



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 245 253**

② Número de solicitud: 200401472

⑤ Int. Cl.:
C05F 11/02 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **11.06.2004**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.2005**

Fecha de la concesión: **22.08.2006**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **16.09.2006**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.09.2006

⑰ Titular/es: **Universidad de Sevilla
Pabellón de Brasil
Paseo de las Delicias, s/n
41012 Sevilla, ES
Universidad de Córdoba**

⑱ Inventor/es: **Delgado García, Antonio;
Santiago Roldán, Ana de;
Campillo García, M^a del Carmen del;
Kasem Khalil Mustafa, Shawkat;
Andreu Cáceres, Luis;
Torrent Castellet, José y
Barrón Lope de Torre, Vidal**

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Método de corrección de la clorosis férrica en plantas.**

㉑ Resumen:

Método de corrección de la clorosis férrica en plantas.
La presente invención está referida a un método para la corrección de la deficiencia de hierro (clorosis férrica) en plantas mediante la aplicación al medio de crecimiento (suelo o sustrato de cultivo) de una mezcla de sales de hierro y sustancias húmicas (ácidos húmicos y fúlvicos).

ES 2 245 253 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método de corrección de la clorosis férrica en plantas.

5 **Objeto de la invención**

La presente invención está referida a un método para la corrección de la deficiencia de hierro (clorosis férrica) en plantas mediante la aplicación al medio de crecimiento (suelo o sustrato de cultivo) de una mezcla de sales de hierro y sustancias húmicas (ácidos húmicos y fúlvicos).

10 **Estado de la técnica**

La clorosis férrica es una deficiencia de hierro (Fe) en las plantas inducida por las propiedades del suelo cuando las plantas crecen en suelos con pH básico. Es un problema habitual en suelos calcáreos, que son frecuentes en áreas áridas y semiáridas del planeta, donde el pH básico y la elevada concentración de bicarbonatos en la disolución del suelo determina bajas concentraciones de hierro en la disolución y problemas de movimiento a través de membranas de este nutriente en especies vegetales sensibles. Con frecuencia la concentración de hierro en plantas cloróticas es superior a la de plantas sanas, indicando que el elemento ha sido absorbido por las raíces pero no es activo metabólicamente. La sintomatología típica es una clorosis internervial en las zonas más próximas a los ápices, y hay un claro efecto negativo sobre crecimiento y producción del cultivo.

La corrección de la clorosis férrica implica la aplicación al suelo o a la planta de una fuente de hierro. Tradicionalmente se han utilizado, para su aplicación al suelo, diversos productos de naturaleza inorgánica, como sales de hierro en forma ferrosa, piritas, y diversos óxidos de hierro. Las dosis requeridas eran elevadas por la reducida solubilidad de algunos, o bien, porque el hierro aplicado en el caso de compuestos solubles pasaba rápidamente a formas insolubles y, por tanto, poco asimilable por las plantas. Las fuentes más eficientes son los quelatos (en condiciones de suelos calcáreos el Fe-EDDHA) que se han hecho habituales en los últimos treinta años. Son productos eficaces pero muy caros, lo que puede condicionar la viabilidad económica de ciertos cultivos sensibles a tal deficiencia en suelos calcáreos. Otra limitación de los quelatos es su reducida persistencia y la susceptibilidad de ser lavados, lo que obliga a varios tratamientos a lo largo de un ciclo de cultivo.

La aplicación de sulfato ferroso ha sido tradicional para la corrección del problema, aunque con reducida eficiencia cuando la aplicación se realizaba al suelo. Resulta más eficiente la pulverización foliar de una disolución de dicha sal, aunque el efecto es poco persistente y obliga a continuos tratamientos. La razón de la baja eficiencia del sulfato ferroso aplicado al suelo es que, pese a ser una sal soluble, el hierro (II) se oxida a medida que las sales se disuelven, precipitando como hidróxidos de baja solubilidad. El efecto es evidente desde el momento de la aplicación, en que aparecen manchas pardas y anaranjadas en el suelo como consecuencia de la formación de este tipo de compuestos. Más eficaz ha resultado la utilización de vivianita (fosfato de hierro-II), que forma en el suelo, tras su disolución, óxidos de hierro de baja cristalinidad, que representan una reserva de Fe asimilable más eficiente que los óxidos de alta cristalinidad dominantes en suelos calcáreos del área mediterránea (Peña y Torrent, 1984).

Schwetmann y Fitzpatrick (1992) consideran que la preservación de óxidos de baja cristalinidad en el suelo (en especial ferrihidrita) es fundamental para mantener hierro disponible para microorganismos y plantas, por lo que aquellos factores que contribuyan a una baja cristalinidad en el óxido formado a partir del Fe^{2+} liberado por la vivianita contribuirán a que el hierro presente en dichos óxidos sea más biodisponible (utilizable por plantas y microorganismos). El fosfato presente en la vivianita favorece que se formen predominantemente óxidos de baja cristalinidad (Barrón *et al.*, 1997; Gálvez *et al.*, 1999). La presencia de ciertos iones y compuestos orgánicos (ácidos húmicos y fúlvicos) puede actuar como inhibidores de la cristalización, como Delgado *et al.* (2002a, 2002b) han comprobado para otros minerales que se forman en ambientes edáficos. Esto puede contribuir a una mayor eficiencia del hierro aplicado como vivianita en la corrección de la clorosis férrica. También puede incrementar la disponibilidad del hierro precipitado como óxidos la presencia de ácidos orgánicos de bajo peso molecular que formen complejos con el Fe favoreciendo la disolución (Gerke, 1993). En este sentido, Marshner *et al.*, (1989) observaron que la secreción de este tipo de compuestos por las raíces de ciertas plantas incrementaba la disponibilidad de Fe y Zn.

Se ha observado que las sustancias húmicas naturales incrementan la disponibilidad de hierro para las plantas (Wilkinson, 1972). Esto parece ser debido a dos procesos: (i) la complejación del Fe por las sustancias húmicas lo protege de la precipitación, manteniéndolo más disponible y contribuyendo a la disolución de óxidos de hierro de baja cristalinidad, y (ii) las sustancias húmicas favorecen la difusión del Fe hacia las raíces. La complejación de los cationes metálicos por los ácidos húmicos los puede hacer más disponibles para las plantas (Datta *et al.*, 2001; Greman *et al.*, 2001). Pandeya *et al.* (1998) comprobaron que cuando el hierro se suministraba complejo por ácidos fúlvicos, la planta asimilaba más nutriente que cuando se suministraba a partir de sales inorgánicas solubles. Pinton *et al.* (1999) comprobaron que la recuperación de plantas deficientes en hierro era más rápida cuando el hierro se aplicaba junto con sustancias húmicas que si se aplicaba sólo o con otros complejantes orgánicos como EDTA o citrato. Estas evidencias inducen a pensar que el suministro de hierro en forma de sales inorgánicas como la vivianita o el sulfato ferroso junto con ácidos húmicos y fúlvicos puede incrementar la eficiencia de dichas fuentes como correctores de la clorosis férrica.

ES 2 245 253 B1

El objetivo esencial de esta invención es la potenciación del efecto de las sales de hierro (II) (en particular vivianita y sulfato ferroso) como correctores de la clorosis férrica mediante la mezcla o aplicación conjunta de compuestos orgánicos, básicamente compuestos húmicos y fúlvicos. Aunque el método de corrección de clorosis férrica basado en la utilización de vivianita se encuentra patentado (N° publicación ES 2 035 766, N° solicitud 9100879), el efecto de su mezcla con compuestos orgánicos como los ácidos húmicos y fúlvicos debe incrementar significativamente su eficiencia corrigiendo la clorosis férrica por las razones comentadas anteriormente (inhibición de la cristalización de óxidos de Fe, complejación, mejora de la difusión hacia raíces del Fe), lo que aporta novedad importante como método de corrección de dicho problema.

10 Referencias

Barrón, V., Gálvez N., Hochela M.F. y Torrent J. 1997. Epitaxial overgrowth of goethite on hematite synthesized in phosphate media: a scanning force and transmission electron microscopy study. *American mineralogist* 82: 1091-1100.

Datta A., Sanyal S. K., y Saha S. 2001. A study on natural and synthetic humic acids and their complexing ability towards cadmium. *Plant and Soil* 235: 115-125.

Delgado A., Uceda I., Andreu L., Kassem S. y del Campillo M.C. 2002a. Fertilizer phosphorus recovery in gypsum amended calcareous marsh soils. *Arid Land Research and Management*. En prensa.

Delgado A., Madrid A., Kassem S., Andreu L. Y del Campillo M.C. 2002b. Phosphorus fertilizer recovery from calcareous soils amended with humic and fulvic acids. *Plant and Soil*, 245: 277-286.

Eynard, A., del Campillo, M.C., Barrón, V. y Torrent, J. (1992). Use of vivianite ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) to prevent iron chlorosis in calcareous soils. *Fertilizer Research*. 31:61-67.

Gálvez N., Barrón V. y Torrent J. 1999 Effect of phosphate on the crystallization of hematite, goethite, and lepidocrocite from ferrihydrite. *Clays & Clay Minerals* 47: 304-311.

Gerke J. 1993. Solubilization of Fe (III) from humic-Fe complexes, humic/Fe-oxide mixtures and from poorly ordered Fe-oxide by organic acids - consequences for P adsorption. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 156, 253-257.

Greman H., Velikonja S., Vodnik D., Kos B. y Lestan D. 2001. EDTA enhanced heavy metal phytoextraction: metal accumulation, leaching and toxicity. *Plant and Soil* 235: 105-114.

Lindsay W.L. y Norwell W.A. 1978. Development of DTPA test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42, 215-221.

Loeppert R.H. y Inskeep W.P. 1996. Iron. En: Sparks D.L. (Ed.) *Methods of soils analysis. Part 3, Chemical Methods*. Soil Science Society of America. Madison, WI Marschner H., Treeby M. y Roemheld V. 1989. Role of root induced changes in the rhizosphere for iron acquisition in higher plants. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 152, 197-204.

Rosado R., del Campillo M.C., Martínez M.A., Barrón V. y Torrent J. 2002. Long-term effectiveness of vivianite in reducing iron chlorosis in olive trees. *Plant and Soil* 241: 139-144.

Pandeya S.B., Singh A.K. y Dhar P. 1998. Influence of fulvic acid on transport of iron in soils and uptake by paddy seedlings. *Plant and Soil*, 198: 117-125.

Pinton R., Cesco S., Santi S., Agnolon F. Y Varanini Z. 1999. Water-extractable humic substances enhance iron deficiency responses by Fe-deficient cucumber plants. *Plant and Soil* 210: 145-157.

Schwertmann U. y Fitzpatrick R.W. 1992. iron minerals in surface environments. En Skinner H.C.W. y Fitzpatrick R.W. (eds) *Bio-mineralization. Processes of iron and manganese -modern and ancient environments-*. Catena supplement 21. Catena Verlag, Cremlingen-Desdedt, Alemania.

Descripción

El objeto de la presente invención es un método de corrección de la clorosis férrica en plantas que consiste en la aplicación al suelo de una mezcla de sales de hierro con ácidos húmicos y fúlvicos dializados.

Las sales de hierro (II) para preparar las mezclas con ácidos húmicos y fúlvicos, como el sulfato ferroso, son productos comerciales de bajo precio. Otras como la vivianita (fosfato ferroso, $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) se pueden sintetizar fácilmente y económicamente a partir de fosfato amónico (mono o biamónico) y sulfato ferroso.

En el caso de sales de hierro relativamente insolubles, como la vivianita, se preparará una suspensión de dichas sales que llevará también ácidos húmicos y fúlvicos dializados. Esta suspensión se mezclará con el medio de crecimiento o suelo si el cultivo se hace en maceta, o se aplicará a la zona de crecimiento preferente de raíces si se hace en suelo

ES 2 245 253 B1

natural. En el caso de sales solubles como el sulfato ferroso, se utilizará una disolución de sulfato ferroso y de ácidos húmicos y fúlvicos dializados. Esta disolución se mezclará con el suelo o se aplicará en el agua de riego.

La mezcla de ácidos húmicos y fúlvicos se preparará mediante diálisis del extracto alcalino de una fuente orgánica (como leonardita, turba, paja, estiércol, vinazas de azucarera, o residuos de industria agroalimentaria) utilizando una membrana de diálisis con tamaño de poro de 12000 a 15000 Daltons (tipo Visking tube o similar) hasta que la conductividad eléctrica de la suspensión dializada sea inferior a $300 \mu\text{S m}^{-1}$. Posteriormente se acidificará la suspensión dializada hasta que el pH fuese aproximadamente 9.

10 Ejemplos de realización de la invención

Se detalla a continuación los resultados de ensayos realizados con dos tipos de sales de Fe (sulfato ferroso y vivianita) mezcladas con ácidos húmicos y fúlvicos dializados.

15 1. Ejemplo de mezcla de vivianita con ácidos húmicos y fúlvicos

Se realizaron dos experimentos consecutivos en maceta con arena calcárea (99% de CaCO_3) en condiciones controladas. Los experimentos se realizaron de manera consecutiva sobre el mismo material para comprobar la persistencia del efecto. Se utilizó como especie sensible altramuz blanco (*Lupinus albus* L.). Se comparó la producción de materia seca y el contenido de clorofila entre testigo sin aplicación de Fe, quelato (Fe-EDDHA) en disolución nutritiva a niveles recomendados, y 1 g de vivianita por kg de suelo mezclada con tres niveles de ácidos húmicos y fúlvicos (0, 0.02 y 0.06 g de ácidos húmicos y fúlvicos por g de vivianita). La vivianita se aplicó y mezcló con el suelo en forma de suspensión que llevaba a su vez disuelta las sustancias húmicas. El experimento se realizó en macetas de 1.5 de volumen y utilizando 1.3 kg de arena calcárea como medio de crecimiento en cada una de ellas.

TABLA 1

Efecto de la aplicación de quelato (Fe-EDDHA) en disolución nutritiva y de vivianita mezclada con diferentes cantidades de ácidos húmicos aplicada al medio calcáreo de cultivo sobre la producción de materia seca de altramuz

Tratamiento	Materia seca producida en el primer experimento gramos/maceta	Materia seca producida en el segundo experimento gramos/maceta
Testigo sin Fe	0.82 ^a	0.61a
Fe-EDDHA (quelato)	1.35bc	1.1b
Vivianita 1 g por kg de suelo	0.97ab	0.65a
1 g vivianita + 0.02 g ácidos húmicos y fúlvicos por kg de suelo	1.04ab	0.94ab
1 g de vivianita + 0.06 g de ácidos húmicos y fúlvicos por kg de suelo	1.59c	1.04b

Valores seguidos por la misma letra no son significativamente distintos para $P < 0.05$ (test de Tukey)

Se puede comprobar que la aplicación de una mezcla de vivianita (1 gramo) y ácidos húmicos y fúlvicos (0.06 gramos) por kg de arena calcárea da lugar a producción de biomasa (Tabla 1) y contenidos de clorofila (Tabla 2) que no son significativamente inferiores de las plantas tratadas con Fe-EDDHA, que es el quelato habitualmente recomendado para la corrección de la clorosis férrica en suelos calcáreos. La producción de materia seca fue significativamente superior cuando la vivianita se aplicó junto con 0.06 gramos de la mezcla de ácidos húmicos y fúlvicos que cuando se aplicó sola (Tabla 1).

ES 2 245 253 B1

TABLA 2

Efecto de la aplicación de quelato (Fe-EDDHA) en disolución nutritiva y de vivianita mezclada con diferentes cantidades de ácidos húmicos aplicada al medio calcáreo de cultivo sobre el contenido en clorofila (medidas SPAD) del altramuz

5

Tratamiento	Clorofila en el primer experimento unidades SPAD	Clorofila en el segundo experimento unidades SPAD
Testigo sin Fe	32 ^a	14a
Fe-EDDHA (quelato)	59b	65c
Vivianita 1 g por kg de suelo	48ab	41abc
1 g vivianita + 0.02 g ácidos húmicos y fúlvicos por kg de suelo	45ab	31ab
1 g de vivianita + 0.06 g de ácidos húmicos y fúlvicos por kg de suelo	54b	53bc

10

15

20

Valores seguidos por la misma letra no son significativamente distintos para $P < 0.05$ (test de Tukey)

25

2. Ejemplo de mezcla de sulfato ferroso con ácidos húmicos y fúlvicos

30

35

Para ilustrar la eficiencia de la mezcla de sulfato ferroso y sustancias húmicas (ácidos húmicos y fúlvicos), se detalla a continuación los resultados de dos experimentos consecutivos realizados en maceta sobre una arena calcárea (99% de CaCO_3) en condiciones controladas. Los experimentos se realizaron de manera consecutiva sobre el mismo material para comprobar la persistencia del tratamiento. Se utilizó como especie sensible altramuz blanco (*Lupinus albus* L.). Se comparó el efecto de la aplicación de sulfato ferroso (1 gramo por kg de arena calcárea) y de la aplicación de la mezcla (dos partes en peso de sulfato ferroso y una parte de ácidos húmicos y fúlvicos, 1.5 gramos de mezcla por kg de arena calcárea) con dos testigos: uno sin aplicación de Fe y otro con aplicación del tratamiento habitual para la corrección del problema en suelos calcáreos (quelato Fe-EDDHA) aplicado en disolución nutritiva a niveles recomendados. El sulfato ferroso y la mezcla sulfato ferroso + ácidos húmicos y fúlvicos se aplicó al suelo en forma de disolución en agua. El experimento se realizó en macetas de 1.5 de volumen y utilizando 1.3 kg de arena calcárea como medio de crecimiento en cada una de ellas.

40

45

Las Tablas 3 y 4 muestran los resultados sobre producción de materia seca y contenido en clorofila en los dos experimentos. En la Tabla 3 se aprecia que la mezcla de sulfato ferroso y ácidos húmicos y fúlvicos da lugar a resultados en producción de materia seca que no son significativamente distintos a la aplicación de quelato de Fe. Las diferencias en producción de clorofila entre ambos tratamientos sólo fue significativamente distinta (mayor en el quelato) en el segundo cultivo en maceta (Tabla 4).

TABLA 3

Efecto de la aplicación de quelato (Fe-EDDHA), sulfato ferroso y de una mezcla de sulfato ferroso y ácidos húmicos y fúlvicos aplicado al medio calcáreo de cultivo sobre la producción de materia seca de altramuz

50

Tratamiento	Materia seca producida en el primer experimento gramos/maceta	Materia seca producida en el segundo experimento gramos/maceta
Testigo sin Fe	0.52a	0.41a
Fe-EDDHA (quelato)	0.89b	0.68b
Sulfato ferroso 1 g por kg de suelo	0.59a	0.50a
1.5 g de mezcla sulfato ferroso + ácidos húmicos y fúlvicos (proporción 2:1) por kg de suelo	0.99b	0.68b

55

60

65

Valores seguidos por la misma letra no son significativamente distintos para $P < 0.05$ (test de Tukey)

ES 2 245 253 B1

TABLA 4

Efecto de la aplicación de quelato (Fe-EDDHA), sulfato ferroso y de una mezcla de sulfato ferroso y ácidos húmicos y fúlvicos aplicada al medio calcáreo de cultivo sobre el contenido en clorofila (medidas SPAD) del altramuz

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tratamiento	Clorofila en el primer cultivo unidades SPAD	Clorofila en el segundo cultivo unidades SPAD
Testigo sin Fe	18a	28a
Fe-EDDHA (quelato)	35ab	59b
Sulfato ferroso 1 g por kg de suelo	51b	31a
1.5 g de mezcla sulfato ferroso + ácidos húmicos y fúlvicos (proporción 2:1) por kg de suelo	46ab	40a

Valores seguidos por la misma letra no son significativamente distintos para $P < 0.05$ (test de Tukey)

REIVINDICACIONES

5 1. Método de corrección de la clorosis férrica en plantas **caracterizado** por la aplicación de mezclas de sales de hierro y ácidos húmicos y fúlvicos dializados al medio de crecimiento (suelo o sustrato) mediante aplicación al suelo directa o mediante el agua de riego.

10 2. Método de corrección de la clorosis férrica en plantas según reivindicación anterior **caracterizado** porque consiste en la aplicación y mezclado con el suelo o sustrato de una mezcla de vivianita y ácidos húmicos y fúlvicos, siendo la dosis recomendada de 1 g de vivianita y 0.06 g de ácidos húmicos y fúlvicos por kg de suelo.

15 3. Método de corrección de la clorosis férrica en plantas según reivindicaciones anteriores **caracterizado** por comprender el mezclado del medio de crecimiento (suelo o sustrato) con una mezcla de sulfato ferroso, FeSO_4 y ácidos húmicos y fúlvicos.

20 4. Método de corrección de la clorosis férrica en plantas según reivindicación 3 **caracterizado** porque la proporción de la mezcla sería de dos partes en peso de sulfato ferroso y una parte de una mezcla de ácidos húmicos y fúlvicos dializados siendo las dosis recomendada de 1.5 g de la mezcla por kg de suelo y realizándose la aplicación por mezcla con el suelo o disuelta la mezcla en el agua de riego.

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 245 253

② Nº de solicitud: 200401472

③ Fecha de presentación de la solicitud: 11.06.2004

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C05F 11/02

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 6372008 B1 (MARVIN L. BOOTE; BRADLEY J. BOOTE) 16.04.2002, columna 2, línea 8 - columna 3, línea 40.	1,3,4
X	US 5411569 A (LAWRENCE N. HJERSTED) 02.05.1995, columna 4, línea 52 - columna 5, línea 2; columna 8, líneas 43-49; tabla 4.	1,3,4
X	ES 8708124 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 01.12.1987, página 3, líneas 1-8.	1,3
A	US 5698001 A (LLOYD B. KEENPORTZ) 16.12.1997, todo el documento.	1-4
A	ROSADO, R.; DEL CAMPILLO, M.C.; BARRÓN, V.; TORRENT, J. Inyección de vivianita al suelo para corregir la clorosis férica en olivo. Edafología. Volumen 7-2. Mayo 2000, páginas 57-66. [en línea], 10.08.2002 [recuperado el 01.06.2005]. Recuperado de Internet: <URL:http://edafologia.ugr.es/Revista/tomo7bis/art57t.htm>	1-4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

03.06.2005

Examinador

Mª J. de Concepción Sánchez

Página

1/1