

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 998 035**

51 Int. Cl.:

**C05D 9/02** (2006.01)

**C05F 11/00** (2006.01)

**C05F 11/08** (2006.01)

**C05F 11/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.10.2017 PCT/ES2017/070657**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2019 WO19073092**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2017 E 17928474 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2024 EP 3696154**

54 Título: **Fertilizante foliar y utilización del mismo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.02.2025**

73 Titular/es:  
**FERTINAGRO BIOTECH, S.L. (100.00%)  
Polígono Industrial La Paz, parcelas 185-188  
44195 Teruel, ES**

72 Inventor/es:  
**ATARES REAL, SERGIO;  
ROMERO LOPEZ, JOAQUIN;  
NARANJO OLIVERO, MIGUELANGEL;  
SALAET MADORRAN, IGNASI;  
FERRER GINES, MARÍA;  
YANCE CHAVEZ, TULA DEL CARMEN y  
ALIGUE ALEMANY, ROSA**

74 Agente/Representante:  
**GONZÁLEZ LÓPEZ-MENCHERO, Álvaro Luis**

ES 2 998 035 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Fertilizante foliar y utilización del mismo

5 La presente invención se refiere a un fertilizante foliar.

De manera más específica, la invención proporciona un fertilizante foliar para su aplicación a partes aéreas de plantas que incluye un extracto de microorganismos metilótrofos. El fertilizante foliar de la invención mejora la capacidad de fijación del nitrógeno de la planta.

10 Además, el fertilizante foliar de la invención se puede utilizar como fertilizante único o junto con cualquier otro fertilizante foliar químico u orgánico, evitando la necesidad de fertilizar en diferentes momentos, ya que la mezcla con otros fertilizantes foliares no afecta el efecto de mejora de la actividad fijadora de nitrógeno de la aplicación del fertilizante de la invención. De manera similar, el fertilizante de la invención no pierde su actividad potenciadora de fijación del nitrógeno cuando se aplica junto con otros productos agrícolas, tales como otros fertilizantes, plaguicidas o fungicidas.

20 El crecimiento de todas las plantas está determinado directa o indirectamente por la disponibilidad de nutrientes minerales, en especial del nitrógeno. Una vez cubiertas las necesidades de agua, el factor limitante más importante es el nitrógeno. Una planta con deficiencia de nitrógeno sufriría clorosis, presentando un color amarillento en tallos y hojas, subdesarrollo y debilidad. Por el contrario, cuando la planta tiene suficiente nitrógeno, sus hojas y tallos crecen rápidamente. En agricultura, el nitrógeno es el principal nutriente para el crecimiento de las plantas y, por tanto, en suelos carentes de nitrógeno el rendimiento de los cultivos es bajo.

25 Asimismo, el nitrógeno es un elemento esencial para el crecimiento de todos los microorganismos, estando presente en la atmósfera en forma de  $N_2$  en una proporción de aproximadamente un 80 %. Sin embargo, debido a la naturaleza del enlace entre los dos átomos de nitrógeno, su reactividad es prácticamente nula, lo que significa que no es asimilable por la mayoría de los organismos vivos.

30 Existe un grupo de microorganismos que son capaces de aprovechar este nitrógeno a través de un proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno que, en líneas generales, consiste en convertir el nitrógeno atmosférico en formas metabolizables que puedan ser asimiladas por los seres vivos, en particular formas de amonio, nitritos y nitratos.

35 Las necesidades globales de nitrógeno en la agricultura ascienden a 150-200 millones de toneladas por año ("Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems", Centro Australiano de Investigación Agrícola Internacional, 2008, Unkovich, *et al.*). De estos, actualmente se aplican 120 millones de toneladas al año como fertilizante en la agricultura; el resto, 50-70 millones de toneladas/año, provienen de la fijación del nitrógeno por microorganismos asociados a las plantas ("Global nitrogen and phosphorus fertiliser use for agriculture production in the past half century: shifted hot spots and nutrient imbalance", Earth system Science Data, 2017, Chaoqun Lu, *et al.*).  
40 Hasta hace poco, se creía que estos microorganismos se concentraban principalmente en las raíces de las plantas, donde interactúan de diferentes maneras:

- a. Simbiosis estricta: por ejemplo, las bacterias del género *Rhizobium* forman nódulos en las raíces de las plantas leguminosas.
- 45 b. Endófitos que no forman nódulos: que penetran en las raíces de la planta y viven en los espacios intercelulares de la misma, que es donde llevan a cabo su relación simbiótica con la planta mediante la fijación del nitrógeno. Las bacterias del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Novosphingobium* y *Ochrobactrum*, entre otras, pertenecen a este grupo.
- 50 c. Epífitos: Estas bacterias colonizan la superficie de las raíces, que es donde llevan a cabo la fijación del nitrógeno. Las bacterias del género *Azotobacter* y *Azospirillum* pertenecen a este grupo.

J. Prella *et al.* ("Legumes regulate *Rhizobium* bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids", J. Prella, J. P. Whiteb, A. Bourdesa, S. Bunnewella, R. J. Bongaertsc y P. S. Poolea, editado por Sharon R. Long, Universidad de Stanford, Stanford, CA, 2009) informan que, una vez dentro de la planta, las bacterias endófitas se vuelven auxótrofas para los aminoácidos ramificados leucina, isoleucina y valina. Se cree que esta es la forma que tiene la planta de controlar su relación con dichos microorganismos. E. M. Lodwig *et al.* también informan que para que estos microorganismos fijen el nitrógeno, es muy importante que la planta les proporcione cantidades razonables de los dos aminoácidos directamente implicados en el ciclo de fijación del amonio, que son el ácido glutámico y la asparagina ("Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in legume-*Rhizobium* symbiosis", E. M. Lodwig, *et al.*, Nature, 2003).

También es bien conocida la necesidad de diferentes microelementos y cómo influyen en la capacidad de estos microorganismos simbióticos para fijar nitrógeno. Por ejemplo, se sabe que el molibdeno y el hierro forman parte de la nitrogenasa, una enzima que cataliza la reducción del  $N_2$ . También se sabe que el boro es necesario para la nodulación de *Rhizobium* y que el zinc y el manganeso forman parte de la superóxido dismutasa, una enzima que protege contra el estrés oxidativo. Asimismo, el cobre es parte de un citocromo c especial necesario para respirar en

las condiciones de bajo oxígeno en las que tiene lugar la fijación del nitrógeno. Finalmente, se sabe que el níquel es un cofactor de la hidrogenasa, una enzima que procesa el hidrógeno generado en la fijación del nitrógeno, y el cobalto es parte de la cobalamina, un cofactor esencial para algunas enzimas implicadas indirectamente en la fijación del nitrógeno.

5 Ahora se sabe que estos microorganismos metilótrofos no sólo habitan en la parte radicular de las plantas, sino que son capaces de moverse a través de la planta y colonizar los tallos y las hojas y llevar a cabo allí funciones de fijación del nitrógeno ("Ascending Migration of Endophytic Rhizobia, from Roots to Leaves, in Rice Plants and Assessment of Benefits to Rice Growth Physiology", Applied and Environmental Microbiology, noviembre de 2005, Feng Chi, *et al.*).

10 Algunos estudios confirman que la fijación del nitrógeno realizada en las partes aéreas de la planta puede representar hasta el 60 % de la fijación total, siendo por lo tanto el principal sitio de fijación ("Activation of Nitrogen-Fixing Endophytes Is Associated with the Tuber Growth of Sweet Potato", Koyo Yonebayashi, *et al.*, Mass Spectrom (Tokyo). 2014; 3(1): A0032).

15 Asimismo, Frank Keppler *et al.* ("Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions", Frank Keppler *et al.*), Nature 439, 187-191, 2006) informan que las plantas emiten cantidades no despreciables de metano y metanol a la atmósfera a través de sus hojas y también se conoce desde la década de 1980 la existencia de bacterias residentes en las hojas capaces de degradar estos compuestos (Methanol-utilizing bacteria associated with green plants, Dev. Ind. Microbiol. 1982; 23: 483-493. Corpe W. A., Basile D.V.9).

También se puede observar que, en determinadas condiciones, el consumo de metanol o metano está asociado con una mayor fijación de nitrógeno ("Methanotrophy induces nitrogen fixation during peatland development", Tuula Larmolaa, *et al.*, editado por Sarah Hobbie, Universidad de Minnesota, Saint Paul, MN, 2013), También se han descrito microorganismos específicos, tales como el género *Methylobacterium*, habitantes de la filósfera y consumidores de metano y metanol que fijan directamente el nitrógeno atmosférico ("Leaf-residing Methylobacterium species fix nitrogen and promote biomass and seed production in Jatropha curcas", Munusamy Madhaiyan *et al.*, Biotechnology for Biofuels, 2015 8: 222).

30 El efecto de la aplicación foliar de microorganismos metilótrofos también es bien conocido y existe abundante bibliografía que describe el aumento de la producción en diferentes cultivos logrado mediante la aplicación de diferentes dosis de microorganismos metilótrofos en hojas o semillas. En este sentido, véanse, por ejemplo, los documentos de patente US 6174837 B1, US 5512069, EP 1173543 A o las solicitudes de patente internacionales WO 2001034777 A1, WO 2013141815 A1 y WO9943632 A1.

35 La principal desventaja del uso de microorganismos vivos como fertilizante es la dificultad de la aplicación junto con otros fertilizantes debido a la sensibilidad de los microorganismos a los diferentes productos químicos utilizados como fertilizantes, así como con fungicidas o plaguicidas. Por tanto, los agricultores se ven obligados a preparar un fertilizante independiente adicional para poder aplicar los microorganismos fertilizantes de forma que no se vean afectados por los demás componentes del fertilizante o plaguicida.

45 El objetivo de la presente invención es abordar este inconveniente de los fertilizantes que incluyen microorganismos vivos proporcionando un fertilizante foliar que incluye un extracto de microorganismos metilótrofos, en donde los microorganismos metilótrofos vivos se someten previamente a un proceso de fermentación con metanol como única fuente de carbono o energía y después se someten a un proceso que incluye las etapas de homogeneización celular mediante métodos físicos, químicos o enzimáticos, separación de las partes solubles de las insolubles mediante filtración tangencial o centrifugación y, opcionalmente, concentración mediante filtración o atomización.

50 En la presente invención, por "extracto de microorganismos metilótrofos" se entenderá el permeado obtenido tras el proceso de fermentación y posterior homogeneización celular, separación y concentración como se mencionó anteriormente. De manera similar, se entenderá por "fermentación" cualquier tipo de multiplicación del microorganismo en condiciones controladas para obtener un aumento de la biomasa del propio microorganismo.

55 En el contexto de la invención, el término "fertilizante foliar" se refiere a cualquier composición orgánica o inorgánica, natural o sintética, que proporciona a las plantas uno o más de los elementos nutricionales esenciales para su normal desarrollo, generalmente macroelementos primarios (N, P, K), macroelementos secundarios (Ca, Mg, S) y microelementos (B, Cl, Co, Cu, Fe, Mn, Mo y Zn). Por tanto, el término "fertilizante" comprende, en particular, los fertilizantes minerales simples (que contienen sólo uno de los siguientes macroelementos: nitrógeno, fósforo o potasio) y fertilizantes minerales complejos (que contienen más de uno de los siguientes macroelementos: nitrógeno, fósforo o potasio), fertilizantes orgánicos, organominerales, etc., tales como fertilizantes de P, fertilizantes de K, fertilizantes de N, fertilizantes de NP, fertilizantes de PK, fertilizantes de NK o fertilizantes de NPK, y cuya aplicación es foliar, es decir, en la parte aérea de las plantas, ya sea en solución si es un fertilizante sólido, o directamente o diluido si es un fertilizante líquido.

65 Este extracto de microorganismos metilótrofos es capaz de aumentar la actividad nitrogenasa de los microorganismos residentes en las hojas evitando al mismo tiempo que su aplicación se vea afectada por la aplicación conjunta con

otros fertilizantes, fungicidas o plaguicidas o combinaciones de los mismos.

Por tanto, el objeto de la invención es un fertilizante foliar que incluye un extracto de microorganismos metilótrofos obtenido a partir de un primer proceso inicial de fermentación de microorganismos metilótrofos vivos con metanol como  
 5 única fuente de carbono o energía y un segundo proceso que incluye las etapas de homogeneización celular mediante métodos físicos, químicos o enzimáticos, separación de las partes solubles de las insolubles mediante filtración tangencial o centrifugación y, opcionalmente, concentración mediante filtración o atomización.

Por microorganismos metilótrofos en la presente invención se entienden bacterias o levaduras metilótrofas, bacterias,  
 10 tales como *Methylobacterium*, *Methylobacillus*, *Methylophilus*, *Methylovorus*, *Methylomonas*, *Sphingomonas*, *Curtobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* o levaduras, tales como *Pichia pastoris*.

En una realización preferida, los microorganismos metilótrofos se seleccionan entre *Methylobacterium* y *Bacillus*, en particular entre *Methylobacterium radiotolerans* y *Bacillus methylotrophicus*.

En cuanto al proceso inicial de fermentación de microorganismos metilótrofos con metanol como única fuente de carbono o energía, las condiciones de fermentación dependen esencialmente de cada organismo seleccionado, aunque, en términos generales, se podría aplicar lo siguiente, por ejemplo, para *Methylobacterium*: Medio de cultivo Choi (Choi J., Kim J., Daniel M. y Lebeault J. (1989) "Optimization of growth medium and poly-β-hydroxybutyric acid  
 20 production from methanol in *Methylobacterium organophilum*", Kor J Appl Microbiol Bioeng 17: 392-396) con una concentración de metanol del 1 %, que se mantiene constante mediante un sistema de sonda-bomba; pH 6,75, temperatura de 30 °C, 80 horas; agitación a 800 rpm en una corriente de aire continua. Para este microorganismo específico y estas condiciones, se obtienen entre 80 y 115 g de biomasa por litro de caldo de fermentación.

En cuanto al método de homogeneización celular por mediante métodos físicos, químicos o enzimáticos, se prefiere el uso de métodos químicos, en particular la extracción química mediante detergentes no iónicos, tales como IGEPAL® o TWEEN 20®, aplicados al 0,1 %, seguido de aplicación de ultrasonidos a 4 kW a un caudal entre 100 y 800 l/h.

La separación de las partes solubles de las insolubles se realiza mediante centrifugación o filtración tangencial,  
 30 preferentemente mediante filtración tangencial con filtros cerámicos con un tamaño de poro entre 400 y 750 nm.

El extracto de microorganismos metilótrofos así obtenido es rico en antioxidantes esenciales para el aprovechamiento del metanol, tal como ergotioneína, glutatión y micotioles, así como en cofactores enzimáticos específicos esenciales para el procesamiento enzimático del metanol, tales como las pirroloquinolina quinonas (PQQ) y las tetrahidrometanopterinas (H4MPT).

También es objeto de la invención el uso del fertilizante foliar descrito, que incluye un extracto de microorganismos metilótrofos obtenido a partir de un primer proceso inicial de fermentación de microorganismos metilótrofos con metanol como única fuente de carbono o energía y un segundo proceso que incluye las etapas de homogeneización celular mediante métodos físicos, químicos o enzimáticos, separación de las partes solubles de las insolubles mediante filtración tangencial o centrifugación y, opcionalmente, concentración mediante filtración o atomización, en las partes aéreas de una planta, solo o junto con otros fertilizantes, plaguicidas o fungicidas.

En una realización, el fertilizante de la invención se utiliza junto con cipermetrina al 25 % como plaguicida a una dosis de 100 cm<sup>3</sup>/ha y/o con tebuconazol al 43 % como fungicida a una dosis de 400 cm<sup>3</sup>/ha.

Si bien la cantidad del fertilizante foliar de la invención a aplicar depende esencialmente del tipo de cultivo o planta a la que se aplica, se aplica preferentemente de forma que tenga un contenido de extracto de microorganismos como el descrito anteriormente de 500 a 1.000 gramos por hectárea.

En una realización, la aplicación del fertilizante de la invención se realiza junto con otro fertilizante que incluye aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en isoleucina, leucina, valina, ácido glutámico o asparagina, con el objetivo de favorecer a los metilótrofos residentes en las hojas de las plantas y aportar aminoácidos que intervienen directamente en el ciclo del nitrógeno.

En otra realización, la aplicación del fertilizante de la invención se realiza junto con otro fertilizante que incluye microelementos seleccionados del grupo que consiste en boro, níquel, cinc, manganeso, molibdeno, cobalto, hierro y cobre, lo que mejora la capacidad de fijación del nitrógeno de los microorganismos metilótrofos residentes en la planta.

En otra realización, la aplicación del fertilizante de la invención se realiza junto con un antioxidante seleccionado del grupo que consiste en ácido ascórbico o ácido cafeico. La aplicación del fertilizante de la invención junto con antioxidantes favorece el proceso de fijación del nitrógeno, que es muy sensible al oxígeno y protege a los microorganismos residentes en las hojas, puesto que, al estar expuestos directamente a la luz solar, pueden estar sometidos a estrés oxidativo. En una realización preferida, la proporción de antioxidante a utilizar con respecto al fertilizante es inferior al 2 % en peso.

De manera similar, en otra realización, la aplicación del fertilizante de la invención se realiza junto con un agente humectante con el fin de mejorar la humectabilidad, facilitar la penetración del fertilizante de la invención en los tejidos vegetales tratados y proporcionar una mayor resistencia al arrastre por el agua de lluvia. Preferentemente, la proporción de humectante a utilizar con respecto al fertilizante varía entre el 0,5 % y el 20 % en peso. En una realización preferida, la glicerina se utiliza como agente humectante.

### Ejemplos

La invención se explica a continuación en función de ejemplos de realización ilustrativos y no limitantes.

#### Ejemplo 1:

Se obtienen diferentes productos fertilizantes que incluyen *Methylobacterium radiotolerans*, como se muestra a continuación en la tabla 1 (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j). Se utiliza agua como control. Estos productos se aplican mediante aplicación foliar a un cultivo de trigo. Después de 7 días, se recoge masa foliar de cada uno de los cultivos y se mide la actividad nitrogenasa mediante ensayos de reducción de acetileno.

Se ha demostrado que la enzima nitrogenasa no es muy específica, es decir, no sólo es capaz de reducir  $N_2$  a  $NH_4$ , sino que también reduce de forma no específica otros compuestos químicos, tales como el  $2H^+$  a  $H_2$ ;  $N_2O$  a  $N_2$ ;  $H_2O$  y  $CN^-$  a  $CH_4$  y  $NH_3$ , y, finalmente, también es capaz de reducir  $C_2H_2$  a  $C_2H_4$  (Burris, 1991).

Para los ensayos de reducción de acetileno, las hojas de las plantas se recogen al final del día para que estén llenas de fotosintatos y se cuantifica la velocidad a la que x gramos de hoja son capaces de reducir  $C_2H_2$  a  $C_2H_4$  en  $\mu\text{mol/hora}$  como una medida indirecta de la actividad de la enzima nitrogenasa. Finalmente, se mide la velocidad de reacción en gramos de hoja en materia seca. El ensayo debe realizarse dentro de los 60 minutos posteriores a la recogida para evitar subestimaciones de la actividad.

a) Tratamiento de control (agua).

b) *Methylobacterium radiotolerans* (vivo) aplicado a  $1 \cdot 10^{15}$  UFC/ha mediante aplicación foliar.

c) Extracto de *Methylobacterium radiotolerans* producido en un medio de cultivo con glucosa como fuente de carbono y aplicado a 500 g/ha mediante aplicación foliar.

d) Extracto de *Methylobacterium radiotolerans* producido en un medio de cultivo con metanol como fuente de carbono y aplicado a 500 g/ha mediante aplicación foliar.

e) *Methylobacterium radiotolerans* aplicado a  $1 \cdot 10^{15}$  UFC/ha + fungicida (tebuconazol al 43 %) a una dosis de 400  $\text{cm}^3/\text{ha}$  mediante aplicación foliar.

f) Extracto de *Methylobacterium radiotolerans* producido en un medio de cultivo con glucosa como fuente de carbono y aplicado a 500 g/ha + fungicida (tebuconazol al 43 %) a una dosis de 400  $\text{cm}^3/\text{ha}$  mediante aplicación foliar.

g) Extracto de *Methylobacterium radiotolerans* producido en un medio de cultivo con metanol como fuente de carbono y aplicado a 500 g/ha + fungicida (tebuconazol al 43 %) a una dosis de 400  $\text{cm}^3/\text{ha}$  mediante aplicación foliar.

h) *Methylobacterium radiotolerans* (vivo) aplicado a  $1 \cdot 10^{15}$  UFC/ha + plaguicida (cipermetrina al 25 %) a una dosis de 100  $\text{cm}^3/\text{ha}$  mediante aplicación foliar.

i) Extracto de *Methylobacterium radiotolerans* producido en un medio de cultivo con glucosa como fuente de carbono y aplicado a 500 g/ha + plaguicida (cipermetrina al 25 %) a una dosis de 100  $\text{cm}^3/\text{ha}$  mediante aplicación foliar.

j) Extracto de *Methylobacterium radiotolerans* producido en un medio de cultivo con metanol como fuente de carbono y aplicado a 500 g/ha + plaguicida (cipermetrina al 25 %) a una dosis de 100  $\text{cm}^3/\text{ha}$  mediante aplicación foliar.

Tabla 1

Actividad de la nitrogenasa	( $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{g MS seco} \cdot \text{h}$ )		
Control negativo	a		
	$35 \pm 7$		
Tratamiento con <i>Methylobacterium radiotolerans</i>	b	c	d
	$97 \pm 12$	$51 \pm 6$	$82 \pm 14$
Tratamiento con <i>Methylobacterium radiotolerans</i> + tebuconazol	e	f	g
	$31 \pm 9$	$47 \pm 6$	$86 \pm 8$
Actividad de la nitrogenasa	( $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{g MS seco} \cdot \text{h}$ )		
Tratamiento con <i>Methylobacterium radiotolerans</i> + cipermetrina	h	i	j
	$64 \pm 9$	$53 \pm 3$	$92 \pm 12$

Como puede observarse en la tabla anterior, es evidente que al mezclar *Methylobacterium radiotolerans* vivo con los diferentes compuestos fungicidas y plaguicidas se elimina el efecto positivo de su aplicación. Sin embargo, este efecto no ocurre con la aplicación del extracto de *Methylobacterium radiotolerans*. Los resultados obtenidos también muestran

que la aplicación de un extracto de *Methylobacterium radiotolerans* producido con una fuente de carbono distinta al metanol no tiene el mismo efecto que el extracto de un cultivo del mismo microorganismo producido con metanol como fuente de carbono.

5 **Ejemplo 2:**

Se obtienen diferentes productos fertilizantes que incluyen *Bacillus methylotrophicus*, como se muestra a continuación en la tabla 2 (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j). Se utiliza agua como control. Estos productos se aplican mediante aplicación foliar a un cultivo de trigo. Después de 7 días, se recoge masa foliar de cada uno de los cultivos y se mide la actividad nitrogenasa mediante ensayos de reducción de acetileno.

- a) Tratamiento de control (agua).
- b) *Bacillus methylotrophicus* (vivo) aplicado a  $1 \cdot 10^{15}$  UFC/ha mediante aplicación foliar.
- 15 c) Extracto de *Bacillus methylotrophicus* producido en un medio de cultivo con glucosa como fuente de carbono y aplicado a 500 g/ha mediante aplicación foliar.
- d) Extracto de *Bacillus methylotrophicus* producido en un medio de cultivo con metanol como fuente de carbono y aplicado a 500 g/ha mediante aplicación foliar.
- e) *Bacillus methylotrophicus* (vivo) aplicado a  $1 \cdot 10^{15}$  UFC/ha + urea (fertilizante) a una dosis de 31 kg/ha mediante aplicación foliar.
- 20 f) Extracto de *Bacillus methylotrophicus* producido en un medio de cultivo con glucosa como fuente de carbono y aplicado a 500 g/ha + urea (fertilizante) a una dosis de 31 kg/ha mediante aplicación foliar.
- g) Extracto de *Bacillus methylotrophicus* producido en un medio de cultivo con metanol como fuente de carbono y aplicado a 500 g/ha + urea (fertilizante) a una dosis de 31 kg/ha mediante aplicación foliar.
- 25 h) *Bacillus methylotrophicus* (vivo) aplicado a  $1 \cdot 10^{15}$  UFC/ha + hierro quelado por (orto-orto)-EDDHA (fertilizante) al 3,5 % a una dosis de 165 gramos/cm y diluyendo el producto en agua al 0,1 %.
- i) Extracto de *Bacillus methylotrophicus* producido en un medio de cultivo con glucosa como fuente de carbono y aplicado a 500 g/ha + hierro quelado por (orto-orto)-EDDHA (fertilizante) al 3,5 % a una dosis de 165 gramos/cm y diluyendo el producto en agua al 0,1 %.
- 30 j) Extracto de *Bacillus methylotrophicus* producido en un medio de cultivo con metanol como fuente de carbono y aplicado a 500 g/ha + hierro quelado por (orto-orto)-EDDHA (fertilizante) al 3,5 % a una dosis de 165 gramos/cm y diluyendo el producto en agua al 0,1 %.

Tabla 2

Actividad de la nitrogenasa	(μmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /g MS seco·h)		
Control negativo	a		
	83 ± 14		
Tratamiento con <i>Bacillus methylotrophicus</i>	b	c	d
	214 ± 27	118 ± 11	182 ± 12
Tratamiento con <i>Bacillus methylotrophicus</i> + urea (fertilizante)	e	f	g
	147 ± 21	101 ± 15	172 ± 8
Tratamiento con <i>Bacillus methylotrophicus</i> + Fe-EDDHA (fertilizante)	h	i	j
	164 ± 4	105 ± 7	178 ± 25

35 Como puede observarse en la tabla anterior, es evidente que la mezcla de *Bacillus methylotrophicus* vivo con los diferentes fertilizantes reduce significativamente el efecto positivo de su aplicación. Sin embargo, este efecto no se produce con la aplicación del extracto de *Bacillus methylotrophicus*. Los resultados obtenidos también muestran que la aplicación de un extracto de *Bacillus methylotrophicus* producido utilizando una fuente de carbono distinta al metanol no tiene el mismo efecto que un extracto de un cultivo de *Bacillus methylotrophicus* producido con metanol como fuente de carbono.

40 **Ejemplo 3:**

Se producen diferentes productos fertilizantes que incluyen *Bacillus methylotrophicus*, como se muestra a continuación en la tabla 3 (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j). Se utiliza agua como control. Estos productos se aplican mediante aplicación foliar al cultivo de tomate. Después de 7 días, se recoge masa foliar de cada uno de los cultivos y se mide la actividad nitrogenasa mediante ensayos de reducción de acetileno.

- a) Tratamiento de control (agua).
- 50 b) *Bacillus methylotrophicus* aplicado a  $1 \cdot 10^{15}$  UFC/ha mediante aplicación foliar.
- c) Extracto de *Bacillus methylotrophicus* producido en un medio de cultivo con glucosa como fuente de carbono y aplicado a 500 g/ha mediante aplicación foliar.
- d) Extracto de *Bacillus methylotrophicus* producido en un medio de cultivo con metanol como fuente de carbono y aplicado a 500 g/ha mediante aplicación foliar.
- 55 e) *Bacillus methylotrophicus* (vivo) aplicado a  $1 \cdot 10^{15}$  UFC/ha + ácido bórico (micronutriente) al 0,2 % a una dosis de 1.000 l/ha mediante aplicación foliar.

- f) Extracto de *Bacillus methylotrophicus* producido en un medio de cultivo con glucosa como fuente de carbono y aplicado a 500 g/ha + ácido bórico (micronutriente) al 0,2 % a una dosis de 1.000 l/ha mediante aplicación foliar.
- g) Extracto de *Bacillus methylotrophicus* producido en un medio de cultivo con metanol como fuente de carbono y aplicado a 500 g/ha + ácido bórico (micronutriente) al 0,2 % a una dosis de 1.000 l/ha mediante aplicación foliar.
- 5 h) *Bacillus methylotrophicus* (vivo) aplicado a  $1 \cdot 10^{15}$  UFC/ha + sulfato de manganeso (micronutriente) al 0,6 % a una dosis de 100 l/ha mediante aplicación foliar.
- i) Extracto de *Bacillus methylotrophicus* producido en un medio de cultivo con glucosa como fuente de carbono y aplicado a 500 g/ha + sulfato de manganeso (micronutriente) al 0,6 % a una dosis de 100 l/ha mediante aplicación foliar.
- 10 g) Extracto de *Bacillus methylotrophicus* producido en un medio de cultivo con metanol como fuente de carbono y aplicado a 500 g/ha + sulfato de manganeso (micronutriente) al 0,6 % a una dosis de 100 l/ha mediante aplicación foliar.

Tabla 3

Actividad de la nitrogenasa	( $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{g MS seco} \cdot \text{h}$ )		
Control negativo	a		
	71 ± 7		
Tratamiento con <i>Bacillus methylotrophicus</i>	b	c	d
	185 ± 27	97 ± 9	195 ± 14
Tratamiento con <i>Bacillus methylotrophicus</i> + ácido bórico (micronutriente)	e	f	g
	83 ± 11	91 ± 17	158 ± 8
Tratamiento con <i>Bacillus methylotrophicus</i> + sulfato de manganeso (micronutriente)	h	i	j
	145 ± 19	93 ± 12	184 ± 9

- 15 Como puede observarse en la tabla anterior, es evidente que la mezcla de *Bacillus methylotrophicus* vivo con los diferentes micronutrientes reduce significativamente el efecto positivo de su aplicación. Sin embargo, este efecto no se produce con la aplicación del extracto de *Bacillus methylotrophicus*. Los resultados obtenidos también muestran
- 20 que la aplicación de un extracto de *Bacillus methylotrophicus* producido utilizando una fuente de carbono distinta al metanol no tiene el mismo efecto que un extracto de un cultivo de *Bacillus methylotrophicus* producido con metanol como fuente de carbono.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un fertilizante foliar, **caracterizado por que** incluye un extracto de microorganismos metilótrofos obtenido a partir de un primer proceso inicial de fermentación de microorganismos metilótrofos vivos con metanol como única fuente de carbono o energía y un segundo proceso que incluye las etapas de homogeneización celular mediante métodos físicos, químicos o enzimáticos, separación de las partes solubles de las insolubles mediante filtración tangencial o centrifugación y, opcionalmente, concentración mediante filtración o atomización.
- 10 2. El fertilizante foliar, de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** los microorganismos metilótrofos se seleccionan entre *Methylobacterium* y *Bacillus*.
3. El fertilizante foliar, de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado por que** los microorganismos metilótrofos se seleccionan entre *Methylobacterium radiotolerans* y *Bacillus methylotrophicus*.
- 15 4. El fertilizante foliar, de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el método de homogeneización celular es una extracción química mediante detergentes no iónicos aplicados al 0,1 % seguido de aplicación de ultrasonidos a 4 kW a un caudal entre 100 y 800 l/h.
- 20 5. El fertilizante foliar, de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la separación de las partes solubles de las insolubles se realiza mediante filtración tangencial con filtros cerámicos con un tamaño de poro entre 400 y 750 nm.
- 25 6. Uso del fertilizante foliar, de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, solo o junto con otros fertilizantes, plaguicidas y/o fungicidas.
7. El uso del fertilizante foliar, de acuerdo con la reivindicación 6, junto con otro fertilizante que incluye aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en isoleucina, leucina, valina, ácido glutámico o asparagina.
- 30 8. El uso del fertilizante foliar, de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, junto con otro fertilizante que incluye microelementos seleccionados del grupo que consiste en boro, níquel, cinc, manganeso, molibdeno, cobalto, hierro y cobre.
9. El uso del fertilizante foliar, de acuerdo con la reivindicación 6, junto con la cipermetrina como plaguicida.
- 35 10. El uso del fertilizante foliar, de acuerdo con la reivindicación 6 o 9, junto con tebuconazol como fungicida.
11. El uso del fertilizante foliar, de acuerdo con las reivindicaciones 6 a 10, junto con un antioxidante.
- 40 12. El uso del fertilizante foliar, de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el antioxidante se selecciona del grupo que consiste en ácido ascórbico o ácido cafeico.
13. El uso del fertilizante foliar, de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde la proporción de antioxidante a utilizar con respecto al fertilizante es inferior al 2 % en peso.
- 45 14. El uso del fertilizante foliar, de acuerdo con las reivindicaciones 6 a 13, junto con un agente humectante.
15. El uso del fertilizante foliar, de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el agente de tonicidad es glicerina.
- 50 16. El uso del fertilizante foliar, de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, en donde la proporción de agente humectante con respecto al fertilizante varía entre el 0,5 % y el 20 % en peso.