ozono generado se inyectaba de forma continua en un tanque de 500 litros y se realizaba una agitación mecánica con el fin de homogeneizar todo el volumen de agua. Se comprobaba que el potencial redox del agua generada estaba en todo momento por encima de 800 mV, indicativo de que la concentración de ozono era superior a 0,2 mg/L (Figura 11). Además, se medía la concentración de ozono a la salida del gotero mediante un colorímetro de lectura directa (Palintest) cuyo rango de detección es de 0,01 y 3 mg/L.

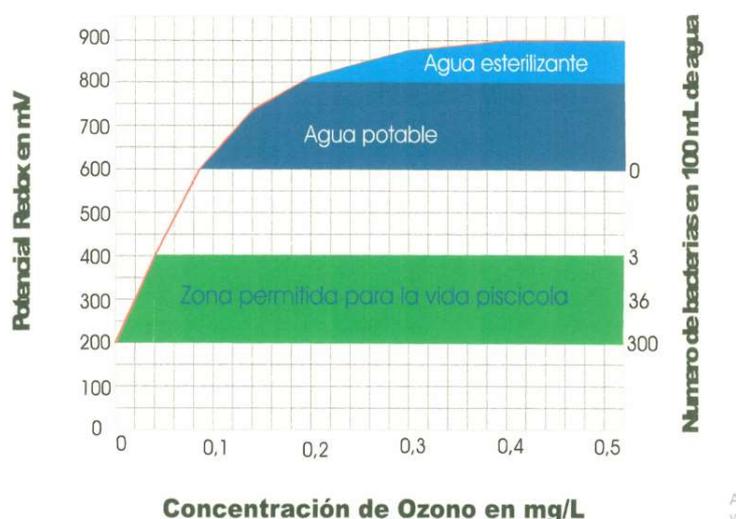


Figura 11. Relación entre el potencial redox y la concentración de ozono.

3.2.3 Bioestimulantes

Las estrategias bioestimulantes empleadas incluyeron el uso de diferentes productos comerciales:

- ✓ Agromic®. Formulado sólido formado por diferentes especies de hongos micorrízicos arbusculares. Las especies utilizadas para su formulación son:

Rhizophagus intraradices, *Funneliformis mosseae* y *Funneliformis caledonium*. La dosis de aplicación fue 3 g planta⁻¹ en el momento del trasplante en campo, haciendo que quedara el inóculo lo más cerca posible de las raíces a la hora de realizar la plantación.

- ✓ Bactogreen®. Mezcla de bacterias fijadoras de nitrógeno (*Azospirillum brasilense*) y solubilizadoras de potasio (*Bacillus megaterium* y *Bacillus circulans*) y fósforo (*Pseudomonas fluorescens*). La dosis fue 0,3 mL planta⁻¹, aplicada en el trasplante y 67, 128 y 181 días después del trasplante (DDT).
- ✓ Mejorador Luqsa®. Producto comercial compuesto por extracto húmico 67 % (ácidos húmicos 60 %, ácidos fúlvicos 7 %), procedente del procesado de leonardita. El tratamiento con este producto comenzó 67 DDT a una dosis de 0,6 g planta⁻¹ y la frecuencia de aplicación fue cada dos semanas.

3.3 Toma de muestras

3.3.1 Muestras para el análisis de la composición del suelo

Para el análisis de la composición del suelo, se realizaron dos muestreos. El primero corresponde al suelo antes del trasplante y el segundo tras la aplicación de bioestimulantes (97 DDT). Se muestreó aproximadamente 1 kg de suelo por repetición, profundizando 15 cm desde la superficie.

3.3.2 Muestras para el análisis de actividades enzimáticas

Se llevaron a cabo un total de cinco muestreos a lo largo del ensayo. El primer muestreo (control) se realizó antes del trasplante y los siguientes muestreos se realizaron 67, 97, 153 y 215 DDT. Las muestras se recogieron de la zona más cercana a la rizosfera. Para ello se quitó la capa más superficial del suelo, realizando un agujero entre 10-15 cm y se recogieron aproximadamente 500 g de suelo de tres puntos diferentes en cada uno de los bloques (Figura 12). Tras su recogida, las muestras se llevaron al laboratorio donde se extendieron en bandejas y se mantuvieron a temperatura ambiente para que se secaran. Una vez secas se pasaron por un tamiz con luz de malla de 2 mm y se conservaron a -20 °C hasta su posterior análisis.



Figura 12. Fotografía del método de muestreo.

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Suelos

La composición del suelo se analizó en un laboratorio externo, utilizando metodologías basadas en normas estándar de calidad: pH en el extracto acuoso del suelo (ISO 10390), materia orgánica y carbono orgánico (%), UNE 103204), extracto húmico (%), Fer005), fósforo asimilable (ppm, Sue0003), potasio asimilable (ppm, Qui0011), nitrógeno total y carbonato cálcico total (%), Qui0002), carbonato cálcico activo (%), Sue0004).

3.4.2 Actividades enzimáticas

3.4.2.1 Determinación de la actividad β -glucosidasa

El método utilizado se basó en la determinación colorimétrica del p-nitrofenol liberado tras la incubación del suelo con el sustrato p-nitrofenil glucósido (Sigma-Aldrich, Alemania), en medio tamponado a pH 6, durante una hora a 37 °C (Alef y Nannipieri, 1995; Eivazi y Tabatabai, 1988; Tabatabai, 1983). Tras la incubación, la reacción se paró adicionando CaCl_2 y THAM-NaOH (pH 12). Las muestras se analizaron por duplicado y se incluyó un blanco se utilizó como control para restar la señal de la muestra en la medida de la absorbancia. El proceso fue el mismo que para las muestras, pero añadiendo el sustrato tras la adición del tampón THAM-NaOH (pH 12). La absorbancia, se midió a 400 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu, UV-2401 PC, Kyoto, Japón). La actividad enzimática fue expresada como $\mu\text{g p-nitrofenol g}^{-1}\text{PS}$.

3.4.2.2 Determinación de la actividad fosfatasa ácida y alcalina

La metodología utilizada está basada en la determinación colorimétrica del p-nitrofenol después de la incubación del suelo con p-nitrofenil fosfato, en medio tamponado a pH 6,5 y 11 para la fosfatasa ácida y alcalina respectivamente, durante una hora a 37 °C (Eivazi y Tabatabai, 1977; Tabatabai y Bremner, 1969). La metodología seguida es la misma que la descrita para el análisis de la actividad enzimática β -glucosidasa. La actividad enzimática fue expresada como $\mu\text{g p-nitrofenol g}^{-1}\text{PS}$.

3.4.2.3 Determinación de la actividad deshidrogenasa

El método de determinación de la deshidrogenasa está basado en la estimación de la reducción de cloruro de tetrazolio (TTC), que actúa como aceptor artificial de electrones, a trifenil formazán (TPF) tras la incubación durante 24 horas a 30 °C (Alef y Nannipieri, 1995; Casida et al., 1964). La reacción enzimática se paró utilizando acetona. La absorbancia del extracto obtenido se midió en un espectrofotómetro (Shimadzu, UV-2401 PC, Kyoto, Japón) a 546 nm. Todas las muestras se analizaron por duplicado y en oscuridad. En cada serie se incluyó un blanco inhibido con Tris-HCl pH 7,4. La actividad enzimática fue expresada como $\mu\text{g TPF g}^{-1}\text{PS}$.

3.4.2.4 Determinación de la actividad ureasa

La metodología utilizada está basada en la determinación colorimétrica del amonio liberado tras la incubación del suelo con una disolución de urea durante 2 horas a 37 °C (Kandeler y Gerber, 1988). La reacción se paró añadiendo KCl y se procedió a la determinación del amonio formado, a 1 mL del líquido filtrado se le añadieron 9 mL de agua destilada, 5 mL de una solución de salicilato y nitroprusiato de sodio mezclada con NaOH y agua destilada a partes iguales y 2 mL de dicloroisocianurato de sodio. Esta mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 30 min, tiempo tras el cual se midió la absorbancia a 690 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu, UV-2401 PC, Kyoto, Japón). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y se realizó un blanco sustituyendo la urea por agua destilada durante la incubación. La actividad enzimática fue expresada como $\mu\text{g NH}_4 \text{g}^{-1}\text{PS h}^{-1}$.

3.5 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron estadísticamente usando el programa IBM SPSS Statistic 21. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efecto del tratamiento con bioestimulantes y/o agua ozonizada sobre la composición del suelo

El suelo presentaba un pH básico, habitual en la zona, y niveles de materia orgánica y carbono orgánico muy bajos (Tablas 2 y 3). Se observaron diferencias significativas entre los parámetros del suelo en el muestreo inicial (antes del cultivo) y los suelos tratados (al final del cultivo) debido a los procesos que se desarrollan durante el cultivo y al aporte de fertilizantes. Tras los tratamientos, la mayoría de los parámetros estudiados en el suelo no se vieron afectados por la aplicación de estos, tanto en los suelos regados con agua como en los regados con agua ozonizada. Solamente el porcentaje de extracto húmico se vio afectado significativamente por el efecto de los tratamientos, específicamente por el tratamiento T3, el cual incluía ácidos húmicos y fúlvicos. Este efecto se observó tanto en las áreas regadas con agua sin ozono como en las regadas con agua ozonizada.

Tabla 2. Propiedades del suelo antes y después del tratamiento con bioestimulantes y riego sin ozono.

	Suelo inicial	T1	T2	T3	Sig.
pH	8,3	8,3	8,4	8,3	ns
Extracto húmico (%)	0,51 ^a	0,53 ^a	0,57 ^a	0,61 ^b	*
Capacidad de cambio	12,6	12,1	11,4	13	ns
P asimilable (ppm)	41,5 ^a	78,4 ^b	74,3 ^b	69,1 ^b	*
K asimilable (ppm)	598 ^a	781 ^b	796 ^b	763 ^b	**
Materia orgánica (%)	0,94 ^b	0,75 ^a	0,56 ^a	0,65 ^a	*
Carbono orgánico (%)	0,54 ^b	0,45 ^a	0,36 ^a	0,39 ^a	*
Nitrógeno total (%)	0,06	0,07	0,05	0,05	ns
Caliza total (%)	43,5	41,9	41,4	40,5	ns
Caliza activa (%)	14,5	14,5	14,4	15,5	ns

ns: no significativo. *, **, *** Las diferencias estadísticamente significativas a $P < 0,1$, $P < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente. Las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas (test de Duncan, $P \leq 0,05$) entre columnas.

Tabla 3. Propiedades del suelo antes y después del tratamiento con bioestimulantes y riego con agua ozonizada.

	Suelo inicial	T1-O ₃	T2-O ₃	T3-O ₃	Sig.
pH	8,3 ^{bc}	8,2 ^b	7,9 ^a	8,2 ^b	**
Extracto húmico (%)	0,51 ^a	0,58 ^a	0,55 ^a	0,67 ^b	*
Capacidad de cambio	12,6	11,9	10,2	11,6	ns
P asimilable (ppm)	41,5 ^a	64,8 ^b	64,1 ^b	63 ^b	**
K asimilable (ppm)	598 ^a	599 ^a	635 ^b	665 ^b	**
Materia orgánica (%)	0,94 ^b	0,65 ^a	0,63 ^a	0,71 ^a	*
Carbono orgánico (%)	0,54 ^b	0,35 ^a	0,35 ^a	0,41 ^a	*
Nitrógeno total (%)	0,06	0,05	0,05	0,05	ns
Caliza total (%)	43,5	41,9	39,9	42,2	ns
Caliza activa (%)	14,5	15,1	14,5	14,6	ns

ns: no significativo. *, **, *** Las diferencias estadísticamente significativas a P<0,1, P<0,05 y P<0,01, respectivamente. Las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas (test de Duncan, P≤0,05) entre columnas.

4.2 Efecto del tratamiento con bioestimulantes y/o agua ozonizada sobre el rendimiento del cultivo

La aplicación de los diferentes tratamientos bioestimulantes y el riego con agua ozonizada no afectaron a la producción total (Figura 13), al número (Figura 14) y peso medio de los frutos (Figura 15) respecto al control (T1).

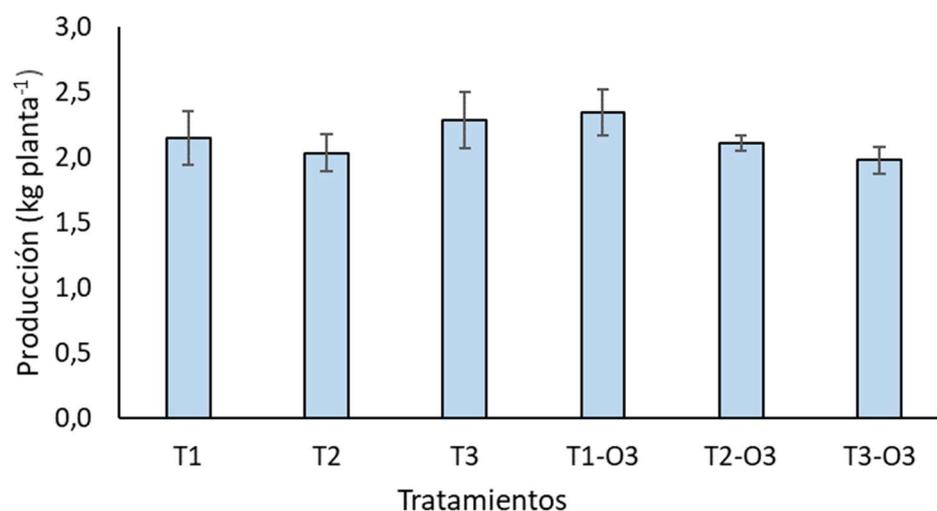


Figura 13. Efecto de los tratamientos con bioestimulantes y su combinación con el riego con agua ozonizada sobre la producción total (kg planta⁻¹).

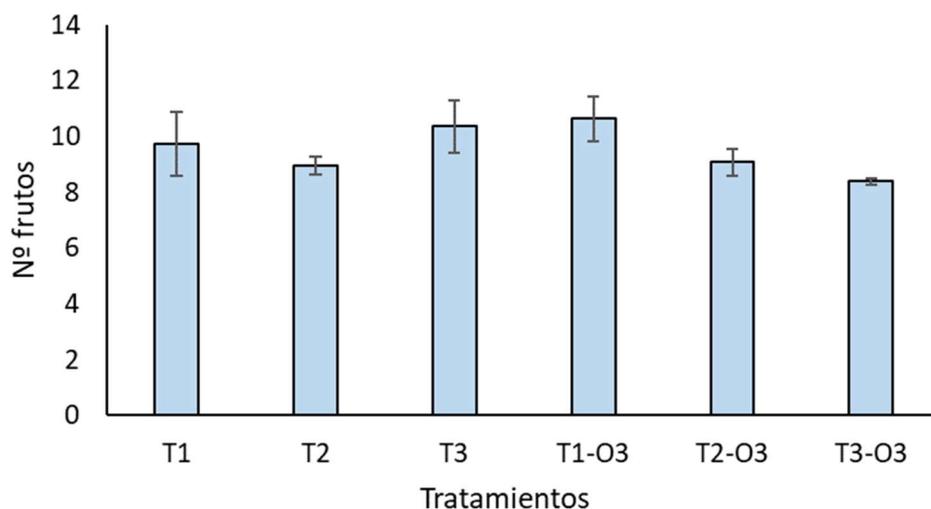


Figura 14. Efecto de los tratamientos con bioestimulantes y su combinación con el riego con agua ozonizada sobre el número de frutos.

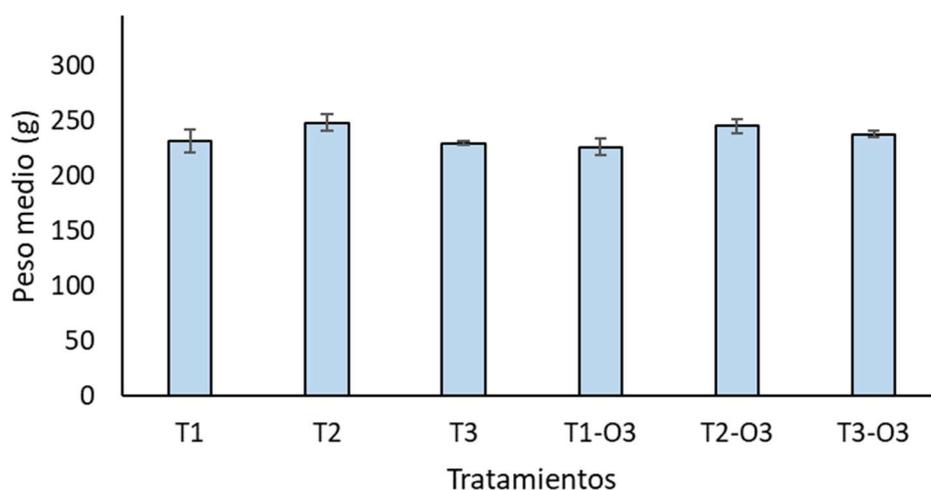


Figura 15. Efecto de los tratamientos con bioestimulantes y su combinación con el riego con agua ozonizada sobre el peso medio de los frutos (g).

4.3 Efecto del tratamiento con bioestimulantes y/o agua ozonizada sobre la actividad microbiológica del suelo

En la naturaleza, las interacciones entre poblaciones microbianas están reguladas por factores tanto físicos como químicos y se desarrollan en el suelo y en la planta. Estas interacciones son especialmente complejas en el suelo, ya sea entre

especies de microorganismos o con las raíces de las plantas. El equilibrio de estos sistemas influye mucho en la productividad agrícola, debido en gran medida a los enzimas exógenos producidos por estos microorganismos, los cuales tienen un papel esencial en los principales ciclos de nutrientes, transformando los sustratos específicos en productos asimilables por las raíces de las plantas.

4.3.1 Actividad enzimática β -glucosidasa

El enzima β -glucosidasa es uno de los enzimas relacionados con el ciclo del carbono y es responsable del último paso en la descomposición de la materia orgánica del suelo, liberando azúcares sencillos que son utilizados, tanto por el microbioma del suelo como por las raíces de las plantas como fuente de carbono y energía.

Durante el cultivo, la actividad de este enzima aumentó independientemente del tratamiento aplicado, excepto una disminución puntual observada 153 DDT (Figuras 16 y 17). No se observaron diferencias significativas en la actividad de este enzima entre los suelos control (T1) y los tratados (T2 y T3). La combinación BPCV con ácidos fúlvicos y húmicos no mejoró los resultados obtenidos al aplicar el tratamiento con HMA-BPCV. Tampoco se observaron diferencias al combinar ambos tratamientos con el riego con agua ozonizada (Figura 16).

La composición y tipo de suelo, al igual que el manejo agrícola, afectan a los microorganismos presentes en este, así como a las actividades enzimáticas que se desarrollan en él (Gianfreda y Ruggiero, 2006). Por este motivo la bibliografía muestra una gran dispersión en los resultados de actividad β -glucosidasa. Así, en un estudio realizado en diferentes fincas bajo diferentes manejos agronómicos y que presentaban diversos tipos de suelo, Henríquez et al. (2014) encontraron valores de actividad β -glucosidasa entre 31,9 y 208,1 $\mu\text{g PNP g}^{-1}$. Sin embargo, en otros trabajos la dispersión es más amplia y se han determinado niveles de actividad enzimática entre 12,5 y 5629 $\mu\text{g PNP g}^{-1}$ (Paul y Clark, 2007). Nuestros resultados (15 $\mu\text{g PNP g}^{-1}$, al finalizar el cultivo), presentan niveles bastante bajos debido probablemente al bajo porcentaje de carbono orgánico (>0,5 %) presente en el suelo.

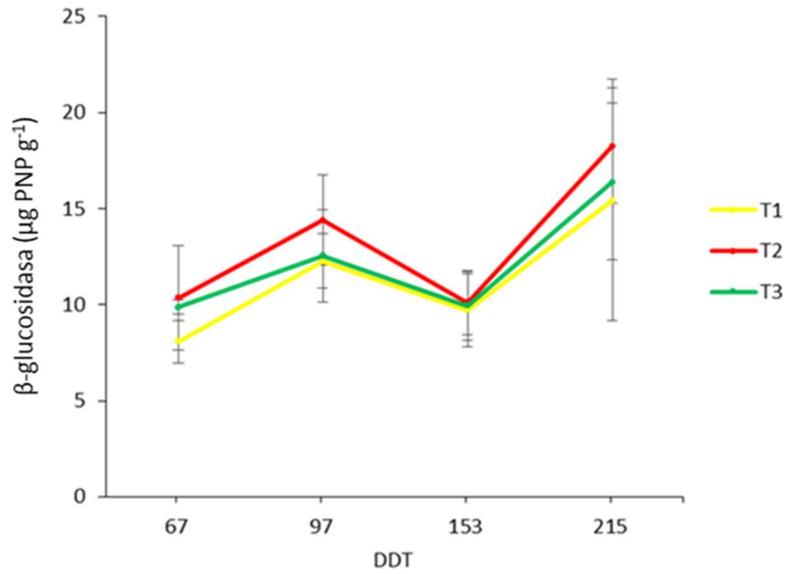


Figura 16. Efecto de tratamientos bioestimulantes con HMA-BPCV (T2) y BPCV con ácidos húmicos y fúlvicos (T3) sobre la evolución de la actividad β -glucosidasa ($\mu\text{g PNP g}^{-1}$), en suelos en los que se utilizaba agua sin ozono para el riego.

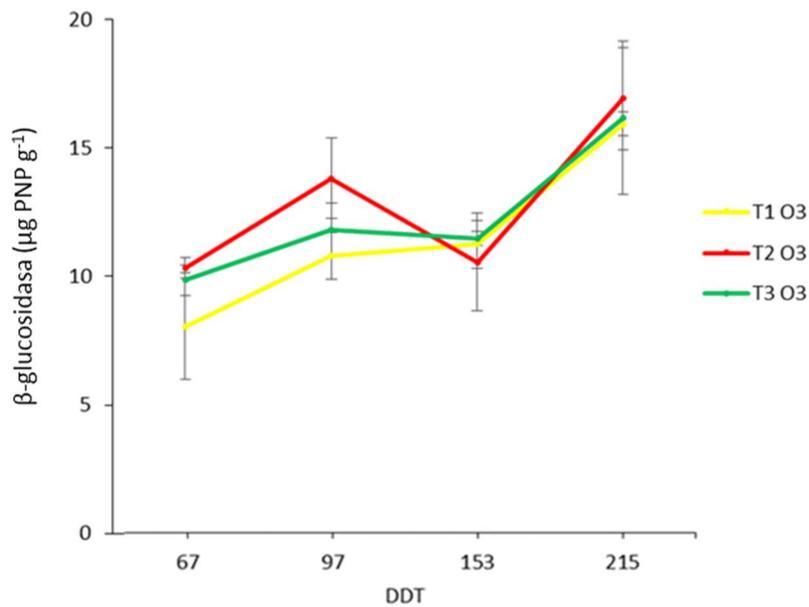


Figura 17. Efecto del tratamiento con HMA-BPCV (T2) y BPCV con ácidos húmicos y fúlvicos (T3) sobre la evolución de la actividad β -glucosidasa ($\mu\text{g PNP g}^{-1}$), en suelos en los que se utilizaba agua ozonizada para el riego.

4.3.2 Actividad enzimática fosfatasa ácida y alcalina

Las fosfatasas catalizan la hidrólisis de los ésteres del ácido fosfórico liberando el fósforo y haciéndolo accesible para los microorganismos del suelo y las plantas. Al igual

que β -glucosidasa, la medida de su actividad se utiliza como indicador para valorar el efecto que poseen diferentes tratamientos o manejos en la calidad de un suelo (Gianfreda y Ruggiero, 2006). Este enzima es activa bajo condiciones acidas (pH 4-6) y alcalinas (pH 9-11). En nuestro caso, los valores de la actividad a pH alcalino fueron superiores a los determinados a pH ácido, con una media de $100 \mu\text{g PNP g}^{-1}$ frente a $60 \mu\text{g PNP g}^{-1}$ al final del cultivo. Estos resultados se relacionan directamente con el pH del suelo que fue ligeramente alcalino (pH 8,3) (Tablas 2 y 3).

Los tratamientos bioestimulantes aplicados, utilizando agua o agua ozonizada para el riego, no afectaron a la actividad fosfatasa ácida durante los primeros 153 DDT (Figuras 18 y 19), no observándose diferencias significativas entre estos y el control.

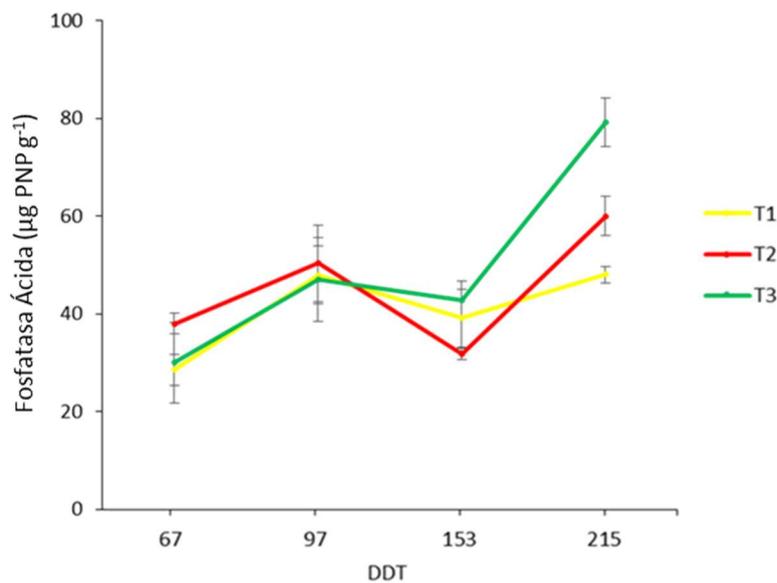


Figura 18. Efecto del tratamiento con HMA-BPCV (T2) y BPCV con ácidos húmicos y fúlvicos (T3) en suelo sobre la evolución de la actividad fosfatasa ácida ($\mu\text{g PNP g}^{-1}$), en suelos en los que se utilizaba agua sin ozono para el riego.

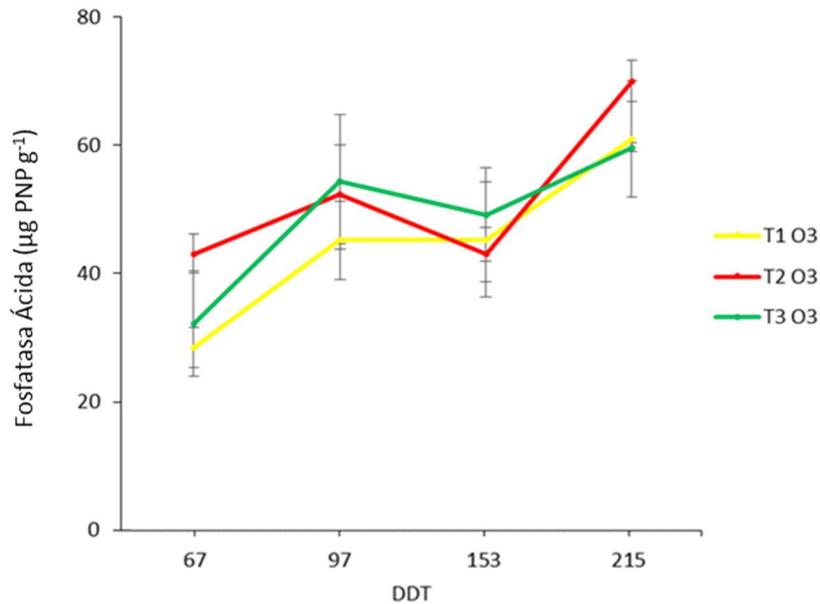


Figura 19. Efecto del tratamiento con HMA-BPCV (T2) y BPCV con ácidos húmicos y fúlvicos (T3), sobre la evolución de la actividad fosfatasa ácida ($\mu\text{g PNP g}^{-1}$), en suelos en los que se utilizaba agua ozonizada para el riego.

A partir de 153 DDT, la actividad enzimática aumentó significativamente hasta el final del ensayo. Además, en suelo en los que no se aplicó agua ozonizada, los tratamientos con bioestimulantes (T2 y T3) aumentaron la actividad del enzima respecto al control (Figura 18). El tratamiento T3 obtuvo el mayor valor de actividad de este enzima como consecuencia de la acción conjunta de las bacterias NPK y ácidos húmicos y fúlvicos.

Solo se observaron diferencias entre los tratamientos en la actividad fosfatasa alcalina al final del cultivo, 215 DDT en el caso de riego con agua y 153 DDT cuando se aplicó agua ozonizada (Figuras 20 y 21). En el caso de riego sin agua ozonizada, el tratamiento combinado de bacterias y ácidos húmicos y fúlvicos (T3) fue el más efectivo para aumentar la actividad del enzima (Figura 20). Este aumento de la actividad no fue unido a un incremento del contenido de P disponible en el suelo (Tabla 2).

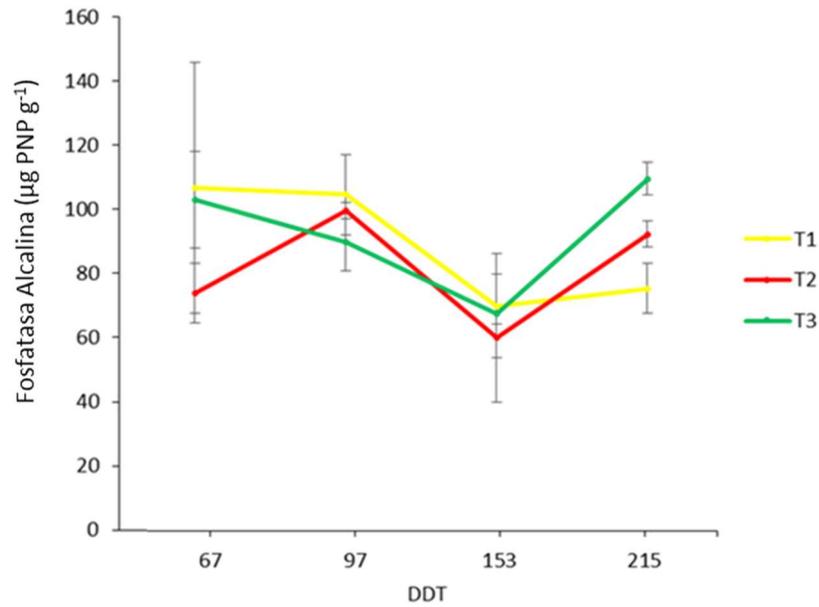


Figura 20. Efecto del tratamiento con HMA-BPCV (T2) y BPCV con ácidos húmicos y fúlvicos (T3) en suelo, sobre la evolución de la actividad fosfatasa alcalina ($\mu\text{g PNP g}^{-1}$), en suelos en los que se utilizaba agua sin ozono para el riego.

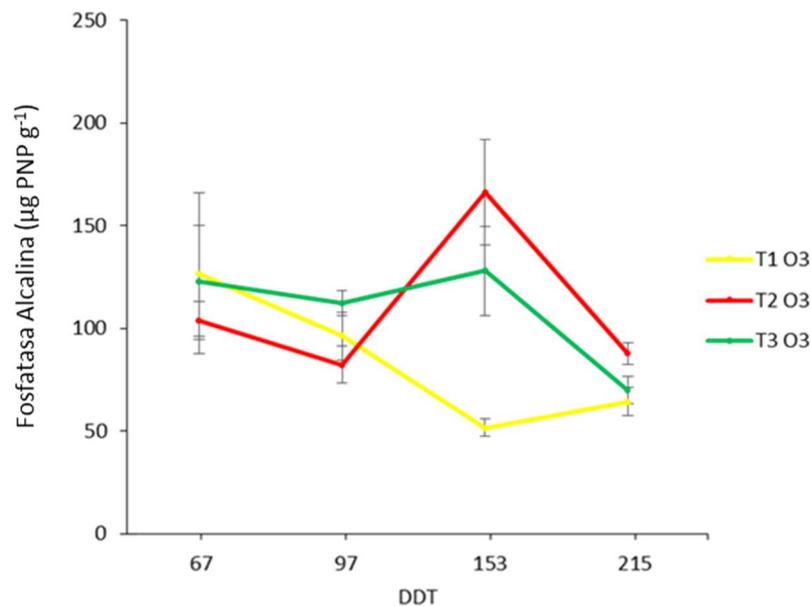


Figura 21. Efecto del tratamiento con HMA-BPCV (T2) y BPCV con ácidos húmicos y fúlvicos (T3), sobre la evolución de la actividad fosfatasa alcalina ($\mu\text{g PNP g}^{-1}$), en suelos en los que se utilizaba agua ozonizada para el riego.

Los altos niveles de P asimilable presentes en el suelo (Tablas 2 y 3) pueden provocar una inhibición de la actividad del enzima tanto su actividad ácida como alcalina) y, por lo tanto, que el efecto de los tratamientos no fuera tan eficaz como se

esperaba. En este sentido, algunos autores señalan una disminución de la actividad fosfatasa cuando los niveles de P en el suelo son muy elevados, ya que su acción se inhibe al existir mayor disponibilidad de este nutriente (Henríquez et al., 2014; Narváez et al., 2010). Otros autores señalan una correlación estricta entre las fosfatasas originadas por las raíces de las plantas y la disponibilidad de fósforo, concretamente en la rizosfera de suelos colonizados por hongos micorrízicos (Gianfreda y Ruggiero, 2006; Jøner y Jakobsen, 1995).

4.3.3 Actividad enzimática deshidrogenasa

La actividad enzimática deshidrogenasa participa en la oxidación biológica de compuestos orgánicos y es utilizada como indicador de la respiración de microorganismos del suelo. Por este motivo, la actividad del enzima permite obtener una idea global de que procesos microbianos tienen lugar en el suelo, ya que este enzima solo se encuentra presente en sistemas vivos (Henríquez et al., 2014). Durante la mayor parte del cultivo, hasta los 153 DDT, la actividad deshidrogenasa mostró un comportamiento similar para todos los tratamientos regados con agua o agua ozonizada (Figuras 22 y 23), no observándose diferencias significativas entre ellos. Al final del cultivo, se produjo un incremento de la actividad enzimática en los suelos con bioestimulantes (T2 y T3), observándose diferencias significativas con respecto al control (T1). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos T2 y T3, en ninguno de los dos ensayos (con o sin agua ozonizada). El aumento observado al final del cultivo puede estar relacionado con un incremento de la actividad de los microorganismos del suelo, como consecuencia del establecimiento de éstos a lo largo del ciclo de cultivo y el efecto de los bioestimulantes sobre la bioactividad del suelo.

Diversos autores describen una correlación positiva entre el contenido de materia orgánica y la actividad deshidrogenasa (Wolinska y Stepniewsk, 2012; Zhang et al., 2010). Sin embargo, en nuestro estudio no se detectaron diferencias significativas en el contenido de materia orgánica del suelo entre los diferentes tratamientos a pesar del aumento observado en la actividad deshidrogenasa al final del cultivo.

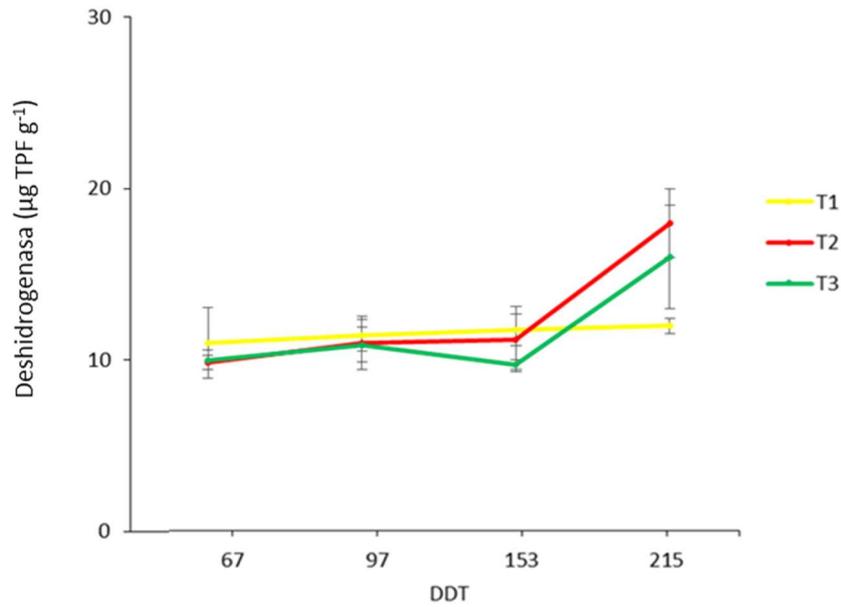


Figura 22. Efecto del tratamiento con HMA-BPCV (T2) y BPCV con ácidos húmicos y fúlvicos (T3) sobre la evolución de la actividad deshidrogenasa ($\mu\text{g TPF g}^{-1}$), en suelos en los que se utilizaba agua sin ozono para el riego.

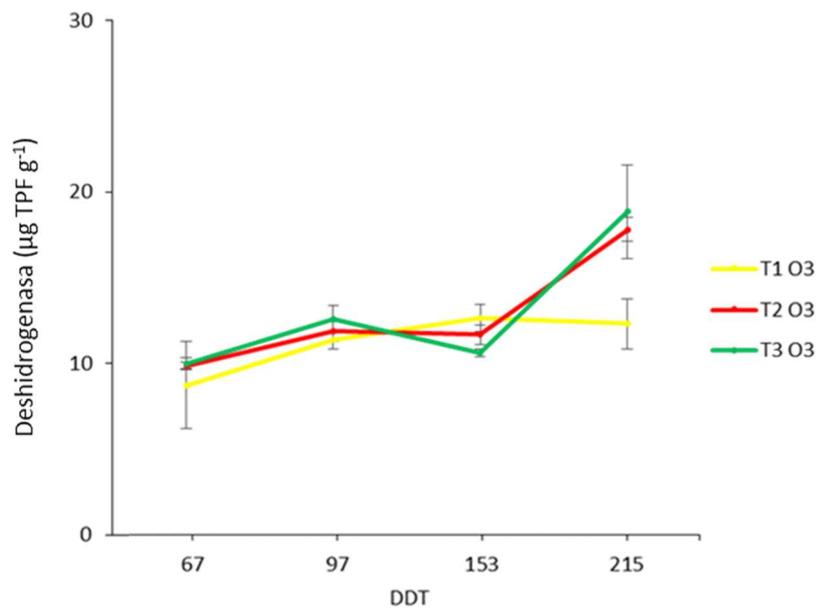


Figura 23. Efecto del tratamiento con HMA-BPCV (T2) y BPCV con ácidos húmicos y fúlvicos (T3), sobre la evolución de la actividad deshidrogenasa ($\mu\text{g TPF g}^{-1}$), en suelos en los que se utilizaba agua ozonizada para el riego.

4.3.4 Actividad enzimática ureasa

La actividad ureasa lleva a cabo la hidrólisis de uniones peptídicas de amidas lineales, produciendo amonio y dióxido de carbono como productos. Su actividad está relacionada con la mineralización de la urea presente en los residuos orgánicos y fertilizantes químicos (Quintero et al., 2003).

La actividad enzimática disminuyó a lo largo del cultivo, en todos los tratamientos bioestimulantes incluido el control, regados con agua y agua ozonizada (Figuras 24 y 25). Por otra parte, los valores determinados en este ensayo (entre 0,2 y 0,5 $\mu\text{g NH}_4 \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ al principio del cultivo y alrededor de 0,1 $\mu\text{g NH}_4 \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ al final de este) son inferiores a los descritos por otros autores que oscilaron entre 1,96 $\mu\text{g NH}_4 \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ en suelos cultivados con leguminosas (Paul y Clark, 2007) y 2704 $\mu\text{g NH}_4 \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ en pastos (Paz-Ferreiro et al., 2007). El bajo valor encontrado en nuestro ensayo puede estar relacionado con los bajos porcentajes de materia orgánica y nitrógeno total que se encontraron en los análisis químicos del suelo (Tablas 2 y 3).

Por otra parte, el efecto de los tratamientos sobre la actividad enzimática se observó principalmente al principio del cultivo (67 DDT) y al final de este (215 DDT). Al principio del cultivo, tanto en los ensayos con o sin agua ozonizada se observó una mayor actividad enzimática en los suelos del tratamiento T2, mientras que no se observaron diferencias entre el control y el T3 (Figuras 24 y 25). Al final del cultivo, en el ensayo con agua ozonizada, se observó un aumento de actividad ureasa en los suelos del tratamiento T3 (Figura 25) mientras que en los suelos regados con agua sin ozonizar no se observaron diferencias significativas (Figura 24). Este aumento de actividad puede ser debida al efecto del ozono sobre los ácidos fúlvicos y húmicos, ya que se ha descrito que el ozono favorece la degradación de estos compuestos, aumentando las fracciones de bajo peso molecular que pueden ser degradadas por los microorganismos con el consiguiente incremento del microbioma del suelo (Ohlenbusch et al., 1998).

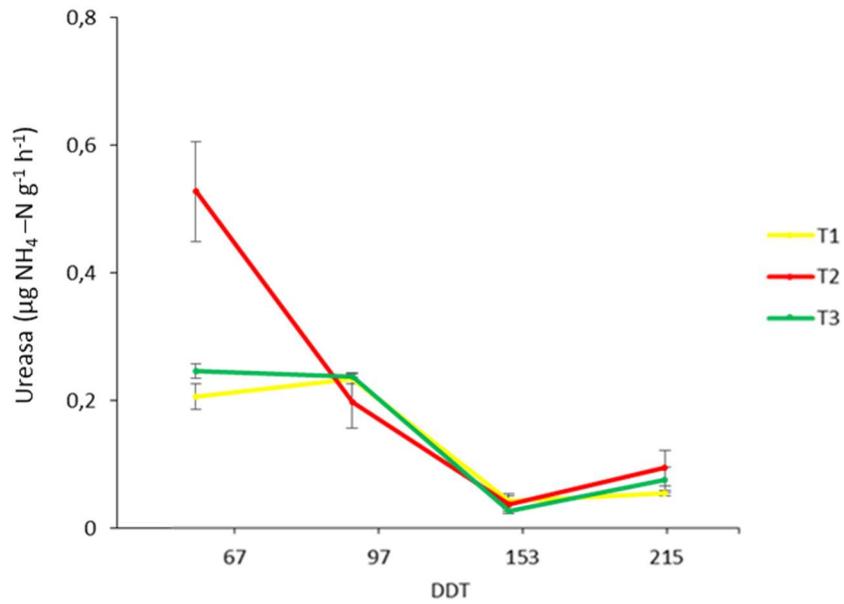


Figura 24. Efecto del tratamiento con HMA-BPCV (T2) y BPCV con ácidos húmicos y fúlvicos (T3), sobre la evolución de la actividad ureasa ($\mu\text{g NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), en suelos en los que se utilizaba agua sin ozono para el riego.

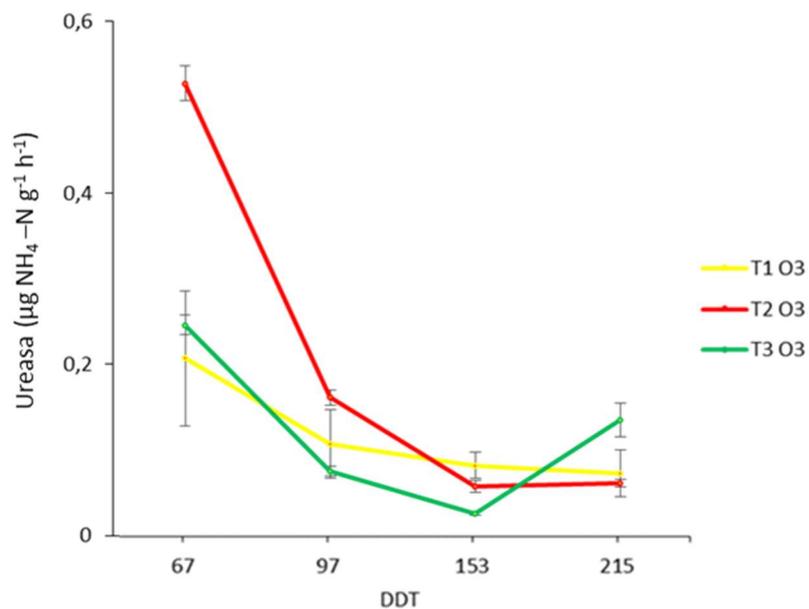


Figura 25. Efecto del tratamiento con HMA-BPCV (T2) y BPCV con ácidos húmicos y fúlvicos (T3), sobre la evolución de la actividad ureasa ($\mu\text{g NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), en suelos en los que se utilizaba agua ozonizada para el riego.

5 CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos podemos concluir que:

- Los tratamientos con bioestimulantes y agua ozonizada no afectaron a la actividad enzimática involucrada en el metabolismo del carbono en el suelo (actividad β -glucosidasa).
- Todos los tratamientos con bioestimulantes (con o sin riego con agua ozonizada) aumentaron la actividad de las enzimas relacionadas con el ciclo del fósforo (fosfatasa ácida y alcalina) respecto al control. Además, el tratamiento en el que se combinaba BPCV y ácidos húmicos y fúlvicos fue el que obtuvo el mayor valor de actividad fosfatasa ácida con agua ozonizada y de fosfatasa alcalina con agua sin ozonizar.
- La aplicación de bioestimulantes también favoreció la actividad enzimática indicadora de la respiración de microorganismos del suelo (deshidrogenasa). No se observaron diferencias significativas entre las diferentes estrategias bioestimulantes y de riego.
- El efecto beneficioso de los tratamientos bioestimulantes sobre la actividad ureasa se observó principalmente al principio del cultivo, en el tratamiento en el que se aplicó HMA-BPCV. Además, cuando en el riego se utilizaba agua ozonizada, la actividad del enzima aumentó al final del cultivo como consecuencia de la aplicación de BPCV y ácidos húmicos y fúlvicos.
- La actividad de los enzimas relacionados con la fertilidad del suelo fue un indicativo más sensible a las variaciones provocadas por los tratamientos, en comparación con los parámetros de composición del suelo.
- El aumento de las actividades enzimáticas, observado como consecuencia de la aplicación de los tratamientos bioestimulantes, no se tradujo en un incremento del rendimiento del cultivo.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Alef, K. y Nannipieri, P. (Eds.). (1995). Enzyme activities. En *Methods in applied soil microbiology and biochemistry* (pp. 311-373). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012513840-6/50022-7>
- Alguacil, M. del M., Torres, M. P., Montesinos-Navarro, A. y Roldán, A. (2016). Soil characteristics driving arbuscular mycorrhizal fungal communities in semiarid Mediterranean soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(11), 3348-3356. <https://doi.org/10.1128/AEM.03982-15>
- Alkorta, I., Aizpurua, A., Riga, P., Albizu, I., Amézaga, I. y Garbisu, C. (2003). Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. *Reviews on Environmental Health*, 18(1), 65-73. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2003.18.1.65>
- Ames, Z. R., Feliziani, E. y Smilanick, J. L. (2013). Germination of fungal conidia after exposure to low concentration ozone atmospheres. *Postharvest Biology and Technology*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201900109561>
- Aon, M. y Colaneri, A. (2001). Temporal and spatial variation of enzymatic activity and physico-chemical properties in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology*, 18, 255-270.
- Arshad, M. A. y Martin, S. (2002). Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 88(2), 153-160. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(01\)00252-3](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(01)00252-3)
- Bautista, A., Etchevers, J., Castillo, R. F. del y Gutiérrez, C. (2004). La calidad del suelo y sus indicadores. *Ecosistemas*, 13(2), 90-97.
- Billard, V., Etienne, P., Jannin, L., Garnica, M., Cruz, F., Garcia-Mina, J., Yvin, J. y Ourry, A. (2013). Two biostimulants derived from algae or humic acid induce similar responses in the mineral content and gene expression of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 33, 305-316. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9372-2>
- Bucio, C. M., Díaz, F. R., Martínez, O. A. y Torres, J. J. (2016). Efecto del ozono sobre la población microbiana del suelo y el crecimiento de plantas de fresa. *Terra Latinoamericana*, 34(2), 229-237.
- Calvo, P., Nelson, L. y Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, 383, 3-41. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
- Casida, L. E. J., Klein, D. A. y Santoro, T. (1964). Soil dehydrogenase activity. *Soil Science*, 98(6), 371-376.
- Conrad, R. (1996). Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiological Reviews*, 60(4), 609-640.
- Correal, E., Erena, M. y Robledo, A. (Eds.). (2007). *Tipificación, cartografía y evaluación de los recursos pastables de la Región de Murcia*. Comunidad Autónoma de la Región de Murcia.
- Cuadrado, S. y Lorenzo, L. F. (1980). *Estudio del suelo*. Excma. Diputación Provincial.
- Dalal, A., Bourstein, R., Haish, N., Shenhar, I., Wallach, R. y Moshelion, M. (2019). Dynamic physiological phenotyping of drought-stressed pepper plants treated with “productivity-enhancing” and “survivability-enhancing” biostimulants. *Frontiers in Plant Science*, 10(905). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00905>

- Díaz-López, M., Nicolás, E., López-Mondéjar, R., Galera, L., Garrido, I., Fenoll, J. y Bastida, F. (2021). Combined ozonation and solarization for the removal of pesticides from soil: Effects on soil microbial communities. *Science of The Total Environment*, 758. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143950>
- du Jardin, P. (2012). *The science of plant biostimulants – A bibliographic analysis*. European Commission. <https://orbi.uliege.be/handle/2268/169257>
- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Ebihara, K., Stryczewska, H., Mitsugi, F., Ikegami, T., Sakai, T., Pawlat, J. y Teii, S. (2012). Recent development of ozone treatment for agricultural soil sterilization and biomedical prevention. *Przeglad Elektrotechniczny (Electrical Review)*, 88(6).
- Ebihara, K., Mitsugi, F., Ikegami, T., Nakamura, N., Hashimoto, Y., Yamashita, Y., Baba, S., Stryczewska, H. D., Pawlat, J., Teii, S. y Sung, T.-L. (2013). Ozone-mist spray sterilization for pest control in agricultural management. *European Physical Journal Applied Physics*, 61(2). <https://doi.org/10.1051/epjap/2012120420>
- Eivazi, F. y Tabatabai, M. A. (1977). Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 9(3), 167-172. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(77\)90070-0](https://doi.org/10.1016/0038-0717(77)90070-0)
- Eivazi, F. y Tabatabai, M. A. (1988). Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 20(5), 601-606. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90141-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90141-1)
- Eivazi, F. y Tabatabai, M. A. (1990). Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 22(7), 891-897. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(90\)90126-K](https://doi.org/10.1016/0038-0717(90)90126-K)
- FAO. (2017). *Carbono orgánico del suelo: El potencial oculto*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura.
- Fujiwara, K., Kadoya, M., Hayashi, Y. y Kurata, K. (2006). Effects of ozonated water application on the population density of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* in soil columns. *Ozone: Science and Engineering*, 28(2), 125-127. <https://doi.org/10.1080/01919510600559435>
- Gianfreda, L. y Ruggiero, P. (2006). Enzyme activities in soil. En P. Nannipieri & K. Smalla (Eds.), *Nucleic acids and proteins in soil* (Vol. 8, pp. 257-311). Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-29449-X_12
- Gisbert, J., Ibáñez, S. y Moreno-Ramón, H. (2010). *La textura del suelo*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Guzel-Seydim, Z. B., Greene, A. K. y Seydim, A. C. (2004). Use of ozone in the food industry. *LWT - Food Science and Technology*, 37(4), 453-460. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.10.014>
- Henríquez, C., Uribe, L., Valenciano, A. y Nogales, R. (2014). Actividad enzimática del suelo - deshidrogenasa, β -glucosidasa, fosfatasa y ureasa- bajo diferentes cultivos. *Agronomía Costarricense*, 38(1), 43-54. <https://doi.org/10.15517/rac.v38i1.15118>
- Hernández, V. (2017). *Respuesta de tomate a condicionantes abióticos y mitigación de su efecto mediante estrategias agronómicas* [Tesis de Doctorado, Universidad Politécnica de Cartagena]. <https://repositorio.upct.es/handle/10317/5976>

- Igura, N., Fujii, M., Shimoda, M. y Hayakawa, I. (2004). Inactivation efficiency of ozonated water for fusarium oxysporum conidia under hydroponic greenhouse conditions. *Ozone: Science and Engineering*, 26(5), 517-521. <https://doi.org/10.1080/01919510490507937>
- Joner, E. J. y Jakobsen, I. (1995). Growth and extracellular phosphatase activity of arbuscular mycorrhizal hyphae as influenced by soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(9), 1153-1159. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00047-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00047-1)
- Kandeler, E. y Gerber, H. (1988). Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils*, 6, 68-72. <https://doi.org/10.1007/BF00257924>
- Karaca, A., Cetin, S. C., Turgay, O. C. y Kizilkaya, R. (2010). Soil enzymes as indication of soil quality. En G. Shukla & A. Varma (Eds.), *Soil Enzymology* (Vol. 22, pp. 119-148). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14225-3_7
- Karlen, D. L., Mausbach, M. J., Doran, J. W., Cline, R. G., Harris, R. F. y Schuman, G. E. (1997). Soil quality: A concept, definition, and framework for evaluation (A guest editorial). *Soil Science Society of America Journal*, 61, 4-10. <https://doi.org/10.2136/sssaj1997.03615995006100010001x>
- Kaur, S., Kaur, N., Siddique, K. y Nayyar, H. (2015). Beneficial elements for agricultural crops and their functional relevance in defence against stresses. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 62(7), 905-920. <https://doi.org/10.1080/03650340.2015.1101070>
- Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., Critchley, A., Craigie, J., Norrie, J. y Prithiviraj, B. (2009). Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28, 386-399. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9103-x>
- Ladd, J. N. y Butler, J. H. A. (1972). Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biology and Biochemistry*, 4(1), 19-30. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(72\)90038-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(72)90038-7)
- Langlais, B., Reckhow, D. A. y Brink, D. R. (1991). *Ozone in water treatment: Application and engineering*. Lewis Publishers.
- Le Mire, G., Nguyen, M. L., Fassotte, B., du Jardin, P., Verheggen, F., Delaplace, P. y Jijakli, M. H. (2016). Implementing plant biostimulants and biocontrol strategies in the agroecological management of cultivated ecosystems. A review. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 20(S1), 299-313. <https://doi.org/10.25518/1780-4507.12717>
- Mrabet, R., Najib, S., El-Brahli, A., Lahlou, S. y Bessam, F. (2001). Total, particulate organic matter and structural stability of a Calcixeroll soil under different wheat rotations and tillage systems in a semiarid area of Morocco. *Soil and Tillage Research*, 57(4), 225-235. [https://doi.org/10.1016/S0167-1987\(00\)00180-X](https://doi.org/10.1016/S0167-1987(00)00180-X)
- Murcianatural*. (2004a). <http://www.murcianatural.carm.es/web/guest/edafologia>
- Murcianatural*. (2004b). <http://www.murcianatural.carm.es/web/guest/clima>
- Naito, S. y Takahara, H. (2006). Ozone contribution in food industry in Japan. *Ozone: Science and Engineering*, 28(6), 425-429. <https://doi.org/10.1080/01919510600987347>
- Narváez, M., Sánchez, M. y Menjívar, J. C. (2010). Cambios en las propiedades químicas y en la actividad de las fosfatasa en suelos cultivados con maíz dulce (*Zea mays* L.) fertilizados con vinaza. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 5533-5541.

- Ochoa, V., Hinojosa, M. B., Gómez-Muñoz, B. y García-Ruiz, R. (2007). Actividades enzimáticas como indicadores de calidad del suelo en agroecosistemas ecológicos. *Revista de inicio a la investigación Universidad de Jaén*, 2.
- Ohlenbusch, G., Hesse, S. y Frimmel, F. H. (1998). Effects of ozone treatment on the soil organic matter on contaminated sites. *Chemosphere*, 37(8), 1557-1569. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00143-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00143-X)
- Ortiz, R. (2015). Síntesis de la evolución del conocimiento en Edafología. *Revista Eubacteria*, 34, 51-64.
- Paul, E.A y Clark, F.E (2007). *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press.
- Paz-Ferreiro, J., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M. C., Seoane, S. y Gil-Sotres, F. (2007). Biochemical properties of acid soils under native grassland in a temperate humid zone. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 50(4), 537-548. <https://doi.org/10.1080/00288230709510321>
- Peykanpour, E., Ghehsareh, A. M., Fallahzade, J. y Najarian, M. (2016). Interactive effects of salinity and ozonated water on yield components of cucumber. *Plant, Soil and Environment*, 62(8), 361-366. <https://doi.org/10.17221/170/2016-PSE>
- Pilon-Smits, E., Quinn, C., Tapken, W., Malagoli, M. y Schiavon, M. (2009). Physiological functions of beneficial elements. *Current opinion in plant biology*, 12(3), 267-274. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.04.009>
- Quintero, R., Ferrera-Cerrato, R., Etchevers, J. D., García, N. E., Rodríguez, R., Alcántar, G. y Aguilar, A. (2003). Enzimas que participan en el proceso de vermicompostaje. *Terra Latinoamericana*, 21(1), 73-80.
- Rangaswamy, V., Reddy, B. R. y Venkateswarlu, K. (1994). Activities of dehydrogenase and protease in soil as influenced by monocrotophos, quinalphos, cypermethrin and fenvalerate. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 47(4), 319-326. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(94\)90098-1](https://doi.org/10.1016/0167-8809(94)90098-1)
- Raub, L., Amrhein, C. y Matsumoto, M. (2001). The effects of ozonated irrigation water on soil physical and chemical properties. *Ozone: Science and Engineering*, 23(1), 65-76. <https://doi.org/10.1080/01919510108961989>
- Rivas-Martínez, S. y Rivas-Sáenz, S. (2009). *Sistema de Clasificación Bioclimática Mundial*. Centro de Investigaciones Fitosociológicas, España. <http://www.ucm.es/info/cif>
- Rodríguez, M. y Florez, V. (2004). Elementos esenciales y beneficiosos. En M. Guzmán & J. López-Galvez (Eds.), *Fertirriego: Tecnologías y Programación en Agroplasticultura* (pp. 25-36). CYTED. <http://repositorio.ual.es/handle/10835/3133>
- Schroth, G. y Sinclair, F. L. (2003). *Trees, crops, and soil fertility: Concepts and research methods*. CABI.
- Seybold, C. A., Mausbach, M. J., Karlen, D. L. y Rogers, H. H. (1997). Quantification of soil quality. En R. Lal, J. M. Kimble, R. F. Follet, & B. A. Steward (Eds.), *Soil processes and the carbon cycle* (pp. 387-404). CRC Press.
- Sinsabaugh, R. L., Reynolds, H. y Long, T. M. (2000). Rapid assay for amidohydrolase (urease) activity in environmental samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(14), 2095-2097. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00102-4](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00102-4)
- Sinsabaugh, R. L., Lauber, C. L., Weintraub, M. N., Ahmed, B., Allison, S. D., Crenshaw, C., Contosta, A. R., Cusack, D., Frey, S., Gallo, M. E., Gartner, T. B., Hobbie, S. E., Holland, K., Keeler, B. L., Powers, J.

- S., Stursova, M., Takacs-Vesbach, C., Waldrop, M. P., Wallenstein, M. D., ... Zeglin, L. H. (2008). Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology Letters*, 11(11), 1252-1264. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01245.x>
- Sinsabaugh, R. L., Reynolds, H. y Long, T. M. (2000). Rapid assay for amidohydrolase (urease) activity in environmental samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(14), 2095-2097. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00102-4](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00102-4)
- Subhani, A., Changyong, H., Zhengmiao, X., Min, L. y El-ghamry, A. M. (2001). Impact of soil environment and agronomic practices on microbial/dehydrogenase enzyme activity in soil. A Review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4(3), 333-338. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2001.333.338>
- Tabatabai, M. A. y Bremner, J. M. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1(4), 301-307. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(69)90012-1)
- Tabatabai, M. A. y Bremner, J. M. (1970a). Arylsulfatase activity of soils. *Soil Science Society of America Journal*, 34(2), 225-229. <https://doi.org/10.2136/sssaj1970.03615995003400020016x>
- Tabatabai, M. A. y Bremner, J. M. (1970b). Factors affecting soil arylsulfatase activity. *Soil Science Society of America Journal*, 34(3), 427-429. <https://doi.org/10.2136/sssaj1970.03615995003400030023x>
- Tabatabai, M. A. (1983). Soil enzymes. En A. L. Page (Ed.), *Methods of soil analysis* (pp. 903-947). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c43>
- Van Oosten, M. J., Pepe, O., De Pascale, S., Silletti, S. y Maggio, A. (2017). The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(5). <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>
- Wang, Y., Lin, Y., Li, J. y Lin, L. (2006). Effect of ozone and potassium sorbate in storage of Indian jujube fruit. *Food Science and Technology*, 7, 258-260.
- Whalen, J. K. y Warman, P. R. (1996). Arylsulfatase activity in soil and soil extracts using natural and artificial substrates. *Biology and Fertility of Soils*, 22(4), 373-378. <https://doi.org/10.1007/BF00334586>
- Wolinska, A. y Stepniewsk, Z. (2012). Dehydrogenase activity in the soil environment. En R. A. Canuto (Ed.), *Dehydrogenases* (pp. 183-210). InTech. <https://doi.org/10.5772/48294>
- Yakhin, O. I., Lubyaynov, A. A., Yakhin, I. A. y Brown, P. H. (2017). Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>
- Yoshioka, I., Sánchez de Prager, M. y Bolaños, M. (2006). Actividad de fosfatasa ácida y alcalina en suelo cultivado con plátano en tres sistemas de manejo. *Acta Agronómica*, 55.
- Zhang, N., He, X.-D., Gao, Y.-B., Li, Y.-H., Wang, H.-T., Ma, D., Zhang, R. y Yang, S. (2010). Pedogenic Carbonate and Soil Dehydrogenase Activity in Response to Soil Organic Matter in Artemisia ordosica Community. *Pedosphere*, 20(2), 229-235. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(10\)60010-0](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(10)60010-0)