

P-2020/30298

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **NC2018/0008176**

Solicitud de patente a nombre de **ACTAGRO, LLC.**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, obrando como apoderada de la sociedad ACTAGRO, LLC, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. **16092** notificado electrónicamente el 19 de octubre de 2021, relacionado con los requerimientos de fondo de la solicitud, atentamente me permito presentar la siguiente información:

1. Título

El examinador indica que el título inicialmente presentado se relaciona con materia no patentable. En vista de lo anterior, el solicitante desea modificar el título así:

"PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE UN MATERIAL SEMI-HÚMICO A PARTIR DE LEONARDITA Y UNA FUENTE DE CARBONO ORGÁNICO NO HÚMICO"

El cual se relaciona con el objeto reclamado y no se refiere a usos. En vista de lo anterior, amablemente solicito que se retire la objeción en este sentido.

2. Modificación a las reivindicaciones

Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto a este memorial un nuevo capítulo reivindicatorio, el cual consta de trece

(13) reivindicaciones y reemplaza completamente el presentado el 1 de agosto de 2018. Específicamente, se realizaron las siguientes modificaciones:

- 2.1.** Se eliminaron las reivindicaciones 1 a 8, 12, 13, 23, y 26 a 47.
- 2.2.** Se modificó la redacción de la antigua reivindicación 9 (nueva reivindicación 1), de modo que ahora se refiere a un proceso para preparar un material semi-húmico, en donde además se define la fuente de carbono orgánico como una sal de ácido orgánico. Esta modificación encuentra soporte en la descripción de la solicitud como fue originalmente presentada, en particular en las reivindicaciones.
- 2.3.** El término "*aproximadamente*" fue eliminado del capítulo reivindicatorio.
- 2.4.** Se realizaron las conversiones de las unidades de temperatura de acuerdo con el sistema internacional de unidades.
- 2.5.** Se integraron las características técnicas mencionadas en las antiguas reivindicaciones 20 y 23 en la nueva reivindicación 9.

Estas modificaciones no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud, y se realizan con el fin de definir la materia reclamada de forma clara y superar las objeciones planteadas por la examinadora en su concepto técnico.

3. Materia no patentable

La examinadora señala que las antiguas reivindicaciones 27 a 47 no serían patentables porque se refieren a usos, es decir, a materia considerada exceptuada de patentabilidad de acuerdo con lo establecido en el Art. 14 de la Decisión 486.

Al respecto, me permito manifestar que el solicitante ha decidido eliminar las antiguas reivindicaciones 27 a 47. Por lo tanto, amablemente solicito que se retire la objeción al respecto.

4. Pago de tasas

Considerando que el presente memorial se presenta junto con modificaciones a las reivindicaciones y la descripción, se adjunta recibo por concepto de pago de tasa de modificación a la solicitud, según lo establecido en la **Resolución 59669 de 2020**.

Ahora, en relación con el número de reivindicaciones, atentamente me permito resaltar que junto a la presente respuesta no se realiza el pago de la tasa por concepto de reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo reivindicatorio tiene un número de cláusulas menor que el presentado anteriormente.

5. Claridad y concisión de las reivindicaciones

El solicitante manifiesta que mediante la presentación del nuevo capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones presentadas por la examinadora en su concepto técnico, de modo tal que las nuevas reivindicaciones reclaman de manera clara y concisa la invención descrita. Con respecto a las objeciones específicas de la examinadora, me permito manifestar lo siguiente:

5.1 La examinadora señala que el capítulo no es conciso, ya que cuenta con un número excesivo de reivindicaciones independientes.

Al respecto, me permito señalar que el capítulo reivindicatorio presentado junto a este memorial contiene únicamente una reivindicación independiente de método. Por lo tanto, considero que la objeción ha sido superada.

5.2 De otro lado, la examinadora afirma que las reivindicaciones 1 a 8 no son claras porque definen el material semi-húmico con respecto a los resultados obtenidos por una técnica analítica en particular.

En este sentido, por favor tenga en cuenta que el nuevo capítulo reivindicatorio no incluye las reivindicaciones objetadas. De esta manera, la objeción ya no es aplicable.

5.3 Asimismo, la examinadora indica que la reivindicación 8 no es clara por cuanto hace referencia a la descripción de la solicitud.

Al respecto me permito resaltar que la reivindicación 8 fue eliminada del capítulo reivindicatorio.

5.4 La examinadora señala que las reivindicaciones 1, 3, 4, 6, 9 no son claras porque emplean términos o expresiones generales que abarcan una gran cantidad de posibilidades.

Con respecto a lo anterior, amablemente me permito reiterar que las reivindicaciones 1, 3, 4 y 6 fueron eliminadas del capítulo reivindicatorio.

Ahora bien, en lo que respecta a la expresión "*fuentes de carbono orgánico no húmico*" encontrada en la antigua reivindicación 9 (nueva reivindicación 1), me permito resaltar que dicha expresión ha sido complementada, de modo que ahora se indica que dicha fuente comprende una sal de ácido orgánico.

En vista de lo anterior, amablemente solicito que se de por superada la objeción al respecto

5.5 La examinadora señala que la reivindicación 20 presenta una falsa dependencia porque se refiere a un proceso, pero abarca una composición.

Al respecto me permito señalar que, siguiendo las amables sugerencias de la examinadora, se ha modificado la redacción de la nueva reivindicación 9 (antigua reivindicación 20), de modo que ahora se caracteriza como un método.

5.6 De otro lado, la examinadora objeta el término "*aproximadamente*" por considerarlo impreciso.

En este sentido, por favor tenga en cuenta que el término objetado fue eliminado del capítulo reivindicatorio modificado, por lo tanto, la objeción ha sido superada.

5.7 La examinadora señala que la reivindicación 9 se refiere a un producto caracterizado por un proceso, y sugiere redactarla de modo que se refiera a un proceso.

Frente a esta objeción, el solicitante ha decidido seguir las sugerencias de la examinadora y modificar la redacción de la antigua reivindicación 9 (nueva reivindicación 1) de modo que ahora se refiere a un método.

5.8 Finalmente, la examinadora señala que Las reivindicaciones 9, 10, 26 no son claras porque mencionan la expresión "(...) y además en el que la fracción de tipo fúlvico de la segunda porción líquida muestra un porcentaje de aumento de carbono de al menos aproximadamente 5% en peso en comparación con la fracción de ácido fúlvico de la primera porción líquida", la cual se considera un resultado a alcanzar que no define el método.

Al respecto, me permito señalar en primera medida que la frase objetada no hace parte de la antigua reivindicación 9 (nueva reivindicación 1). Por su parte, la reivindicación 26 fue eliminada del capítulo reivindicatorio.

En tercer lugar, con respecto a la antigua reivindicación 10 (nueva reivindicación 2) la cual mantiene la frase objetada, me permito referirme a las disposiciones del numeral 2.6.5.8 de la *Guía para examen de solicitudes de patente de invención y modelo de utilidad* de la Superintendencia de Industria y Comercio, el cual señala:

"2.6.5.8 Reivindicaciones definidas por el resultado a alcanzar

Como se menciona anteriormente, las reivindicaciones deben definir la invención por sus características técnicas esenciales, estructurales. El examinador no admitirá que la reivindicación defina la invención por el resultado a alcanzar (del tipo: "Aparato de destilación caracterizado porque tiene un rendimiento del 99%"), puesto que en realidad equivaldría a definir el problema técnico a resolver y el alcance de la reivindicación, incluiría no sólo la solución propuesta por el solicitante, sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado.

El resultado a alcanzar no es una característica técnica de la invención. Puede aparecer en la reivindicación, pero siempre acompañando las características técnicas que definen la invención." (Énfasis añadido)

Así, es claro que incluir un resultado a alcanzar en una reivindicación es permitido siempre que se acompañe de las características técnicas que definen la invención, las cuales son las que efectivamente permiten diferenciar la materia reclamada de las alternativas presentes o futuras que lleguen al mismo resultado.

Visto lo anterior, y teniendo en cuenta que la reivindicación 2 es una reivindicación dependiente, es decir, incluye todas las características técnicas mencionadas en la reivindicación 1, me permito resaltar que la nueva reivindicación 2 es totalmente clara. Por lo tanto, amablemente solicito que se retire la objeción al respecto.

En vista de lo anterior, las objeciones relacionadas con la claridad, la concisión y el soporte en la descripción del capítulo reivindicatorio, han quedado completamente superadas.

6. Descripción

La examinadora indica que la descripción contiene unidades que no hacen parte del Sistema Internacional, por lo que solicita hacer las correcciones necesarias.

Teniendo en cuenta esta objeción, el solicitante presenta junto a este memorial una descripción modificada en la que se han modificado las unidades de modo que ahora se encuentran de acuerdo con el sistema internacional.

Esta modificación no constituye ampliación de materia, toda vez que se realiza con el fin de cumplir con el requerimiento formulado por la examinadora, y corresponde únicamente a correcciones de forma.

En consecuencia, amablemente solicito que se retire la objeción al respecto.

7. Novedad y nivel inventivo

7.1 Novedad

La examinadora establece en su concepto técnico que las antiguas reivindicaciones 1 a 8 carecerían de novedad a la luz de las enseñanzas técnicas descritas en el documento **D1** (EP 0164908).

A este respecto, me permito resaltar que el artículo 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que la invención se considera nueva cuando no está comprendida en el estado de la técnica. Es decir, de acuerdo con el espíritu de la norma legal indicada, la invención no se considera como nueva si está "*comprendida*" en el estado de la técnica, dicha norma se está refiriendo, naturalmente, al invento en su totalidad y no a sus componentes de manera aislada.

Al respecto, considero pertinente recalcar que, para considerar que el objeto de la solicitud carece de novedad, se debe contemplar como mínimo los siguientes aspectos:

- El objeto de la invención en estudio debe estar contenida de forma TOTAL y ABSOLUTA en el documento que se menciona como anterioridad; y
- La comparación del objeto de la invención en cuestión y el estado del arte no debe centrarse o limitarse a los elementos de esta que son previamente conocidos, sino de lo inédito y novedoso que la caracteriza. Esto quiere decir que debe analizarse el valor agregado que aporta la invención con sus nuevas características al campo técnico al cual pertenece la solicitud en estudio.

Lo anterior significa que para que un documento del estado de la técnica pueda afectar la novedad de una solicitud, debe revelar todas y cada una de las características técnicas que la definen.

Aplicando lo anterior al caso concreto, para que las razones que aduce ese Despacho para desvirtuar la novedad fuesen ciertas, sería forzoso que se demostrara que la invención está totalmente comprendida en el estado de la técnica, es decir, de forma individual en el documento D1, lo cual no sucede en este caso.

En particular, se hace notar que las antiguas reivindicaciones 1 a 8 no hacen parte del capítulo presentado junto a este memorial. Asimismo, el solicitante desea resaltar que

las antiguas reivindicaciones 9 a 25, en las cuales se basa el nuevo capítulo reivindicatorio, habían sido reconocidas como novedosas por la examinadora en el Oficio No. 16092.

Así, dado que el documento D1 no divulga de forma TOTAL Y ABSOLUTA las características técnicas esenciales de la materia definida en la reivindicación independiente de la presente solicitud, es posible concluir que la presente solicitud cumple con el requisito de novedad estipulado en el artículo 16 de la Decisión 486.

7.2 Nivel Inventivo

De otro lado, la examinadora establece en su concepto técnico que las antiguas reivindicaciones 9 a 26 no cumplirían con el requisito de nivel inventivo a la luz de la combinación de las enseñanzas de los documentos **D1** (EP 0164908) y **D2** (US2008216534).

Con respecto, a lo anterior, me permito resaltar las disposiciones del artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, que establecen que *“se considerará que la invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica”*.

Lo anterior significa que el análisis de nivel inventivo **NO** es simplemente una comparación de los objetos de las anterioridades y la solicitud en estudio. Por el contrario, el análisis de nivel inventivo **debe demostrar** la obviedad de la invención y establecer cómo ésta no contiene un salto cualitativo que demuestre su altura inventiva. Es decir, para concluir que la materia reclamada no es inventiva, el análisis debe **necesariamente demostrar** que la invención estudiada hubiese sido obvia para una persona versada en la materia en vista del estado de la técnica.

En vista de lo anterior, me permito presentar los argumentos que demuestran que ni las características técnicas de la materia reclamada ni el efecto técnico asociado a las mismas, pueden ser derivados de manera obvia o evidente a partir del arte previo.

La materia reclamada es inventiva a la luz de D1 y D2

En primer lugar, me permito referirme a las características de la materia reclamada.

La reivindicación 1 del capítulo reivindicatorio presentado junto a este memorial se refiere a un proceso para preparar un material semi-húmico que comprende las etapas de:

- (a) calentar una composición acuosa que comprende mineral de leonardita y una fuente de carbono orgánico no húmico que comprende una sal de ácido orgánico a una temperatura de entre 60°C a 72°C para proporcionar una primera porción líquida que tiene una fracción de ácido fúlvico y una primera porción sólida;
- (b) separar la primera porción líquida de la primera porción sólida;
- (c) ajustar el pH de la primera porción líquida a 8,5 o superior; y
- (d) envejecer la primera porción líquida durante al menos 45 días a una temperatura de 26°C a 30°C de manera que la primera porción líquida se separe en una segunda porción líquida que tiene una fracción ácida de componente tipo fulvico aumentada y una segunda porción sólida, en donde el pH de la segunda porción líquida no es ajustado y tiene un pH de 5 a 7; y separar la segunda porción sólida de la segunda porción líquida para proporcionar el material semi-húmico.

De esta forma, se puede observar que la etapa de envejecimiento de la primera porción líquida a una temperatura entre 26°C y 30°C es una característica esencial de la materia reclamada.

Esta etapa no es anticipada por las enseñanzas del documento D1. El documento D1 no incluye ninguna enseñanza o sugerencia para almacenar la composición acuosa de D1 a una temperatura de 26°C a 30°C. Del mismo modo, no existe ninguna razón técnica para concluir que las propiedades del material semi-húmico formado a partir del proceso de la reivindicación 1 serían las mismas o incluso similares a las de D1.

Con el fin de demostrar lo anterior, se adjunta la declaración de inventor Taha Rezai, la cual fue presentada ante la USPTO durante el trámite de la solicitud estadounidense relacionada que fue posteriormente concedida como US 10,315,962. En dicha declaración, particularmente en los puntos 13 a 16, se puede observar que las composiciones obtenidas de acuerdo a la presente invención y de acuerdo a D1, presentan diferencias significativas debido a la etapa de envejecimiento característica de la invención.

Esta diferencia no puede ser superada mediante las enseñanzas de D2. Si bien D2 menciona un rango de temperatura, D2 se refiere a un proceso mediado por microorganismos, mientras que el método reclamado no depende de dicha intervención.

Por tanto, la persona normalmente versada en la materia no llegaría al método definido en las reivindicaciones adjuntas a partir de las enseñanzas de D2.

Además, D2 especifica un pH de 5 a 8 para la mezcla. Por el contrario, el método de la presente invención requiere que el pH se ajuste a 8,5 o superior. Dado que la presente invención está dirigida al aislamiento de un material ácido, esta diferencia evitaría que una persona normalmente versada en la materia busque en el método de D2 una guía. Por lo tanto, D2, solo o en combinación con D1, no enseña ni sugiere la materia reclamada.

Por tanto, respetuosamente solicito tener en cuenta los argumentos aquí presentados donde se demuestra que la invención de la presente solicitud es novedosa y tampoco se habría derivado de manera obvia del estado de la técnica, por lo que cumple con los requisitos de los artículos 14, 16 y 18 de la Decisión 486 de 2000.

4. Conclusión

Con las modificaciones introducidas y los argumentos presentados puede concluirse que:

- i) El nuevo pliego reivindicatorio se ajusta a las disposiciones del Artículo 34 de la Decisión 486/00;
- ii) La descripción modificada cumple con los requisitos establecidos en el Artículo 28 de la Decisión 486/00;
- iii) La invención de la presente solicitud es clara y cuenta con el debido sustento en el capítulo descriptivo, a la vez que se encuentra divulgada de manera suficientemente completa, cumpliendo así con los requerimientos de los Artículos 30 y 28 de la Decisión 486;
- iv) La invención de la presente solicitud no había sido divulgada previamente en el estado de la técnica cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 16 de la Decisión 486, y

- v) La invención de la presente solicitud no resulta obvia ni se derivada de manera evidente del estado de la técnica, cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 18 de la Decisión 486.

Por tanto, atentamente me permito solicitar a ese Despacho otorgar el privilegio de patente solicitado a la solicitud en estudio, toda vez que cumple a cabalidad con los requerimientos de la Decisión 486 de 2000.

Asimismo, respetuosamente solicito a ese Despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional.

5. Anexos

- Nuevo capítulo reivindicatorio conformado por trece (13) reivindicaciones.
- Descripción modificada.
- Copia de la declaración del inventor Taha Rezai, presentada ante la USPTO.
- Recibo de pago por concepto de modificaciones voluntarias.

Señora Directora,


CAROLINA DAZA MONTALVO
C.C. 66.783.790 de Palmira Valle
TP-141563 CSJ
notificaciones@clarkemodet.com.co

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Un proceso para preparar un material semi-húmico en donde el proceso comprende:

(a) calentar una composición acuosa que comprende mineral de leonardita y una fuente de carbono orgánico no húmico que comprende una sal de ácido orgánico a una temperatura de entre 60°C a 72°C para proporcionar una primera porción líquida que tiene una fracción de ácido fúlvico y una primera porción sólida;

(b) separar la primera porción líquida de la primera porción sólida;

(c) ajustar el pH de la primera porción líquida a 8,5 o superior; y

(d) envejecer la primera porción líquida durante al menos 45 días a una temperatura de 26°C a 30°C de manera que la primera porción líquida se separe en una segunda porción líquida que tiene una fracción ácida de componente tipo fulvico aumentada y una segunda porción sólida, en donde el pH de la segunda porción líquida no es ajustado y tiene un pH de 5 a 7;

y separar la segunda porción sólida de la segunda porción líquida para proporcionar el material semi-húmico.

2. El proceso de la reivindicación 1 en donde la fracción de tipo fúlvico de la segunda porción líquida muestra un porcentaje de aumento de carbono de al menos 5% en peso en comparación con la fracción de ácido fúlvico de la primera porción líquida.

3. El proceso de la reivindicación 2, en donde el componente de tipo fúlvico de la segunda porción líquida es al menos 10%, o al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, en peso mayor sobre una base de carbono que el componente de tipo fúlvico de la primera porción líquida.

4. El proceso de la reivindicación 1, en donde el pH de la composición acuosa de la etapa (a) es de 5 a 8, o de 5 a 7, o de 5 a 6.

5. El proceso de la reivindicación 1, en donde la sal de ácido orgánico se selecciona del grupo que consiste en una sal de sodio, potasio, amonio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, zinc, calcio, litio, rubidio o cesio del ácido tetraacético de etilen diamina, ácido triacético de hidroxietilendiamina, ácido pentaacético de dietilen triamina, ácido triacético de nitrilo, etanol diglicina, ácido cítrico, ácido galactérico, ácido glucónico, ácido glucoheptoico, ácido glutárico, ácido glutámico, ácido tartárico o ácido tartrónico.

6. El proceso de la reivindicación 1, en donde el pH de la segunda porción líquida es de 5 a 6.

7. El proceso de la reivindicación 1, que comprende además la adición de macronutrientes a la composición líquida.
8. El proceso de la reivindicación 1, que comprende además la adición de micronutrientes a la composición líquida.
9. El proceso de la reivindicación 1, que comprende además la adición de una sustancia que restringe el agotamiento de nutrientes (NDRS) al material semi-húmico.
10. El proceso de la reivindicación 1, en donde la composición acuosa comprende de 1% a 10% en peso del material semi-húmico.
11. El proceso de la reivindicación 10 en donde la composición acuosa comprende al menos 5% del material semi-húmico y al menos una sustancia que restringe el agotamiento de nutrientes (NDRS).
12. El proceso de la reivindicación 11, en donde la composición acuosa comprende un NDRS en una cantidad de 30% a 99% en peso.
13. El proceso de la reivindicación 12, en donde la composición acuosa comprende un NDRS en una cantidad de 90% a 99% en peso.

MEMORIA DESCRIPTIVA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama el beneficio bajo 35 U.S.C. 119 (e) a la Solicitudes Provisionales de los Estados Unidos, Ser. Nos. 62/290,879, presentada el 3 de Febrero de 2016 y 62/445,686, presentada el 12 de Enero de 2017, donde los contenidos de cada una se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

CAMPO

Esta descripción se refiere a un material semi-húmico y a composiciones semi-húmicas que comprenden el mismo, en donde el material semi-húmico comprende un componente de tipo fúlvico y opcionalmente grupos funcionales bioactivos incrementados, y otro carbono orgánico, y métodos de uso del mismo, y un proceso para obtener el mismo. También se describen métodos para mantener más nitrógeno y fósforo disponibles en la zona de la raíz de la planta y minimizar la lixiviación prematura y la pérdida de nitrógeno y/o fósforo en la atmósfera, las aguas superficiales y/o las aguas subterráneas.

ANTECEDENTES

Los fertilizantes agrícolas comúnmente incluyen los macronutrientes de la planta nitrógeno y fósforo. Después de que el fertilizante se aplica al suelo de un campo agrícola, estos constituyentes a menudo se agotan prematuramente, lo que puede tener efectos perjudiciales sobre el medio ambiente y reducir significativamente el conjunto de nutrientes disponibles.

Una causa principal de la pérdida de nitrógeno es la volatilización de la superficie. Esto ocurre cerca de la superficie del suelo. La urea es un fertilizante nitrogenado importante. El nitrógeno de la urea reacciona con la enzima ureasa en el suelo y se descompone para formar gas de amoníaco. En o cerca de la superficie, normalmente hay poca agua en el suelo para absorber estos gases y, como resultado, escapan a la atmósfera. Esta condición empeora cuando las formas de urea del nitrógeno se aplican al campo pero no están en contacto directo con el suelo, como cuando la urea se disemina sobre residuos de maíz o una solución de nitrato de amonio urea se aplica sobre residuos pesados de tallo de maíz o un cultivo de cobertura. La velocidad de volatilización de la superficie generalmente depende del nivel de humedad, la temperatura y el pH de la superficie del suelo. Si la superficie del suelo está húmeda, el agua del suelo se evapora en el aire. El amoníaco liberado por la urea es capturado por el vapor de agua y se pierde en la

atmósfera. Las temperaturas del aire superiores a 10 °C y un pH del suelo superior a 6.5 aumentan significativamente la velocidad de conversión de la urea a los gases de amoníaco y la volatilización resultante de la superficie.

En ciertas aplicaciones, el amoníaco gaseoso se aplica al suelo de un campo agrícola mediante varillas de aplicación metálica que se introducen en el suelo. Si el suelo no está completamente cubierto y empacado detrás de las espigas, el amoníaco y su nitrógeno constituyente se pierden de la superficie del suelo antes de ser absorbidos en el agua del suelo y convertidos en amonio, que se adsorbe en las partículas del suelo.

La volatilización superficial del nitrógeno también puede ocurrir cuando se aplican formas amónicas de nitrógeno (por ejemplo, sulfato amónico, fosfato diamónico, etc.) a la superficie de suelos calcáreos que tienen un pH superior a 7,5. Los productos de reacción formados cuando tales fertilizantes de amonio reaccionan con el carbonato de calcio tienden a volatilizarse y disiparse en la atmósfera.

Otra causa de la depleción de nitrógeno de los fertilizantes agrícolas es la desnitrificación. Esto ocurre cuando el nitrato (NO_3^-) está presente en el suelo, pero no hay suficiente oxígeno para satisfacer las necesidades de las bacterias y microorganismos en el suelo. Si los niveles de oxígeno son demasiado bajos, dichos microorganismos eliminan el oxígeno del nitrato. Esto produce gas nitrógeno (N_2) u óxido nitroso (N_2O), que se volatilizan fácilmente desde el suelo. La desnitrificación aumenta cuando el suelo está húmedo o compacto o cuando se encuentran temperaturas excesivamente cálidas.

La lixiviación de nitratos es otra causa más de pérdida de nitrógeno no deseada. Esto ocurre cuando el suelo recibe más agua entrante (ya sea por lluvia o por irrigación) de la que puede contener contra la fuerza de la gravedad. A medida que el agua migra hacia abajo a través del suelo, el nitrato-N, que es soluble en agua, se mueve con el agua y se pierde en las aguas subterráneas, desde donde no puede viajar contra la gravedad hacia el perfil del suelo. Aunque las formas de nitrógeno amónico (NH_4^+) tienden a lixiviar muy poco en la mayoría de los suelos, la lixiviación con amonio puede ser significativa en arenas de textura gruesa y en algunos suelos de suciedad.

Tanto el nitrógeno como el fósforo también pueden estar sujetos a un agotamiento prematuro por escorrentía. Tal escorrentía tiende a ocurrir cuando el suelo recibe más agua entrante a través de la lluvia o el riego de lo que el suelo puede acomodar. A medida que el agua se mueve sobre el suelo, parte del suelo puede aflojarse y moverse con el agua. El exceso de

agua puede transportar el suelo desalojado y cualquier nitrógeno y fósforo fertilizante adsorbido lejos del sitio agrícola. El movimiento fuera del sitio de tal nitrógeno y fósforo debido a la escorrentía puede ser particularmente severo en terrenos inclinados o montañosos.

El agotamiento de nitrógeno y fósforo descrito anteriormente presenta una serie de problemas y desventajas. Debido a que se pierde una porción significativa de los nutrientes que mejoran las plantas, muchos tratamientos de fertilizantes agrícolas tienden a ser ineficientes y no son óptimamente efectivos. Una cantidad considerable de nutrientes activos de nitrógeno y fósforo aplicados al campo se desperdician, el crecimiento de la planta puede disminuir y/o puede producirse un cultivo inferior. Aplicar fertilizantes adicionales para compensar la depleción de nitrógeno/fósforo puede agregar un costo considerable, tanto para el productor como para el consumidor, puede aumentar las pérdidas y no siempre es efectivo. Otro problema asociado con el agotamiento de nitrógeno y fósforo de los fertilizantes agrícolas son los efectos ambientales adversos que con frecuencia resultan. En particular, la lixiviación de nitratos y urea, así como la escorrentía de nitrógeno y fósforo que llevan sedimentos pueden contaminar las aguas superficiales cercanas (por ejemplo, arroyos, ríos, lagos, océanos, etc.) y las aguas subterráneas (por ejemplo, acuíferos). La lixiviación de nitratos es un problema ambiental significativo, porque por encima de ciertos niveles, el nitrato en el agua potable es tóxico para los humanos.

Además, se sabe que los óxidos de nitrógeno volátiles, como el óxido nitroso (N_2O), contribuyen al gas de efecto invernadero (GEI), lo que puede afectar negativamente al medio ambiente. La escorrentía de fertilizantes puede causar contaminación por fósforo en las aguas superficiales. Cuando se aumenta la cantidad de fertilizante aplicado a un sitio para compensar el agotamiento, esto solo aumenta el volumen de nutrientes de cultivos potencialmente contaminantes introducidos en el medio ambiente.

RESUMEN

La presente descripción se refiere a un material semi-húmico obtenido a partir de mineral de leonardita, y a composiciones que comprenden el mismo. El material semi-húmico descrito en la presente tiene propiedades químicas únicas tales como, pero sin limitación a, mayor solubilidad en agua y opcionalmente mayores grupos funcionales bioactivos, y otro carbono orgánico, que ayuda a reducir el agotamiento de nutrientes en suelos agrícolas a través de vías biológicas y/o químicas.

En una realización, se proporciona un material semi-húmico caracterizado por tener más de aproximadamente 55% de moléculas clasificadas como lípido, proteína y otro alifático por FTICR-MS. En algunas realizaciones, el material semi-húmico se caracteriza adicionalmente por tener un valor superior a aproximadamente el 9% de las moléculas clasificadas como lignina por FTICR-MS. En algunas realizaciones, el material semi-húmico se caracteriza además por FTICR-MS que tiene menos de aproximadamente 16% de moléculas clasificadas como Aromáticas Condensadas.

En una realización, se proporciona un material semi-húmico caracterizado por tener más de aproximadamente 55% de moléculas que exhiben una H:C de entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 2,2, y que presenta un O:C de entre 0 y aproximadamente 0,6 por FTICR- MS.

En ciertas realizaciones, se proporciona un material semi-húmico obtenido por un proceso que comprende:

(a) calentar una composición acuosa que comprende mineral de leonardita y una fuente de carbono orgánico no húmico a una temperatura de aproximadamente 60°C a aproximadamente 72 °C para proporcionar una primera porción líquida que tiene una fracción de ácido fúlvico y una primera porción sólida;

(b) separar la primera porción líquida de la primera porción sólida;

(c) ajustar el pH de la primera porción de líquido a aproximadamente 8,5 o superior; y

(d) envejecer la primera porción líquida durante al menos aproximadamente 45 días de manera que la primera porción líquida se separe en una segunda porción líquida que tiene una fracción de ácido fúlvico y una segunda porción sólida, en donde el pH de la segunda porción líquida no se ajusta y tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7.

Realizando el proceso como se describe en este documento, la fracción de ácido fúlvico de la segunda porción líquida muestra un porcentaje de aumento de carbono de al menos aproximadamente 5% en peso en comparación con la fracción de ácido fúlvico de la primera porción líquida. Se contempla que el % de aumento en carbono de la segunda parte líquida se debe a la formación de un componente de tipo fúlvico y, opcionalmente, a grupos funcionales bioactivos aumentados. En algunas realizaciones, el porcentaje de aumento de carbono es al menos aproximadamente 25% en peso.

Como tal, se proporciona aquí un material semi-húmico, y composiciones que comprenden el mismo, que se puede obtener mediante los procesos descritos en este documento.

La presente descripción se refiere a métodos para controlar la tasa de agotamiento de nutrientes en el suelo. Además, los métodos también reducen en gran medida el impacto ambiental adverso previamente causado por dichos fertilizantes.

Otras características y ventajas se evidenciarán a partir de la siguiente descripción y las figuras adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra el proceso de fabricación para una composición semi-húmica obtenida a partir de mineral de leonardita (es decir, AG-3FL).

La Figura 2 muestra un aumento en el carbono atribuido (al menos en parte) al componente de tipo fúlvico (como % de peso).

La Figura 3 muestra todas las fracciones húmicas en el sobrenadante combinado y el concentrado como % de carbono.

La Figura 4 muestra la fracción fúlvica del sobrenadante como % de carbono.

La Figura 5 muestra la fracción de humin del concentrado como % de carbono.

La Figura 6 es un esquema del aparato de cámara de suelo.

La Figura 7 muestra el porcentaje de distribución total de nitrógeno después de 216 horas.

La Figura 8 muestra la evolución del dióxido de carbono durante 6 días después del tratamiento.

La Figura 9 muestra la diferencia en las formas de nitrógeno disponibles 7 días después del tratamiento.

La Figura 10 muestra el efecto de una composición que comprende el material semi-húmico (es decir, SP-4) sobre fósforo (por ejemplo, fosfato) en el suelo superficial.

La Figura 11 muestra el efecto de una composición que comprende el material semi-húmico (es decir, SP-4) sobre amonio en el suelo superficial.

La Figura 12 muestra la reducción de la volatilización de NH_3 asociada con una composición que comprende el tratamiento de material semi-húmico (es decir, SP-4) en la ubicación del campo de Ohio.

La Figura 13 muestra el efecto de una composición que comprende la velocidad del material semihúmico (es decir, SP-4) sobre el contenido de N en el grano. Bajo, Medio y Alto se

refieren a las 3 tasas de SP-4 como se describe en el Ejemplo 6. Los tratamientos con letras diferentes son significativamente diferentes con el LSD de Fisher al nivel del 5%.

La Figura 14 muestra la reducción de la volatilización de NH_3 asociada con el tratamiento usando una composición que comprende el material semi-húmico (es decir, SP-4) en la ubicación del campo de Indiana (sin cultivo).

La Figura 15 muestra el efecto de una composición que comprende el material semi-húmico (es decir, SP-4) sobre la reducción en los niveles de NO_3 en el suelo en Indiana (sin cultivo). Los medios de tratamiento etiquetados con letras diferentes fueron significativamente diferentes dentro de ese tiempo de muestreo (los valores de p se muestran en el texto de Ejemplo).

La Figura 16 muestra el efecto de una composición que comprende el material semi-húmico (es decir, SP-4) sobre la lixiviación de nitrato en un campo sin cultivos en Indiana, medido por lisímetros. Los datos mostrados se tomaron 9 semanas después de la aplicación. Los medios seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes por el LSD de Fisher en el nivel del 5%.

La Figura 17 muestra un diagrama de Venn que muestra el número de fórmulas moleculares superpuestas y únicas asignadas a cada tipo de muestra.

La Figura 18 muestra un espectro ESI positivo de una serie de metilación de clase LPOA asignada de forma única a AG-3FL.

La figura 19A muestra un diagrama de Van Krevelen de AG-3FL. La figura 19B muestra una superposición de los diagramas de Van Krevelen de ácido húmico (HA), AG-3FL pre-envejecido y AG-3FL.

La Figura 20A muestra el efecto de AG-3FL sobre la concentración de nitrato en el suelo frente al control, 7 días después del tratamiento. Ambos tratamientos recibieron 112,085 kg N/ha. La reducción porcentual fue del 9,6%. Las columnas etiquetadas con letras diferentes son diferentes según t-test en $p = 0.10$. Los errores estándar se muestran para cada media ($n = 4$).

La Figura 20B muestra el efecto de AG-3FL sobre el carbono en la biomasa microbiana del suelo frente al control solo de N, 14 días después del tratamiento. Ambos tratamientos recibieron 112,085 kg N/ha. El porcentaje de aumento fue del 73%. Las columnas etiquetadas con letras diferentes son diferentes según t-test en $p = 0.10$. Los errores estándar se muestran para cada media ($n = 4$).

La Figura 21A muestra las concentraciones de nitratos del suelo de 7 a 42 días después de la aplicación (DAA) para SP-4 en comparación con el control. Ambos tratamientos recibieron 112,085 kg N/ha. En 14 DAA, las concentraciones de nitrato fueron significativamente diferentes entre los tratamientos a $p = 0,10$. Los errores estándar se muestran para cada media ($n = 4$) en cada fecha de muestreo.

La Figura 21B muestra las concentraciones de carbono de biomasa microbiana del suelo de 7 a 42 días después de la aplicación (DAA) para SP-4 en comparación con el control solo de N. Ambos tratamientos recibieron 112,085 kg N/ha. En 14 DAA, los tratamientos fueron significativamente diferentes en $p = 0,10$. Los errores estándar se muestran para cada media ($n = 4$) en cada fecha de muestreo.

La Figura 22 muestra que tanto las concentraciones de nitrato del suelo como las de lixiviados se redujeron cuando se aplicó SP-4 con UAN.

La Figura 23 muestra los resultados de lixiviación medidos a partir de los lisímetros. Estos datos confirman que SP-4 reduce las concentraciones de nitratos en el suelo y las pérdidas por lixiviación.

La Figura 24 muestra los nitratos del suelo a las concentraciones máximas de la temporada junto con los nitratos del suelo promedio de la temporada, el suelo de amonio y el nitrógeno mineral total del suelo ($\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$). Las letras que son diferentes son significativas a $p \leq 0.05$.

La Figura 25 muestra el contenido de N de la planta en hojas, tallos o tejidos de las hojas individuales y el brote completo de la planta. El contenido de nitrógeno se tabuló a partir de la planta DM y la concentración de N de 10 plantas recolectadas al azar del centro de cada tratamiento cerca de los puntos que se usaron para el muestreo del suelo y luego se promediaron por tejido o planta completa. Las letras que son diferentes son significativas a $p \leq 0.05$.

La Figura 26 muestra el peso de los granos por tratamiento para 15 espigas muestreadas al azar del centro de cada parcela cerca de los puntos que se usaron para el muestreo del suelo. Las letras que son diferentes son significativas a $p \leq 0.05$.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

Debe entenderse que esta descripción no está limitada a realizaciones particulares descritas, ya que, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología

utilizada en este documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente divulgación estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

Lista de abreviaciones

ac	Acre
ha	Hectárea
NDRS	Sustancia que restringe el agotamiento de los nutrientes
wt	Peso
Lbs/Lb	Libras
mM	Millimolar
Gal/gal	Galón
N	Nitrógeno
v	Volumen
IPA	Isopropanol
h	hora
UAN	Nitrato de amonio urea (UAN 28 contiene 28 % de N en peso)
kg	kilogramos
L	litros

Debe observarse que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un nutriente" incluye una pluralidad de nutrientes.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta descripción. Como se usa en la presente memoria, los siguientes términos tienen los siguientes significados.

Como se usa en el presente documento, el término "que comprende" o "comprende" pretende significar que las composiciones y métodos incluyen los elementos enumerados, pero no excluye otros. "Consistir esencialmente en" cuando se usa para definir composiciones y métodos, significará excluir otros elementos de importancia esencial para la combinación para el propósito establecido. Por lo tanto, una composición que consiste esencialmente en los elementos tal como se definen en la presente memoria no excluiría otros materiales o etapas que no afectan materialmente a la (s) característica (s) básica (s) y nueva (s) reivindicada (s). "Consistir en" significará excluir más elementos traza de otros ingredientes y pasos sustanciales

del método. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta descripción.

El término "aproximadamente" cuando se utiliza antes de una designación numérica, por ejemplo, temperatura, tiempo, cantidad y concentración, incluido el rango, indica aproximaciones que pueden variar en (+) o (-) 10%, 5% o 1%.

Las sustancias húmicas (HS) están definidas por el IHSS (International Humic Substances Society) como mezclas complejas y heterogéneas de materiales polidispersos formados por reacciones bioquímicas y químicas durante la descomposición y transformación de plantas y restos microbianos (un proceso llamado humificación). HS están presentes de forma natural en el suelo, el agua, las turbas, las brasas y las lutitas. Tradicionalmente, estas sustancias se han aislado en tres fracciones: ácido húmico, ácido fúlvico y humina. Estas fracciones se definen operativamente en base a la solubilidad en soluciones básicas y ácidas. Leonardita, un carbón marrón, es conocido por ser rico en ácido húmico.

El término "semi-húmico" pretende referirse a una composición que comprende tanto moléculas de carbono orgánico húmicas como no húmicas que se han transformado en nuevas moléculas que contienen carbono de ambas fuentes.

El término "componente de tipo fúlvico" se refiere a la fracción exactamente análoga a una extracción de ácido fúlvico a partir de una sustancia húmica genuina obtenida mediante el Método de Ácido Húmico CDFA, o prueba análoga. El término "parecido a un fulvulo" en lugar de "fúlvico" se usa cuando las sustancias de prueba son de naturaleza "semi-húmica" en lugar de "húmica".

El término "grupos funcionales bioactivos" pretende referirse a compuestos que tienen grupos funcionales que contienen oxígeno, por ejemplo, ácidos carboxílicos, alcoholes (por ejemplo, fenoles), éteres, ésteres, etc. En ciertas realizaciones, los compuestos que tienen grupos funcionales que contienen oxígeno son en gran parte aromático. En ciertas realizaciones, los grupos funcionales bioactivos se refieren tanto a ácidos carboxílicos como a fenoles.

El término "fertilizante" se refiere a cualquier material de origen natural (orgánico) o sintético (que no sea cal) que se aplica a los suelos o a los tejidos vegetales (generalmente hojas) para suministrar uno o más nutrientes de plantas esenciales para el crecimiento de las plantas. En un fertilizante de tipo "orgánico", la base es descomposición o subproductos vegetales y/o animales procesados (por ejemplo, estiércol o emulsión de pescado). En ciertas realizaciones, el fertilizante comprende uno o más de un componente de urea, un componente de amonio, un

componente de nitrato, un componente de amoniaco, un componente de nitrógeno orgánico y/o un componente de fósforo. El fertilizante puede comprender componentes líquidos y/o sólidos y puede contener uno o más micronutrientes, como hierro, manganeso, molibdeno, zinc y/o cobre. En ciertas realizaciones, el fertilizante no es un fertilizante a base de calcio (por ejemplo, CAN 17). En ciertas realizaciones, el fertilizante tiene un pH mayor que aproximadamente 4.

El término "nutriente" se refiere a uno o más macronutrientes, como nitrógeno (N), fósforo (P) o potasio (K); y/o micronutrientes tales como calcio (Ca), magnesio (Mg), (S), zinc (Zn), etc.

El término "aplicar" o "aplicado" al suelo pretende referirse a cualquier método adecuado para aplicar un fertilizante y/o un NDRS al suelo. El término pretende abarcar métodos para aplicar líquidos, sólidos u otra forma o mezcla de los mismos al suelo. En ciertas realizaciones, la "aplicación" o "aplicado" al suelo comprende uno o más de pulverización, inundación, inyección de suelo y/o quimigación. En ciertas realizaciones, la aplicación directa de soluciones puede hacerse en sistemas de riego por goteo o por microaspersión. En ciertas realizaciones, las soluciones pueden aplicarse a través de sistemas de riego de pivote central. En ciertas realizaciones, la "aplicación" comprende inyección directa en el área de la zona de raíz.

El término "tasa de agotamiento" se refiere a la velocidad a la que un fertilizante (o uno o más nutrientes) se agota del suelo. En ciertas realizaciones, el fertilizante se agota a una velocidad de o menos de aproximadamente 50%, o menos de aproximadamente 40%, o menos de aproximadamente 30%, o aproximadamente 20%, o menos de aproximadamente 10% en comparación con el fertilizante solo. En ciertas realizaciones, la cantidad de nutriente (por ejemplo, nitrógeno) usado para fertilizar un cultivo puede reducirse en al menos aproximadamente 25%, o al menos aproximadamente 40-50%. En ciertos casos, el nitrógeno empobrecido del suelo se recupera en la biomasa del cultivo resultante cultivado en el mismo. En ciertas realizaciones, se puede recuperar al menos aproximadamente 56,04 kg/ha de nitrógeno en la biomasa del cultivo resultante. El cultivo puede ser cualquier cultivo, como, pero no limitado a, cultivos de hortalizas, cultivos en hileras, árboles de hoja caduca y nueces, uvas, aceitunas, cítricos, césped, pastos y plantas ornamentales.

El término "reducción de la contaminación del agua y/o del aire" pretende referirse a la reducción en una o más de las pérdidas de nutrientes por volatilización, lixiviación y/o esorrentía superficial. En ciertas realizaciones, la contaminación del agua y/o del aire se reduce en al menos aproximadamente 50%, o al menos aproximadamente 40%, o al menos

aproximadamente 30%, o al menos aproximadamente 20%, o al menos aproximadamente 10% en comparación con fertilizante solo.

El término "disponibilidad de nutrientes" pretende referirse a la proporción de la cantidad total de nutrientes en el suelo que las plantas pueden aprovechar y utilizar. Esta fracción se denomina fracción disponible y depende de la naturaleza química del nutriente en cuestión, así como del tipo de suelo y otras influencias del entorno del suelo (véase, por ejemplo, Marscher, P. Mineral Nutrition of Higher Plants (Tercera edición)), 2012, Elsevier, Amsterdam).

Un material semi-húmico que tiene un mayor componente de ácido fúlvico y un aumento de grupos funcionales bioactivos

Aquí se divulga un material semi-húmico y composiciones que comprenden el mismo. El material semi-húmico descrito en la presente memoria se obtiene a partir de mineral de leonardita, aunque se puede usar otro carbono orgánico. El material semi-húmico tiene un componente incrementado similar al ácido fúlvico y opcionalmente grupos funcionales bioactivos aumentados. En una realización, los grupos funcionales bioactivos aumentados son grupos funcionales que contienen oxígeno, tales como ácidos carboxílicos y fenoles.

En una realización, se proporciona un material semi-húmico que se caracteriza por tener más de aproximadamente 55% de moléculas clasificadas como lípido, proteína y otro alifático por FTICR-MS. El lípido, proteína y otra región alifática de un diagrama de Van Krevelen se define típicamente como aquellas moléculas que exhiben una H:C de entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 2,2, y que exhibe un O:C de entre 0 y aproximadamente 0,67 por FTICR-MS. Por consiguiente, también se proporciona aquí un material semi-húmico caracterizado por tener más de aproximadamente un 55% de moléculas que exhiben una H:C de entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 2,2, y que presenta un O:C de entre 0 y aproximadamente 0,67 por FTICR-MS. En ciertas realizaciones, se proporciona un material semi-húmico caracterizado por tener más de aproximadamente 56%, o más de aproximadamente 57%, o más de aproximadamente 58%, o más de aproximadamente 59%, o más de aproximadamente 60%, o alrededor del 59% de las moléculas clasificadas como lípidos, proteínas y otras alifáticas por FTICR-MS.

En algunas realizaciones, el material semi-húmico se caracteriza por tener más de aproximadamente 9% de moléculas clasificadas como lignina por FTICR-MS. La región de lignina de un diagrama de Van Krevelen se define típicamente como aquellas moléculas que exhiben una H:C de entre aproximadamente 0,7 y aproximadamente 1,5, y que exhibe un O:C de

entre 0,1 y aproximadamente 0,67 mediante FTICR-MS. Por consiguiente, también se proporciona aquí un material semi-húmico caracterizado por tener más de aproximadamente 9% de moléculas que exhiben una H:C de entre aproximadamente 0,7 y aproximadamente 1,5, y que presenta un O:C de entre 0,1 y aproximadamente 0,67 por FTICR- SRA. En ciertas realizaciones, se proporciona un material semi-húmico caracterizado por tener más de aproximadamente 10%, o aproximadamente 10, 5% de moléculas clasificadas como lignina por FTICR-MS.

En algunas realizaciones, el material semi-húmico se caracteriza por tener menos de aproximadamente 16% de moléculas clasificadas como aromáticas condensadas por FTICR-MS. La región aromática condensada de un diagrama de Van Krevelen se define típicamente como aquellas moléculas que exhiben una H:C de entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 0,7, y que exhibe un O:C de entre 0 y aproximadamente 0,67 mediante FTICR-MS. Por consiguiente, también se proporciona aquí un material semi-húmico caracterizado por tener menos de aproximadamente 16% de moléculas que exhiben una H:C de entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 0,7, y que exhibe un O:C de entre 0 y aproximadamente 0,67 por FTICR-SRA. En ciertas realizaciones, se proporciona un material semi-húmico caracterizado por tener menos de aproximadamente 17%, o menos de aproximadamente 16%, o menos de aproximadamente 15%, o menos de aproximadamente 14%, o menos de aproximadamente 13%, o aproximadamente 12% o aproximadamente 13% de las moléculas clasificadas como Aromáticas Condensadas por FTICR-MS.

En algunas realizaciones, el material semihúmico se caracteriza por tener aproximadamente 4-5% de moléculas clasificadas como carbohidratos por FTICR-MS. La región de carbohidratos de un diagrama de Van Krevelen se define típicamente como aquellas moléculas que exhiben una H:C de entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 2,4, y que exhibe una O:C de entre 0,67 y aproximadamente 1,2 por FTICR-MS. Por consiguiente, también se proporciona aquí un material semi-húmico caracterizado por tener entre aproximadamente 4 - 5% de moléculas que exhiben una H:C de entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 2,4, y que exhibe una O:C de entre 0,67 y aproximadamente 1,2 por FTICR-MS. En ciertas realizaciones, se proporciona un material semi-húmico caracterizado por tener más de 1%, o más de aproximadamente 2%, o más de aproximadamente 3%, o más de aproximadamente 4%, o más de aproximadamente 5%, o aproximadamente 4 % o aproximadamente 5%, o de aproximadamente 4 a aproximadamente 5% de moléculas clasificadas como carbohidratos por FTICR-MS.

El material semi-húmico descrito en este documento comprende un aditivo de carbohidrato que se agrega durante el proceso de fabricación (véanse los ejemplos a continuación). En consecuencia, el material semi-húmico contiene un mayor porcentaje de moléculas clasificadas como carbohidratos por FTICR-MS en comparación con el ácido húmico (véase la Figura 19B y el Ejemplo 2). Sin embargo, sorprendentemente, el número de fórmulas moleculares de los compuestos que caen dentro de esta región aumenta con la etapa de envejecimiento, dando como resultado una composición molecular diferente en comparación con el material pre envejecido. En ciertas realizaciones, el número de fórmulas moleculares de los compuestos que caen dentro de la región de carbohidratos es mayor que 20, o mayor que 25, o aproximadamente 29 o aproximadamente 30.

En algunas realizaciones, el material semi-húmico se caracteriza por tener aproximadamente un 3% de moléculas clasificadas como hidrocarburo insaturado por FTICR-MS. La región de hidrocarburo insaturado de un diagrama de Van Krevelen se define típicamente como aquellas moléculas que presentan un H:C de entre aproximadamente 0,7 y aproximadamente 1,5, y que exhibe un O:C de entre 0 y aproximadamente 0,1 mediante FTICR-MS. De acuerdo con esto, también se proporciona aquí un material semi-húmico caracterizado por tener entre aproximadamente 4-5% de moléculas que exhiben una H:C de entre aproximadamente 0,7 y aproximadamente 1,5, y que exhibe un O:C de entre 0 y aproximadamente 0,1 por FTICR- SRA. En ciertas realizaciones, se proporciona un material semi-húmico caracterizado por tener menos de aproximadamente 5%, o menos de aproximadamente 4% o entre aproximadamente 2 a aproximadamente 3%, o aproximadamente 2% o aproximadamente 3% de moléculas clasificadas como hidrocarburo insaturado por FTICR-MS.

En una realización, se proporciona un material semi-húmico caracterizado por tener aproximadamente 58-59% de moléculas clasificadas como lípido, proteína y otro alifático y aproximadamente 4-5% de moléculas clasificadas como carbohidratos por FTICR-MS. En una realización, se proporciona un material semi-húmico caracterizado por tener aproximadamente 58-59% de moléculas clasificadas como lípidos, proteínas y otras alifáticas, aproximadamente 10-11% de moléculas clasificadas como lignina, aproximadamente 11-12% de compuestos clasificados como condensado aromático, y alrededor del 4-5% de las moléculas clasificadas como carbohidratos por FTICR-MS. En una realización, se proporciona un material semi-húmico caracterizado por tener aproximadamente 58-59% de moléculas clasificadas como lípidos, proteínas y otras alifáticas, aproximadamente 10-11% de moléculas clasificadas como

lignina, aproximadamente 11-12% de compuestos clasificados como condensado aromático, alrededor del 4-5% de las moléculas clasificadas como carbohidratos, y alrededor del 2-3% de las moléculas clasificadas como hidrocarburo insaturado por FTICR-MS.

En ciertas realizaciones, se proporciona un material semi-húmico obtenido mediante un proceso que comprende:

(a) calentar una composición acuosa que comprende mineral de leonardita y una fuente de carbono orgánico no húmico a una temperatura de aproximadamente 60°C a aproximadamente 72 °C para proporcionar una primera porción líquida que tiene una fracción de ácido fúlvico y una primera porción sólida;

(b) separar la primera porción líquida de la primera porción sólida;

(c) ajustar el pH de la primera porción de líquido a aproximadamente 8,5 o superior; y

(d) envejecer la primera porción líquida durante al menos aproximadamente 45 días de manera que la primera porción líquida se separe en una segunda porción líquida que tiene una fracción de ácido fúlvico y una segunda porción sólida, en donde el pH de la segunda porción líquida no se ajusta y tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7;

y adicionalmente en donde el componente de tipo fúlvico de la segunda porción líquida muestra un porcentaje de aumento de carbono de al menos aproximadamente 5% en peso en comparación con la fracción de ácido fúlvico de la primera porción líquida. En algunas realizaciones, la segunda porción líquida es al menos aproximadamente 10%, o al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, en peso mayor sobre una base de carbono que la fracción de ácido fúlvico de la primera porción líquida en peso mayor que la fracción de ácido fúlvico de la primera porción líquida. En ciertas realizaciones, el proceso comprende adicionalmente separar la segunda porción sólida de la segunda porción líquida.

Realizando el proceso descrito en la presente memoria, el peso de la fracción de ácido fúlvico se incrementa según se determina mediante el Método de Ácido Húmico CDFA (véase, por ejemplo, el Ejemplo 1). En ciertas realizaciones, además del peso de la fracción de ácido fúlvico, se aumenta el % de carbono de la fracción de ácido fúlvico (véanse, por ejemplo, las Figuras 3 y 4). En ciertas realizaciones, el % de carbono de la fracción de ácido fúlvico se incrementa en al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 % o al menos aproximadamente 30 % realizando el proceso descrito en este documento. Se considera que el aumento en el contenido de carbono del componente de tipo

fúlvico se debe al menos en parte a la conversión de la fracción de humina y/o a la recombinación de carbono húmico y no húmico (véanse, por ejemplo, las Figuras 3 y 5). Se contempla además que esta conversión se debe, al menos en parte, a la presencia de microbios durante la etapa de envejecimiento. Por consiguiente, otras composiciones que contienen humin y/u otros componentes derivados de humina, no forman el material semi-húmico descrito en este documento simplemente por envejecimiento (por ejemplo, en un estante).

El componente de tipo fúlvico se deriva del componente semi-húmico en el mineral de leonardita y de otro carbono orgánico agregado. Además, se contempla que los compuestos que contribuyen al componente de tipo fúlvico aumentado tienen un aumento en los grupos funcionales bioactivos. Se contempla que los efectos beneficiosos del material semi-húmico descrito en el presente documento y las composiciones que los comprenden se atribuyen al componente de tipo fúlvico aumentado y, opcionalmente en algunas realizaciones, a los grupos funcionales bioactivos incrementados. En una realización, los grupos funcionales bioactivos aumentados son grupos funcionales que contienen oxígeno, tales como ácidos carboxílicos y fenoles. En ciertas realizaciones, el porcentaje de ácidos carboxílicos y fenoles en el material semi-húmico es típicamente de aproximadamente 6-7% o aproximadamente 6.5% en peso. El porcentaje de ácidos carboxílicos y fenoles en el material semi-húmico se cuantifica como una concentración molar que luego se convierte en porcentaje en peso usando el peso molecular del ácido fórmico y el fenol y la densidad del material.

En una realización, el pH de la primera porción líquida en la etapa (c) se ajusta a aproximadamente 8,5 o superior. El ajuste del pH se puede realizar usando cualquier base adecuada, tal como hidróxido de sodio o potasio, pero sin limitarse a esta. En ciertas realizaciones, el pH de la primera porción líquida en la etapa (c) se ajusta a aproximadamente 8,5, o aproximadamente 9, o aproximadamente 9,5, o aproximadamente 10, o aproximadamente 10,5, o aproximadamente 11.

En una realización, el pH de la composición acuosa de la etapa (a) es de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 6.

En ciertas realizaciones, la fuente de carbono orgánico no húmico comprende una o más sales de ácido orgánico. Se contempla que la sal de ácido orgánico puede ser la sal de cualquier ácido orgánico. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la sal de ácido orgánico se selecciona del grupo que consiste en una sal de sodio, potasio, amonio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, zinc, calcio, litio, rubidio o cesio de ácido etilendiaminotetraacético, ácido de hidroxietileno

diamina triacético, ácido dietilen triamina pentaacético, ácido nitrilo triacético, etanol diglicina, ácido cítrico, ácido galactérico, ácido glucónico, ácido glucoheptoico, ácido glutárico, ácido glutárico, ácido glutámico, ácido tartárico o ácido tartrónico.

Al realizar el proceso descrito en la presente memoria, se observa una disminución del pH en ausencia de un ajuste del pH. En ciertas realizaciones, el pH de la segunda porción líquida varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 6.

En ciertas realizaciones, el proceso comprende adicionalmente separar la segunda porción sólida de la segunda porción líquida. En consecuencia, se proporciona un material semi-húmico que comprende un componente de tipo fúlvico aumentado y grupos funcionales bioactivos incrementados.

También se proporciona en la presente memoria una composición acuosa que comprende el material semi-húmico obtenido mediante los procedimientos descritos en la presente memoria y al menos una sustancia húmica adicional. En ciertas realizaciones, la composición acuosa comprende de aproximadamente 1% a aproximadamente 95%, o aproximadamente 90%, o aproximadamente 80%, o aproximadamente 70%, o aproximadamente 60%, o aproximadamente 50%, o aproximadamente 40%, o aproximadamente 30 %, o aproximadamente 20%, o aproximadamente 10%, o aproximadamente 5%, o de 1% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 80%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 70%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 60%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 50%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 40%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 10%, en peso de la composición semi-húmica obtenida por los procesos descritos en este documento. En ciertas realizaciones, la sustancia húmica adicional es una sustancia que restringe el agotamiento de nutrientes (NDRS), y puede estar presente en una cantidad que varía de aproximadamente 30% a aproximadamente 99% en peso, o de aproximadamente 90% a aproximadamente 99% en peso. En una realización, el porcentaje de ácidos carboxílicos y fenoles en la composición acuosa que comprende el material semi-húmico es de aproximadamente 9-10%. El porcentaje de ácidos carboxílicos y fenoles en la composición acuosa se cuantifica como una concentración molar luego se convierte en porcentaje en peso usando el peso molecular de ácido fórmico y fenol y la densidad de la composición. La sustancia que restringe el agotamiento de los nutrientes (NDRS) incluye una formulación líquida que contiene al menos uno o ambos de los siguientes componentes:

(1) una composición estimulante del crecimiento de las plantas producida tal como se describe en Marihart, patente de los Estados Unidos 4.698.090 y/o 4.786.307 (las descripciones de las cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad);

(2) un extracto húmico de una fuente húmica genuina, por ejemplo, leonardita.

En algunas realizaciones, el NDRS comprende una combinación de un material vegetal extraído de al menos uno del grupo que consiste en algas marinas, algas y sus derivados; y el Componente 1, cada uno de una a tres partes en peso. En otra realización, el NDRS comprende una combinación de Componente 1 y Componente 2, en una parte cada uno en peso. En otra realización, el NDRS comprende una combinación del material vegetal de una a tres partes en peso, el Componente 1 de una a tres partes en peso y el Componente 2 de una a tres partes en peso. El extracto húmico (Componente 2 anterior) puede comprender cualquier sustancia húmica, incluido el Componente 1. Por ejemplo, puede comprender una o más de una composición estimulante del crecimiento de la planta producida como se describe en Marihart (véanse las Patentes de Estados Unidos N° 4.698.090 y 4.786.307, la cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia), o una sustancia húmica (HS) que comprende ácido húmico, ácido fúlvico y humina.

En ciertas realizaciones, el NDRS puede comprender opcionalmente uno o más agentes quelantes (por ejemplo, carbohidratos). El agente quelante puede ser cualquiera o más sales de sodio, potasio, amonio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, zinc, calcio, litio, rubidio o cesio de ácido etilendiaminotetraacético, ácido hidroxietilendiaminotetracético, ácido dietilentriaminopentaacético, ácido nitrilo triacético, o etanol diglicina. En una realización, el agente quelante es un carbohidrato o un ácido carboxílico, tal como uno seleccionado del grupo que consiste en una sal de amonio o metal de una variedad de ácidos orgánicos. Los ejemplos no limitantes de ácidos orgánicos incluyen ácido cítrico, ácido galactérico, ácido glucónico, ácido glucoheptoico, ácido glutárico, ácido glutámico, ácido tartárico y ácido tartrónico.

Un NDRS representativo para ser utilizado en los métodos proporcionados en la presente memoria puede prepararse de acuerdo con la patente de los Estados Unidos N° 4.698.090. Por ejemplo, un NDRS ejemplar se puede preparar añadiendo 9 partes (en peso) de mineral de leonardita a 75 partes de agua, previamente calentadas a una temperatura de 76,6°C - 90,5°C pero a no más de 107,2 °C. Se agrega un carbohidrato o un ácido carboxílico, tal como uno seleccionado del grupo que consiste en una sal de amonio o metal de diversos ácidos orgánicos (como se describió anteriormente), tal como tartrato de potasio (15 partes en peso), y la

composición líquida se mezcla durante cinco horas y luego se le permitió establecerse en múltiples etapas. Dependiendo del entorno de plantación deseado, el líquido extraído se puede usar en su condición ácida resultante. Alternativamente, el pH puede ajustarse agregando hidróxido de sodio o hidróxido de potasio.

En una realización, una sustancia de restricción de agotamiento de nutrientes ejemplar (NDRS) comprende humina desagregada (por ejemplo, de aproximadamente 2% a aproximadamente 5%) en una suspensión coloidal, así como ácido húmico, ácido fúlvico y opcionalmente ciertas composiciones de modificación de crecimiento de plantas y/o extractos de material vegetal adicional.

En ciertas realizaciones, la composición acuosa también puede comprender otra fuente de nutriente (por ejemplo, micro o macro), tal como un material vegetal extraído de al menos uno del grupo que consiste en algas marinas, algas y derivados de los mismos. En una realización, la composición acuosa también comprende algas marinas.

En cualquier realización, cualquier composición como se describe en este documento puede comprender además un fertilizante. El fertilizante puede comprender cualquier fertilizante que contenga nitrógeno y/o fósforo usado para fines agrícolas o de mejoramiento del crecimiento de otras plantas. El fertilizante como se usa en este documento puede comprender uno o más de un componente de urea, un componente de amonio, un componente de nitrato, un componente de amoníaco, un componente de nitrógeno orgánico y/o un componente de fósforo. En ciertas realizaciones, el fertilizante no es un fertilizante a base de calcio (por ejemplo, CAN 17). En ciertas realizaciones, el fertilizante tiene un pH mayor que aproximadamente 4.

En ciertas realizaciones, el fertilizante y un material semi-húmico o composición acuosa como se describe en la presente memoria se premezclan en solución antes de la adición al suelo, tal como en una planta de mezcla. Sus concentraciones respectivas pueden variar desde 1 % hasta aproximadamente 20 %, o desde 1 % hasta aproximadamente 15 %, o desde 1 % hasta aproximadamente 10 % en peso de cualquiera de las composiciones descritas en este documento para fertilizar. En ciertas realizaciones, la relación peso/peso de cualquiera de las composiciones descritas aquí para fertilizar es de aproximadamente 1:100 a aproximadamente 2:1. Las relaciones a modo de ejemplo incluyen además aproximadamente 1:90, aproximadamente 1:75; alrededor de 1:60; alrededor de 1:50; alrededor de 1:25; alrededor de 1:10; y alrededor de 1:1.

De acuerdo con esto, se proporciona en esta memoria una composición que contiene nitrógeno que comprende un fertilizante a base de nitrógeno y el material semi-húmico, o una

composición acuosa que comprende el mismo, como se describe en este documento. Los fertilizantes nitrogenados adecuados incluyen nitrato de amonio y urea (UAN), nitrato de amonio (AN) o soluciones de agua amoniacal. En ciertas realizaciones, el material semi-húmico está presente en la composición que contiene nitrógeno como una composición acuosa con una sustancia húmica (por ejemplo, un NDRS). En ciertas realizaciones, la composición acuosa que comprende el material semi-húmico descrito aquí está presente en una cantidad de al menos aproximadamente 9,09 litros, o aproximadamente 9,09 litros, o aproximadamente 13,64, o aproximadamente 18,18, o aproximadamente 22,73, o aproximadamente 27,28, o aproximadamente 31,82, o alrededor de 36,37, o alrededor de 40,92, o alrededor de 45,46 L por cada 45,36 kg de fertilizante nitrogenado.

En ciertas realizaciones, el material semi-húmico o la composición acuosa como se describe en este documento se premezclan con un pesticida y un fertilizante antes de la adición al suelo.

Métodos

En un aspecto, la presente descripción implica tratar el suelo de un campo de césped agrícola, césped o césped u otro sitio de plantación con el material semi-húmico, una composición semi-húmica obtenida mediante los procesos descritos en este documento, o una composición acuosa que comprende el mismo. En ciertas realizaciones, el tratamiento comprende el uso de un fertilizante basado en nitrógeno y/o fósforo. En ciertas realizaciones, el tratamiento comprende el uso de un pesticida. En ciertas realizaciones, el material semi-húmico o la composición acuosa tal como se describe en la presente memoria funciona para retener nitrógeno mientras se mantiene la biodisponibilidad del nitrógeno para el cultivo.

El suelo a tratar puede ser de cualquier tipo de suelo, incluidos, entre otros, arcilla, marga, arcilla-marga, limo-marga, y similares. En algunas realizaciones, el suelo comprende aproximadamente 30-70% de arena, aproximadamente 20-60% de limo, aproximadamente 10-25% de arcilla y aproximadamente 0,5 a 3% de materia orgánica. En algunas realizaciones, el suelo comprende aproximadamente 20-40% de arena, aproximadamente 30-50% de limo, aproximadamente 20-40% de arcilla y aproximadamente 0,5 a 5% de materia orgánica. En algunas realizaciones, el suelo comprende aproximadamente 30-35% de arena, aproximadamente 40-45% de limo, aproximadamente 25-30% de arcilla y aproximadamente 1-5% de materia orgánica. En algunas realizaciones, el suelo comprende aproximadamente 15-20% de arena, aproximadamente 35-40% de limo, aproximadamente 35-40% de arcilla y aproximadamente 1-5% de materia orgánica. En algunas realizaciones, el suelo comprende aproximadamente 30-

35% de arena, aproximadamente 45-50% de limo, aproximadamente 20-25% de arcilla y aproximadamente 1-5% de materia orgánica. En algunas realizaciones, el suelo comprende aproximadamente 35-40% de arena, aproximadamente 40-45% de limo, aproximadamente 15-20% de arcilla y aproximadamente 1-5% de materia orgánica. En algunas realizaciones, el suelo comprende aproximadamente 65-70% de arena, aproximadamente 20-25% de limo, aproximadamente 10-15% de arcilla y aproximadamente 0,5-1% de materia orgánica. En algunas realizaciones, el suelo comprende aproximadamente 25-30% de arena, aproximadamente 40-45% de limo, aproximadamente 30-35% de arcilla y aproximadamente 0,5-1% de materia orgánica. En algunas realizaciones, el suelo comprende aproximadamente 5-10% de arena, aproximadamente 30-35% de limo, aproximadamente 60-65% de arcilla y aproximadamente 1-5% de materia orgánica. En algunas realizaciones, el suelo comprende aproximadamente 40% de arena, aproximadamente 45% de limo, aproximadamente 17% de arcilla y aproximadamente 3% de materia orgánica, o aproximadamente 40% de arena, aproximadamente 45% de limo, aproximadamente 17% de arcilla y aproximadamente 3% de materia orgánica. o aproximadamente 30% de arena, aproximadamente 40% de limo, aproximadamente 29% de arcilla y aproximadamente 1% de materia orgánica, o aproximadamente 65% de arena, aproximadamente 20% de limo, aproximadamente 14% de arcilla y aproximadamente 1% de materia orgánica, o aproximadamente 33% de arena aproximadamente 42% de limo, aproximadamente 25% de arcilla y aproximadamente 3% de materia orgánica, o aproximadamente 20% de arena, aproximadamente 40% de limo, aproximadamente 40% de arcilla y aproximadamente 4% de materia orgánica, o aproximadamente 30% de arena, aproximadamente 50% de limo, aproximadamente 20% de arcilla y aproximadamente 2% de materia orgánica, o aproximadamente 40% de arena, aproximadamente 45% de limo, aproximadamente 15% de arcilla y aproximadamente 3% de materia orgánica, o aproximadamente 65% de arena, aproximadamente 20% de limo, aproximadamente 15% de arcilla y aproximadamente 0.5 % de materia orgánica, o aproximadamente 10% de arena, aproximadamente 30% de limo, aproximadamente 60% de arcilla y aproximadamente 2% de materia orgánica. En ciertas realizaciones, el suelo no está severamente hidratado o no tiene agua.

Se pueden emplear técnicas de aplicación convencionales tales como pulverización, fertirrigación o inyección de vástago. En ciertas realizaciones, el suelo ha sido fertilizado (es decir, el fertilizante puede haberse aplicado previamente al suelo). En ciertas realizaciones, la aplicación directa del material semi-húmico, o una composición acuosa que comprende el mismo, puede hacerse en sistemas de riego por goteo o por microaspersión. En ciertas

realizaciones, el material semi-húmico, o una composición acuosa que comprende el mismo, se puede aplicar a través de sistemas de riego por pivote central. En ciertas realizaciones, el material semi-húmico, o una composición acuosa que comprende el mismo, se aplica mediante inyección directa en el área de la zona de la raíz. En ciertas realizaciones, el material semi-húmico, o una composición acuosa que comprende el mismo, se aplica a través de un vástago o vestido lateral.

En ciertas realizaciones, la aplicación se realiza temprano en el ciclo de vida del cultivo. El material semi-húmico, o una composición acuosa que lo comprende, se puede aplicar antes de la planta, como un iniciador, al costado, con fertirrigación, con la parte superior vestida o pegada al suelo, y se puede diluir con agua para asegurar una distribución uniforme. En ciertas realizaciones, la aplicación se repite una o más veces. En ciertas realizaciones, la aplicación se realiza en el suelo. En ciertas realizaciones, la aplicación se realiza por fertirrigación. Los cultivos ejemplares incluyen, entre otros, cultivos de hortalizas y frutas, cultivos de campo y en hileras, y huertos y viñedos.

La cantidad de material semi-húmico o composición acuosa que comprende la misma a aplicar puede calcularse de diversas maneras. Por ejemplo, la cantidad del material semihúmico puede expresarse en una variedad de unidades, incluyendo masa o volumen de material por masa o volumen de suelo, área de tierra o masa de fertilizante. En una realización, la velocidad puede ser la masa de la composición acuosa (por ejemplo, una composición acuosa que comprende el material semihúmico y un NRDS) por masa de fertilizante o masa de nitrógeno o fósforo en el fertilizante. Diversas relaciones para los componentes en la composición acuosa se describen anteriormente. Las velocidades adecuadas incluyen:

	Unidades	
	Litros de composición acuosa por ha	Litros de composición acuosa por 100 kg de N o P
Extremo bajo del rango	5	2
	20, 30, 50, 80, 2000, o 5,000	3, 8, 10, 12, 30, 60, 100 o 500
Extremo alto del rango	15,000	1000

En una realización, la composición acuosa se aplica en un intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 litros por hectárea de tierra. En una realización, la composición acuosa se aplica en un intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 12 litros por 100 kilogramos de nitrógeno o fósforo en el fertilizante.

El material semihúmico, o una composición acuosa que comprende el mismo, como se describe en este documento es particularmente preferible a las sustancias conocidas para restringir el agotamiento de nutrientes porque afecta el ciclo de nitrógeno estándar en múltiples puntos, mientras que cada producto previo está diseñado para actuar en un solo punto. El presente método elimina por lo tanto la necesidad de usar múltiples productos solapantes, que son excesivamente caros y tienden a agravar los efectos ambientales adversos exhibidos comúnmente por cada uno de esos productos.

Los métodos descritos aquí controlan y reducen significativamente el agotamiento de los nutrientes de la planta, como nitrógeno y fósforo, presentes en el suelo, en aproximadamente un 10% a más de aproximadamente 50% y hacen que esta porción de esos nutrientes esté disponible para el uso de la planta como cultivo madura en comparación con el uso de un fertilizante solo. En ciertas realizaciones, la presente descripción se refiere a un método para controlar la tasa de agotamiento de un nutriente en el suelo. La tasa de agotamiento puede ser una medida de la pérdida de nitrógeno por cualquier método, por ejemplo, volatilización y/o lixiviación.

En una realización, el método comprende aplicar un material semihúmico o una composición acuosa que comprende el mismo y un fertilizante al suelo o aplicar un material semihúmico o una composición acuosa que comprende el mismo al suelo que ha sido fertilizado, en donde el agotamiento del nutriente se redujo en aproximadamente 20 a aproximadamente 80% en peso aproximadamente 7 días después de aplicar el material semihúmico o una composición acuosa que comprende el mismo y/o fertilizante al suelo.

En otras realizaciones, el agotamiento del nutriente se redujo en aproximadamente 20%, o aproximadamente 25%, o aproximadamente 30%, o aproximadamente 35%, o aproximadamente 40%, o aproximadamente 45%, o aproximadamente 50%, o aproximadamente 55%, o aproximadamente 60% o aproximadamente 65%, o aproximadamente 70%, o aproximadamente 75%, o aproximadamente 80% en peso aproximadamente 7 días después de aplicar el material semihúmico o una composición acuosa que comprende lo mismo y un fertilizante para el suelo. En ciertas realizaciones, la temperatura es de aproximadamente 22 a aproximadamente 35 °C.

En ciertas realizaciones, el fertilizante está basado en nitrógeno y comprende amoníaco, amonio, nitrato y/o urea. En ciertas realizaciones, el material semi-húmico o una composición acuosa que comprende el mismo se aplica al suelo a una concentración de menos de aproximadamente 0,1 miligramos de composición semi-húmica por 100 gramos de suelo, o menos de aproximadamente 0,5 mililitros de composición semi-húmica por 100 gramos de

tierra, o menos de aproximadamente 0,1 mililitros de composición semi-húmica o acuosa que comprende la misma por 100 gramos de tierra.

En particular, como se muestra en la Figura 12, la combinación del fertilizante y el material semi-húmico o una composición acuosa que comprende la misma de acuerdo con los presentes métodos, reduce significativamente la volatilización de amoníaco (NH_3) después de la aplicación del fertilizante al campo agrícola. Se descubrió que el material semi-húmico tiene una influencia mitigante significativa sobre la velocidad con que se libera amoníaco a la atmósfera. Como tal, se proporcionan métodos para reducir el agua y/o la contaminación del aire causada por el uso de un fertilizante en el suelo.

Como se representa en la Figura 12, el tratamiento del suelo como se describe en este documento causó una reducción significativa en la cantidad de amoníaco liberado a la atmósfera. Se contempla que esto ocurre porque el material semihúmico, o una composición acuosa que comprende el mismo, proporciona una superficie de adsorción incrementada para el amoníaco y/o interactúa con la biota del suelo. Esto reduce la pérdida de gas de la superficie del suelo. También retrasa la nitrificación de la urea del fertilizante, de modo que la conversión a nitrato lixiviable ocurre mucho más cerca del momento en que el cultivo requerirá el nutriente. En lugar de lixiviarse a través del suelo y ser desperdiciado, el nitrógeno se inmoviliza y estabiliza hasta que la planta crece lo suficiente como para requerirlo como un nutriente. En una realización, se proporciona un método para reducir la lixiviación de nitratos en el suelo en al menos 10% después de aproximadamente 9 días, que comprende aplicar el material semihúmico o una composición acuosa que comprende el mismo y un fertilizante al suelo.

En una realización, se proporciona un método para aumentar la absorción de nitrógeno dentro de un cultivo, que comprende aplicar un material semihúmico o una composición acuosa que comprende el mismo que tiene un componente de humina de bajo peso molecular, y opcionalmente un fertilizante, al suelo o aplicar un material semi-húmico o una composición acuosa que comprende el mismo al suelo que ha sido fertilizado. En ciertas realizaciones, el peso de nitrógeno contenido en la biomasa del cultivo se incrementa en al menos aproximadamente 15%, o aproximadamente 50%, o aproximadamente 45%, o aproximadamente 40%, o aproximadamente 35%, o aproximadamente 30%, o aproximadamente 25%, o aproximadamente 20%, o aproximadamente 15%, o aproximadamente 10%, o aproximadamente 5% en peso frente al peso de nitrógeno contenido en la biomasa de un cultivo donde no se aplicó un material semi-húmico al suelo. En ciertas realizaciones, la biomasa de nitrógeno en un cultivo se incrementa mientras se mantiene o mejora la calidad y el rendimiento del cultivo.

Se contempla que la aplicación combinada de fertilizante y material semi-húmico retrase la reacción del nitrógeno dentro del fertilizante con las enzimas ureasa en el suelo. Esto a su vez ralentiza la conversión de urea por ureasa, reduciendo así las pérdidas de nitrógeno debido a la volatilización de la urea. En cambio, el nitrógeno permanece como urea que se puede mover al suelo con lluvia o riego. Cuando la urea se convierte en amonio en la zona de la raíz, el nitrógeno es adsorbido por las partículas del suelo, estabilizado y utilizado eficazmente, según sea necesario, por las plantas en crecimiento. La adsorción de nitrógeno subsuperficial también minimiza la acumulación de nitratos y amonio en la superficie del suelo, que de lo contrario puede conducir a la desnitrificación y la consiguiente volatilización del nitrógeno gaseoso u óxido nitroso del suelo o la escorrentía con la lluvia.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para potenciar la actividad microbiana medida por la cantidad de CO₂ desprendido de la respiración microbiana aeróbica, o medido directamente. La mayor liberación de CO₂ indica que a medida que aumenta la población microbiana, el nitrógeno se inmoviliza o se almacena en la biomasa microbiana para luego proporcionar nutrientes al cultivo en desarrollo (Figura 8). En efecto, la mayor producción de dióxido de carbono indica que la biomasa microbiana está aumentando y, por lo tanto, requiere una mayor cantidad de nitrógeno que el control. La producción de microbios de este dióxido de carbono indica que el nitrógeno se inmoviliza de manera efectiva (se almacena dentro de la biomasa microbiana) y se estabiliza en la zona de la raíz y no se pierde por lixiviación. Se sabe que la inmovilización es beneficiosa para el ciclo del nitrógeno del suelo y el crecimiento del cultivo, ya que a medida que los microbios siguen sus ciclos de vida, el nitrógeno se libera posteriormente a la forma mineral disponible para la planta.

El uso de fertilizante y una composición húmica como se describe en la presente memoria inmoviliza de manera efectiva el nitrógeno a partir de fertilizantes granulares y líquidos a base de nitrógeno, residuos de cultivos, abonos y suspensiones de estiércol/agua de lavado. Esto ralentiza la nitrificación y la desnitrificación y retrasa la actividad de la ureasa, que a su vez minimiza la acumulación rápida y/o larga de nitratos en el suelo. A medida que el nitrato-N del suelo aparece más lentamente, esto permite que la demanda de cultivos se sincronice y aumente proporcionalmente con el aumento de la disponibilidad de nitrógeno. La actividad microbiana inmoviliza el nitrógeno y con la mineralización posterior permite que el fertilizante funcione de manera mucho más efectiva y eficiente que en el pasado. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la actividad microbiana se incrementa en al menos aproximadamente 20% después de aproximadamente 6 días en un suelo que se ha tratado con el material semi-húmico frente a la

actividad microbiana en un suelo en ausencia de material semi-húmico añadido que tenga un componente humin de bajo peso molecular. El material semi-húmico puede aplicarse al suelo a una concentración de al menos aproximadamente 0,1 mg de material semi-húmico por aproximadamente 100 gramos de tierra, o entre aproximadamente 0,1 y 1 mg de material semi-húmico por aproximadamente 100 gramos de tierra.

Aunque los presentes métodos pueden usarse con cualquier tipo de suelo, en ciertas realizaciones, el suelo comprende aproximadamente 65% de arena, y puede comprender además aproximadamente 20% de limo, aproximadamente 14% de arcilla y aproximadamente 1% de materia orgánica. En ciertas realizaciones, la actividad microbiana se mide por la evolución del dióxido de carbono del suelo. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la evolución del dióxido de carbono se incrementa en al menos aproximadamente 2 veces después de aproximadamente 45 días, y el suelo comprende aproximadamente 30% de arena, y puede comprender además 40% de limo, aproximadamente 29% de arcilla y aproximadamente 1% de materia orgánica.

En la práctica, los residuos orgánicos pueden agregarse al campo después de la cosecha. La descomposición de tales residuos y la liberación de nitrógeno de los mismos (mineralización) rara vez se sincroniza con el crecimiento del cultivo. El uso del presente método para tratar tales residuos y tales suelos ayuda a promover la mineralización de nitrógeno de modo que el nitrógeno en el residuo también esté disponible como un nutriente vegetal en un momento que coincida beneficiosamente con la necesidad del cultivo de nitrógeno para un crecimiento óptimo. Esto facilita la absorción de N antes de que los nitratos se acumulen excesivamente en el suelo y sean más propensos a la lixiviación. Periódicamente, la adición de las formulaciones de esta divulgación a residuos orgánicos reduce el agotamiento considerablemente en comparación con las prácticas estándar.

Se proporciona en la presente un método para aumentar la inmovilización de nitratos en el suelo en al menos aproximadamente un 20% después de aproximadamente 9 días, que comprende aplicar un material semi-húmico, o una composición que comprende el mismo, al suelo. En ciertas realizaciones, la composición semi-húmica se aplica al suelo a una concentración de al menos aproximadamente 0,1 mg de material semi-húmico por 100 gramos de tierra, o entre aproximadamente 0,1 mg y 1 gramo de material semi-húmico por aproximadamente 100 gramos de tierra. En ciertas realizaciones, la inmovilización de nitrato se incrementa en al menos aproximadamente 50%, o al menos aproximadamente 45%, o al menos aproximadamente 40%, o al menos aproximadamente 35%, o al menos aproximadamente 30%, o

al menos aproximadamente 25%, o al menos alrededor del 20% después de aproximadamente 9 días.

En ciertas realizaciones, la inmovilización comprende inhibir y/o mitigar la transformación de nitrato (NO_3^-) y/o amonio (NH_4^+) en nitrógeno o gas de amoníaco. En ciertas realizaciones, la relación de $\text{NH}_4^+ / (\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-)$ es mayor que al menos aproximadamente 0,02.

Como beneficio adicional, el material semi-húmico que se utilizará en los métodos descritos aquí generalmente es más seguro (por ejemplo, para los humanos y el medioambiente) y ofrece ventajas de manejo sobre muchos otros productos que reducen la pérdida de nitrógeno, algunos de los cuales están etiquetados y autorizados para ser utilizados como pesticidas. Por el contrario, la mayoría de los productos químicos existentes utilizados para prevenir el agotamiento de nutrientes presentan riesgos para la salud humana y el medio ambiente, según el nivel de exposición.

Aún más, los métodos descritos en este documento reducen los riesgos ambientales debido a la escorrentía. Por ejemplo, el fósforo se pierde en el suelo durante la erosión causada por la lluvia. Como se muestra en la Figura 10, al aplicar un material semi-húmico como se describe en este documento, se contempla que se reducirá la escorrentía de fósforo.

Ciertos métodos descritos en este documento se realizan aplicando un fertilizante y un material semi-húmico al mismo tiempo o por separado, aproximadamente al mismo tiempo (por ejemplo, dentro de aproximadamente 3, o aproximadamente 2, o aproximadamente 1 hora el uno del otro), al suelo de el campo agrícola que se está tratando. En ciertas realizaciones de los métodos descritos aquí, el material semi-húmico se aplica al suelo con menos de aproximadamente tres horas, o menos de aproximadamente dos horas, o menos de aproximadamente una hora, o menos de aproximadamente 30 minutos, o menos que aproximadamente 20 minutos, o menos de aproximadamente 10 minutos, o menos de aproximadamente 5 minutos antes o después de aplicar el fertilizante. En ciertas realizaciones, el fertilizante y el material semi-húmico, o una composición acuosa que comprende el mismo, se premezclan y se aplican como una composición única. La aplicación del fertilizante y el material semi-húmico, o una composición que los comprende, dentro de dicho intervalo de tiempo puede evitar el agotamiento excesivo de nitrógeno y fósforo y lograr una distribución de nutrientes más efectiva y eficiente a las plantas.

En una realización, el material semi-húmico (composición húmica que tiene un componente de humina de bajo peso molecular), o una composición acuosa que comprende el mismo, y el fertilizante se premezclan en solución antes de la adición al suelo. Sus concentraciones respectivas pueden variar de 1% a aproximadamente 20%, o de 1% a aproximadamente 15%, o de 1% a aproximadamente 10% en peso de la composición semi-húmica a fertilizante. En ciertas realizaciones, la relación peso/peso de la composición semi-húmica a fertilizante es de aproximadamente 1:100 a aproximadamente 2:1. Las relaciones a modo de ejemplo incluyen además aproximadamente 1:90, aproximadamente 1:75; alrededor de 1:60; alrededor de 1:50; alrededor de 1:25; alrededor de 1:10; y alrededor de 2:1. En ciertas realizaciones, la relación es 1:1. En ciertas realizaciones, cuando el fertilizante se mezcla con tiosulfato de amonio (AN-20) o polifosfato de amonio (10-34-0), el material semi-húmico, o una composición acuosa que comprende el mismo, se diluye con un volumen igual de agua.

La cantidad de material semi-húmico, o una composición acuosa que comprende lo mismo, aplicada al suelo puede variar, y típicamente varía de aproximadamente 0,001 ml a aproximadamente 100 ml de la composición semi-húmica por kilogramo de suelo, o aproximadamente 0,1 ml del material semi-húmico por kilogramo de suelo, o aproximadamente 0.03 mL por kilogramo de suelo, o aproximadamente 0.05 mL por kilogramo de suelo, o aproximadamente 1 mL del material semi-húmico por kilogramo de suelo, o aproximadamente 10 mL de material semi-húmico por kilogramo de suelo, o aproximadamente 20 ml del material semi-húmico por kilogramo de suelo, o aproximadamente 30 ml del material semi-húmico por kilogramo de suelo, o aproximadamente 40 ml del material semi-húmico por kilogramo de suelo, o aproximadamente 50 ml del material semi-húmico por kilogramo de suelo. En ciertas realizaciones, la cantidad de material semi-húmico aplicado al suelo varía de aproximadamente 0,001 ml a aproximadamente 50 ml del material semi-húmico por kilogramo de suelo.

EJEMPLOS

En cada uno de los siguientes ejemplos, el material semi-húmico y las composiciones que comprenden el mismo, tal como se usan en la presente memoria, se preparan como se describe a continuación.

Ag-3FL se puede preparar de la siguiente manera. Se combinaron 5-20 partes de polvo de leonardita con 50-75 partes de agua a una temperatura de 90,5 °C o más. 10-20 partes de carbohidrato o agente quelante (el carbohidrato o agente quelante puede ser una sal o más de una sal de sodio, potasio, amonio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, zinc, calcio, litio, rubidio o cesio, ácido etilendiamintetraacético, ácido hidroxietilendiamintriácético, ácido

dietilentriaminopentaacético, ácido nitrilo triacético o etanol diglicina, una sal de amonio o de metal de una variedad de un ácido orgánico, como ácido cítrico, ácido galactérico, ácido glucónico, ácido glucoheptoico, ácido glucárico, ácido glutárico, ácido glutámico, ácido tartárico y ácido tartrónico) fue adicionado. Se mantuvo una temperatura de 65,56°C durante la posterior adición de carbohidrato o agente quelante. Los componentes se mezclaron durante 6 horas, se colocaron en un recipiente adecuado durante 4 días. El sobrenadante se eliminó luego y el pH se ajustó con aproximadamente 1-3 partes de una base fuerte. Los componentes se mezclaron durante 1 hora, se dejaron sedimentar en un recipiente adecuado durante 45 días a una temperatura de 26,7-29,4 °C, se eliminó el sobrenadante, el líquido se bombeó a través del separador y se filtró a través de un filtro de 100 mallas.

En cada uno de los siguientes ejemplos, donde una composición acuosa que comprende la composición semi-húmica y un NDRS, el NDRS usado es SP-1 y puede prepararse como se describe a continuación.

SP-1 se puede preparar agregando 14 partes (en peso) de mineral de leonardita seco a 52 partes de agua, previamente calentadas a una temperatura de 85 °C. Se agrega un carbohidrato o una sal de metal carboxilato tal como tartrato de potasio (16 partes en peso) y se mezcla durante 2-3 horas. La composición líquida se oxigena durante 270 minutos y se añaden 10 partes de una base fuerte seguido de la eliminación de los componentes insolubles de mineral de leonardita. La composición líquida se aisló luego y se ajustó el pH con 1 parte de base fuerte. SP-1 se puede usar para hacer la composición de Ag-3FL que se describe a continuación.

En cada uno de los siguientes ejemplos, los suelos utilizados se muestran en la tabla a continuación.

Ubicación	Nombre de la serie de suelo	% de arena	% de limo	% de arcilla	% de materia orgánica	pH
Ohio	Lodo limoso Crosby y lodo arcilloso limoso Brookston	32.7	41.9	25.4	2.5	6.5
Wisconsin	Lodo arcilloso limoso Milford	20	40	40	4.1	6.6
California	Lodo arcilloso Panoche	29	25	46	1.1	7.7
Indiana	Lodo arcilloso limoso tratado y lodo limoso Crosby	31	48	21	2.0	6.6
Tulare	Marga Colpien	39	44	17	3.1	7

Ubicación	Nombre de la serie de suelo	% de arena	% de limo	% de arcilla	% de materia orgánica	pH
Kern	Marga Exeter Sandy	66	21	13	0.58	6.2
Fresno	Marga arcillosa Cerini	29	41	30	0.37	7.9
Monterey	Marga arcillosa Pacheco	31	41	28	1.1	7.4
McCurdy	Arcilla Tranquillity	9	32	60	1.6	7.8

Ejemplo 1: Envejecimiento de 45 días de AG-3FL resultados en un aumento en la fracción de tipo fúlvico

Introducción

El proceso AG-3FL es resumido en la Figura 1.

Métodos

Fracción de tipo fúlvico

Los extractos de leonardita y otras sustancias húmicas se definen como ácido húmico, ácido fúlvico o humin según las siguientes definiciones operacionales¹:

1. Ácido húmico: la base extraída, fracción de ácido precipitado
2. Ácido fúlvico: la fracción extraída de base, soluble en ácido
3. Humin: la base extraída, fracción insoluble

El Método de ácido húmico CDFA2 es actualmente el único método ampliamente aceptado para cuantificar el ácido húmico y está disponible para los clientes en algunos laboratorios de suelos y fertilizantes. En el método de ácido húmico CDFA, las fracciones Ácido fúlvico y Humin se descartan. Durante el período de envejecimiento de 45 días de AG-3FL, se cuantificó la fracción de tipo Fúlvico, la fracción similar a la extracción de ácido fúlvico de una sustancia húmica genuina. La fracción de tipo fúlvico se midió en base al sobrenadante después de la acidificación y centrifugación de la muestra. Esta fracción, así como las fracciones Húmica y Humin se conocen como tipo húmica, tipo humin y tipo fúlvica porque la solución inicial contiene más que solo materia orgánica humificada. Como es típico del método ácido húmico CDFA, la fracción de tipo fúlvica se midió como un porcentaje de peso seco de la muestra original.

Resultados

Aumento de la fracción de tipo fúlvico en la escala de producción

La composición resultante después del proceso de 45 días se llama Ag-3FL. La fracción de tipo fúlvico se cuantificó al comienzo y al final del período de envejecimiento AG-3FL de 45 días usando el Método Ácido Húmico CDFA como se describe en Métodos. La Figura 2 contiene resultados de tres lotes de AG-3FL. Las desviaciones estándar y los valores de p que se muestran en la Figura 2 se basan en cuatro preparaciones independientes al comienzo y al final del proceso de envejecimiento de 45 días para cada lote. El porcentaje de aumento en el componente de tipo fúlvico se representa en unidades de peso/peso de la muestra original.

Los resultados de tres lotes muestran un aumento promedio de $5,7\% \pm 2,3\%$ (p/p) de fracción de tipo fúlvico durante el período de envejecimiento de 45 días.

Validación a escala de laboratorio

Seis muestras duplicadas fueron recolectadas en frascos de 16 oz. al comienzo del proceso de envejecimiento. En tres puntos de tiempo (inicial, 20 días, 45 días), dos jarras se homogeneizaron vigorosamente y luego se centrifugaron a 4500 rpm durante 12 minutos. El residuo que queda después de la centrifugación (centrifugado) y el sobrenadante se aislaron, se combinaron y se fraccionaron con el Método Ácido Húmico CDFA. En lugar de determinar la fracción de tipo fúlvico en peso por peso, cada fracción húmica se cuantificó en una base de % de Carbono (Carbono/Peso). Al medir y comparar el aumento en una base de peso de carbono, se eliminan todos los artefactos que pueden haber aparecido al medir en base p/p (inorgánico/ceniza). El método analítico descrito está disponible comercialmente en Huffman Labs y fue codesarrollado con el USGS.

Los resultados de la Figura 3 muestran un aumento absoluto de 1,5 % de carbono que equivale a un aumento porcentual de aproximadamente 31 % de carbono para la fracción de tipo fúlvico del sobrenadante y el concentrado combinados durante el período de envejecimiento de 45 días. La fracción de tipo húmico permanece bastante estable, mientras que la fracción de tipo humin pierde 1.3 % de carbono o una disminución porcentual de 74 % de carbono. Esto muestra que la composición Ag-3FL tiene un componente de humina de bajo peso molecular.

La Figura 4 muestra que el aumento en la fracción de tipo fúlvico se capta claramente en el sobrenadante, lo cual es de esperar ya que la fracción de tipo fúlvico es soluble en agua. Este aumento corresponde a una disminución en la fracción de tipo humin del Centro (Figura 5). Los valores de ANOVA F fueron mayores que F críticos con una alfa de 0.05 para los resultados de tipo fulvico y humin dentro de los grupos en la Figura 3 y entre los grupos para las Figuras 4 y 5.

Las Desviaciones estándar mostradas en las Figuras 3, 4 y 5 se basan en ejecuciones cuadruplicadas de la misma muestra en un analizador de carbono total.

Conclusión

El envejecimiento de 45 días de AG-3FL da como resultado un aumento en la Fracción de tipo fúlvico, y proporciona así una composición semi-húmica, que se puede obtener a partir de mineral de leonardita, que tiene un componente de humina de bajo peso molecular. Hay evidencia para apoyar que una conversión, recombinación de carbono o alguna otra transformación de la fracción de tipo humina en el residuo del proceso de envejecimiento se correlaciona con el aumento en la fracción de tipo fúlvico en el sobrenadante.

Referencias

1. Aiken, George R., y compañeros. Sustancias húmicas en suelo, sedimento y agua: geoquímica, aislamiento y caracterización. John Wiley & Sons, 1985.
2. Departamento de alimentos y agricultura de California (1999) *Método de ácido húmico*, Sacramento, CA

Ejemplo 2: Caracterización molecular de AG-3FL, AG-3FL pre-envejecido y un extracto húmico estándar

La espectrometría de masas de resonancia ión-ciclotrón con transformada de Fourier (FTICR-MS) es una poderosa herramienta para la caracterización molecular de mezclas orgánicas complejas. La resolución de masa ultra alta y la precisión de masa de FTICR-MS permiten la identificación de composiciones elementales para miles de especies, con una mínima preparación de muestras. Para iones con carga única de <700 Da, se pueden asignar fórmulas moleculares no ambiguas directamente a partir de la masa medida si se puede lograr una precisión de masa de ~1 ppm. En este ejemplo, AG-3FL pre-envejecido, AG-3FL y un extracto húmico estándar se caracterizaron con FTICR-MS.

Métodos

Preparación de muestra e instrumentación. Cada muestra se procesó en los modos de ionización por electrospray positiva y negativa (ESI) e ionización por desorción láser (LDI) positiva y negativa. Debido a la baja intensidad de iones resultante de LDI positivo, esos espectros no fueron procesados. Para ESI, las muestras se diluyeron al 0,01% (v/v) en una solución de acetonitrilo y agua 1:1 (v/v). Para LDI, se colocó una gota de muestra en una placa LDI de acero inoxidable y se dejó secar durante aproximadamente una hora. Las muestras se corrieron luego en un 15T SolariXR FTICR-MS (Bruker Daltonics) que se calibró externamente

con soluciones de calibración estándar. Las condiciones de origen de ESI y LDI se muestran en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1

Polaridad	Velocidad de flujo (µl/hr)	Voltaje capilar (V)	Compensación de la placa final (V)	Presión del nebulizador (bar)	Flujo de gas seco (L/min)	Temp. de secado (°C)	FID Transiente
ESI Positivo	120	4500	-500	0.5	4	180	4M
ESI Negativo	120	4500	-500	0.5	4	180	4M

Tabla 2

Polaridad	Láser	Compensación de placa (V)	Placa deflectora (V)	Potencia del láser	Disparos / escaneo del Láser	Caminata inteligente (µm)	FID Transiente
LDI Negativo	Yag/Nd, 351 nm	-100	-200	30%	100	500	4M

Análisis de los datos. Los espectros posteriores a la adquisición se calibraron internamente utilizando valores m/z determinados inequívocamente, incluidos los grupos de carbono que se identificaron manualmente. Luego se filtraron las listas de masas para excluir cualquier pico por debajo de un umbral de señal a ruido de 9. Además, solo se usaron masas en el rango de 120-500 m/z para determinar fórmulas moleculares ya que la precisión de masa es más alta en el rango de masa inferior para FTICR- SRA. Para generar fórmulas moleculares, el error máximo permitido entre el m/z medido y el teórico de la fórmula molecular calculada se estableció en 1,0 ppm. Además, las fórmulas moleculares calculadas se cribaron para excluir las proporciones de oxígeno a carbono de más de 1,5 y las relaciones de nitrógeno a carbono de menos de 0,6, ya que es poco probable que ocurran en la materia orgánica natural. Los puntos de corte O/C y N/C fueron similares a los determinados por Stubbins, et al. (2010)².

Muestras. Las muestras en la Tabla 3 a continuación se analizaron mediante los métodos descritos anteriormente. Para cada tipo de muestra, se analizaron tres lotes por separado. Los tres lotes de HA y AG-3FL se produjeron en la escala de producción. Los lotes AG-3FL pre-envejecidos se produjeron en el laboratorio como se describió previamente en el Ejemplo 1.

Tabla 3

Tipo de muestra	Descripción
HA	Extracto húmico disponible comercialmente, estándar
AG-3FL pre-envejecido	AG-3FL al inicio del proceso de envejecimiento de 45 días.
AG-3FL	AG-3FL al final del proceso de envejecimiento de 45 días.

Se determinó que las fórmulas moleculares consistentemente identificadas en los tres lotes asociados con cada tipo de muestra eran características para el tipo de muestra. Si se identificó una fórmula molecular en solo uno o dos de los tres lotes por tipo de muestra, la fórmula no se consideró característica de ese tipo de muestra y no se le asignó. Las diferencias observadas en los lotes dentro de los tipos de muestra se atribuyeron a la materia prima y la variabilidad del procesamiento.

Resultados

La Tabla 4 a continuación muestra el número de fórmulas moleculares asignadas a cada tipo de muestra. El proceso de envejecimiento de 45 días, que da como resultado AG-3FL, produce más fórmulas moleculares en comparación con la muestra AG-3FL pre-envejecida. Para los tres tipos de muestra combinados, se identificaron un total de 2030 fórmulas moleculares, con la mayoría de las asignadas a HA.

Tabla 4

Tipo de muestra	Número de fórmulas moleculares (120-500m/z)
HA	1184
AG-3FL pre-envejecido	226
AG-3FL	620

La Figura 17 muestra un diagrama de Venn que muestra el número de fórmulas moleculares superpuestas y únicas asignadas a cada tipo de muestra. Solo 52 de las fórmulas moleculares de 2030 se comparten sistemáticamente entre todos los lotes de HA y AG-3FL pre-

envejecido y Ag-3FL. Además, a AG-3FL se le han asignado 441 fórmulas moleculares únicas que no están consistentemente presentes ni en AG-3FL pre-envejecido ni en HA.

Las fórmulas moleculares determinadas por FTICR-MS pueden clasificarse en clases de compuestos, con cierta superposición, de acuerdo con las proporciones de oxígeno a carbono e hidrógeno a carbono⁴. Los límites de clasificación de los compuestos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Tipo de compuesto	Relación H:C	Relación O:C
Lípido, proteína y otros alifáticos (LPOA)	1.5-2.2	0-0.67
Lignina	0.7-1.5	0.1-0.67
Aromático condensado	0.2-0.7	0-0.67
Carbohidrato	1.5-2.4	0.67-1.2
Hidrocarburo insaturado	0.7-1.5	0-0.1

La Tabla 6 clasifica las fórmulas moleculares asignadas en clasificaciones compuestas como un porcentaje de las fórmulas moleculares totales, para cada tipo de muestra. El número real de fórmulas moleculares asignadas se presenta entre paréntesis. Los porcentajes de clasificación de compuestos para el tipo de muestra HA son claramente muy diferentes en comparación con AG-3FL Pre-Envejecido y AG-3FL. HA tiene un mayor porcentaje de lignina, hidrocarburo aromático condensado e insaturado. Además, HA tiene solo 1 fórmula molecular asignada en la clase de carbohidratos.

Tabla 6*

Tipo de muestra	LPO A	Lignin a	Aromático condensad o	Carbohidrat o	Hidrocarburo insaturado	No categorizad o
HA	25.5% (302)	26.6% (315)	28.1% (303)	0.08% (1)	12.2% (144)	9.54% (113)
AG-3FL pre- envejecid o	54.0% (122)	7.96% (18)	18.6% (42)	5.75% (13)	1.76% (4)	12.8% (29)

AG-3FL	58.7% (364)	10.5% (65)	12.4% (77)	4.67% (29)	2.90% (18)	11.7% (73)
--------	----------------	---------------	---------------	---------------	---------------	---------------

* Los porcentajes de las clasificaciones de los compuestos para cada tipo de muestra no suman 100% debido a la superposición de los límites de clasificación de los compuestos

Los porcentajes de clasificación de compuestos para AG-3FL son más similares a AG-3FL pre-envejecidos que a HA. Sin embargo, el 441 o el 71% de las fórmulas moleculares asignadas para AG-3FL son únicas. La clasificación de los compuestos de las fórmulas moleculares únicas asignadas a AG-3FL se muestran en la Tabla 7. Más de la mitad de las fórmulas únicas asignadas a AG-3FL se clasifican en la clase LPOA (lípidos, proteínas y otras alifáticas).

Tabla 7*

Tipo de muestra	LPOA	Lignina	Aromático condensado	Carbohidrato	Hidrocarburo insaturado	No categorizado
441 Fórmula AG-3FL única	56.2% (248)	10.4% (46)	13.6% (60)	3.85% (17)	3.62% (16)	13.1% (58)

* Los porcentajes de las clasificaciones de los compuestos para cada tipo de muestra no suman 100% debido a la superposición de los límites de clasificación de los compuestos

La Figura 18 es un ejemplo de espectros positivos ESI de una serie de metilación de clase LPOA asignada exclusivamente a AG-3FL. Los 2 picos que se muestran tienen fórmulas moleculares calculadas que están dentro de ± 0.1 ppm de error, en comparación con el m/z medido. La diferencia de masa medida entre los 2 picos en la Figura 3 (222.18286 - 222.14644) es 0.0364, que es un sello distintivo del reemplazo de O/CH₄. La estructura real de las fórmulas moleculares no puede determinarse ya que hay muchos isómeros posibles.

Comparado con los espectros crudos, los diagramas de Van Krevelen son una representación visual más conveniente de los datos FTICR-MS. Cada punto en un diagrama de Van Krevelen representa una fórmula molecular con una relación H:C y O:C definida. La Figura 19A muestra un diagrama de Van Krevelen de AG-3FL como se describe en este documento. En la figura 19B, se muestra un diagrama de Van Krevelen que incluye datos de AG-3FL, AG-3FL prea Edad y tipos de muestra HA. Se define la región LPOA, que contiene la mayoría de las fórmulas moleculares únicas asignadas a AG-3FL.

Conclusión

La resolución ultra alta y la precisión de masa de FTICR-MS han permitido la identificación de fórmulas moleculares entre m/z 120-500 en tres lotes representativos de AG-3FL pre-envejecido, AG-3FL y HA. Al asignar fórmulas moleculares que están consistentemente presentes en los 3 lotes para cada tipo de muestra, se caracterizaron las muestras. Los resultados muestran que Ag-3FL y AG-3FL Pre-Envejecido tienen menos fórmulas moleculares asignadas y porcentajes de clasificación de compuestos muy diferentes en comparación con HA. Además, AG-3FL tiene más fórmulas moleculares asignadas en comparación con AG-3FL pre-envejecido. Finalmente, aunque los porcentajes de clasificación de los compuestos eran algo similares en AG-3FL y AG-3FL pre-envejecidos, 441 fórmulas moleculares únicas se asignan a AG-3FL, de las cuales más de la mitad son de la clase LPOA. Como puede verse en la Figura 19B, la composición molecular del AG-3FL envejecido es diferente tanto del AG-3FL envejecido como del ácido húmico (HA). Se contempla que al menos algunos de los efectos beneficiosos del material semi-húmico descritos en la presente memoria se deben a la composición molecular del AG-3FL envejecido.

Referencias

1. Marshall, Alan G., Christopher L. Hendrickson, y George S. Jackson. " Espectrometría de masas de resonancia de ciclotrón de iones de transformada de Fourier: una cartilla." *Mass spectrometry reviews* 17.1 (1998): 1-35.
2. Stubbins, Aron, y compañeros. " Oscuridad iluminada: las firmas moleculares del río Congo disolvieron la materia orgánica y su alteración fotoquímica como lo revela la espectrometría de masas de precisión ultraelevada." *Limnology and Oceanography* 55.4 (2010): 1467-1477.
3. Oliveros, J. C. (2007-2015) Venny. Una herramienta interactiva para comparar listas con los diagramas de Venn. <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.htm>
4. Ikeya, Kosuke, y compañeros. "Caracterización de la composición química de los ácidos húmicos del suelo utilizando espectrometría de masas por resonancia de ciclotrón de iones de transformada de Fourier." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 153 (2015): 169-182.
5. Kim, Sunghwan, Robert W. Kramer, y Patrick G. Hatcher. " Método gráfico para el análisis de espectros de masas de banda ancha de resolución ultra alta de materia

orgánica natural, el diagrama de van Krevelen." *Analytical Chemistry* 75.20 (2003): 5336-5344.

Ejemplo 3: Volatilización de amoníaco y mineralización de nitrógeno

Se desarrolló un ensayo de cámara de suelo dinámico y cerrado para medir tanto la volatilización del amoníaco del suelo como el contenido de nitrógeno mineralizado en el suelo. Varios tratamientos se combinaron con urea, se aplicaron a tasas relevantes de campo y se evaluaron.

Métodos

Se preparó una formulación que contenía AG-3FL de la siguiente manera:

Nombre	Materiales constituyentes (por peso)
SP-4	5% de Ag-3FL 95% de SP-1

Se tamizaron 100 gramos de suelo de Limo arcilloso Panoche con una densidad aparente de aproximadamente 1,4-1,6 g/cm³ y se colocaron en un recipiente hermético provisto de un septo.

Se utilizó una trampa de ácido bórico con indicador para recolectar amoníaco libre.^{1,2,3} El flujo de aire en el sistema se controló cuidadosamente para garantizar la consistencia. La Figura 6 describe el aparato de cámara de suelo.

Se añadieron 10 ml de agua al suelo en cada cámara y se dejó incubar durante 2 días. A continuación, se aplicaron tratamientos experimentales a las cámaras de suelo por triplicado. Cada 48 horas la trampa de ácido se tituló con HCl diluido para determinar la cantidad de volatilización de amoníaco.^{1,2,3} Una vez que la volatilización del amoníaco se redujo a un índice insignificante, los suelos de cada experimento triplicado se combinaron, congelaron y enviaron a un laboratorio analítico para cuantificación de nitrato.

Resultados

Volatilización del Amoníaco del Suelo y Mineralización de Nitrógeno

Las tasas de aplicación por diseminación utilizadas en el ensayo se muestran en la Tabla 8. Se utilizó un total de 33,70 L/ha de cada tratamiento y 168.128 de Urea-Nitrógeno por

hectárea para representar las tasas de campo esperadas. El volumen total aplicado a cada cámara de suelo por tratamiento fue de 15 ml y cada tratamiento se realizó por triplicado.

Tabla 8

Tratamiento	Velocidad de tratamiento	Relación de urea	Tipo de aplicación
Sólo urea	--	168,128 kg de Urea-N/ha	diseminación
Urea + SP-4	33,70 L/ha	168,128 kg. de Urea-N/ha	diseminación
Urea + SP-1	33,70 L/ha	168,128 kg. de Urea-N/ha	diseminación

Los resultados en la Figura 7 muestran que los tratamientos con Urea + SP-4 y Urea + SP-1 tienen menos nitrato en el suelo después de 216 horas (9 días), en comparación con el tratamiento con Urea. Por otro lado, la volatilización de amoníaco de los tratamientos Urea + SP-4 y Urea + SP-1 es casi igual al tratamiento con urea.

Conclusión

Las tasas de aplicación por diseminación de SP-4 y SP-1 aplicadas con urea reducen las concentraciones de nitratos del suelo en más del 8% después de 216 horas (9 días), en comparación con la urea sola.

Referencias

1. Miles, D. M., y compañeros. "Instrumentación para evaluar las diferencias en la volatilización de amoníaco de la hojarasca y la torta de pollos de engorde." *The Journal of Applied Poultry Research* 17.3 (2008): 340-347.
2. Cruz, Gregorio. "el ácido bórico en el análisis Kjeldahl." *Journal of Chemical Education* 90.12 (2013): 1645-1648.
3. Soares, Johnny Rodrigues, Heitor Cantarella, y Marcella Leite de Campos Menegale. "Pérdidas de volatilización de amoníaco de la urea aplicada en superficie con inhibidores de ureasa y nitrificación." *Soil biology and biochemistry* 52 (2012): 82-89.

Ejemplo 4: Cambos en la evolución del dióxido de carbono y la inmovilización de nitrógeno con el tratamiento

a. Materiales y métodos

El suelo superficial se recolectó en tierras agrícolas cultivadas. Se eligió este suelo porque representa un suelo típico utilizado para la producción de cultivos en los EE. UU. Se recogió la arcilla de la Tranquilidad y una vez secada al aire, se pasó a través de una malla de 2 mm (malla 10). Todo el suelo se homogeneizó en un mezclador de cemento con el mismo peso de arena fina para aumentar el drenaje. Antes de pesar la tierra en tazas individuales, se colocó arena GRUESA de 0,3175 cm (85 g) (HCl lavado) en un papel de filtro Whatman Fast Flo en la parte inferior de la taza y un filtro de café de celulosa entre arena gruesa y tierra (las tazas son unidades de filtro de vacío Nalgene Rapid Flow de 500 mL con la membrana fina eliminada de cada uno) Luego se empaquetaron 435 g de tierra en tazas en la línea de 350 ml para una densidad aparente de 1,33 g/cc. Se añadió tierra en 4 incrementos de 109 gramos y una vez que se empaquetó con un mortero de poliacrilato, la superficie se agitó ligeramente (se escarificó) antes de que se añadiera el siguiente incremento de 100 g.

Antes de comenzar los experimentos de incubación, las muestras se preacondicionaron con 130 ml de CaCl_2 0,01 M y se incubaron a 25 °C durante 5 días. Las tapas se colocan sobre las copas, pero se apoyan en el borde para permitir el flujo de aire en cada día de evaluación durante 3 horas. Todas las copas se lixiviaron con 400 ml de solución de CaCl_2 0,01 M después de 5 días de incubación y se dejaron drenar durante 2 días antes de aplicar los tratamientos.

Los tratamientos se enumeran a continuación:

- 1) Control solo de agua
- 2) N @ 45,3592 kg de sulfato de amonio
- 3) SP-4 @ 10 gpa + 45,3592 kg de N de sulfato de amonio

Ambos tratamientos se mezclan con agua desionizada. Ni agua ni N, solo el control, recibieron algún otro material, sino que se mezclaron y se tomaron muestras exactamente como el suelo tratado. Cada tratamiento fue replicado 2 veces. Cada taza tiene una superficie de 0,0075251462 metros cuadrados $\approx$ 0.0000014332 ac. Los tratamientos se agregaron en un volumen total de 20 ml de solución a la parte superior de las copas, se dejaron en remojo durante 1 hora y luego se mezclaron en la parte superior de 2,54 cm de tierra.

Las "sondas de CO_2 Sol Vita" comerciales se colocaron en 2 réplicas idénticas de copas similares para cada tratamiento, se cubrieron con una tapa hermética y se sellaron con cinta aislante alrededor de las tapas para un sello hermético. Cada sonda se eliminó después de 24 horas y la lectura de las sondas se realizó de inmediato. Todas las copas se dejaron abiertas 30 minutos para el intercambio de aire con las condiciones ambientales, luego se insertaron nuevas

sondas, se cubrieron y se sellaron. Esto se repitió para cada uno de los primeros 6 días del experimento.

Se tomarán muestras de tierra en tazas a los 0, 3, 7, 10, 14 días después del tratamiento para NO_3 y NH_4 . Después de cada semana, se reemplazaron 20 ml de agua DI para cubrir la pérdida por evaporación en los últimos 7 días. Las muestras de suelo se llevaron a un laboratorio comercial el día en que se tomaron muestras de las tazas y se secaron a 130° . El nitrato y el amonio se extrajeron con KCl 2M y se analizaron a través de un analizador de inyección de flujo.

Resultados y discusión

Con solo 2 réplicas, los resultados fueron más variables que los preferidos, pero aún así mostraron relevancia estadística al nivel $P = 0.10$ y/o fuertes tendencias numéricas. Significativamente se emitió más CO_2 a través de la respiración microbiana en las copas tratadas SP-4 + N que en el fertilizante solo durante los 6 días de la prueba, Figura 8. Esto es un aumento del 25.9% que muestra una estimulación decidida del tratamiento. El CO_2 alcanzó un máximo de 4 DAT con el tratamiento SP-4. Hubo un aumento del 60% en CO_2 evolucionado en este pico de lectura. El aumento de CO_2 medido indica un mayor crecimiento microbiano que requiere N adicional para los microbios.

Los resultados del análisis de N en suelo se correlacionaron con los aumentos de CO_2 , como se muestra en la Figura 9. En el muestreo de 7 días, el nitrato con el tratamiento SP-4 fue significativamente menor que el fertilizante solo. El amonio también se redujo con el tratamiento SP-4, coincidiendo con el aumento de la actividad microbiana. Esto se espera cuando aumenta el crecimiento microbiano, puesto que los microbios sacan el nitrógeno del suelo para su metabolismo (inmovilización). A los 10 días, el amonio todavía estaba un poco por detrás del nivel de fertilizante y el nivel de nitrato había aumentado ya que los microbios del suelo ahora tienen más N disponible para mineralizar de lo que se había inmovilizado en los primeros días después del tratamiento. Los niveles de nitrato y amonio son iguales a los 14 días después del tratamiento, por lo que no hay falta de nitrógeno disponible para el cultivo.

Ejemplo 5: Efectos de NDRS en los niveles de fósforo (P) y nitrógeno en el suelo superficial

Se encontró que la probabilidad de escurrimiento del fósforo del suelo está estrechamente correlacionada con las pruebas estándar de suelo agrícola apropiadas para el rango de pH del suelo (Bray u Olsen). Recientemente se descubrió que el contenido de P en los 2 cm superiores

de suelo predijo la cantidad de fosfato reactivo disuelto (DRP o escorrentía P) en la escorrentía (Bundy, sin fecha). En este ejemplo, estos métodos se usaron para probar el efecto de la composición como se describe aquí en la escorrentía de fósforo.

Métodos

Suelo arcilloso de Tranquility se tamizó a 2 mm y se mezcló muy bien con un peso igual de arena fina para un mejor drenaje. Se colocaron arena gruesa y un filtro de celulosa en el fondo de cada copa para el flujo de aire. Las tazas son unidades de filtro de vacío de 500 ml Nalgene Rapid Flow. El suelo se empaquetó en tazas con un mortero para lograr una densidad aparente de 1,4 g/cc.

Antes de agregar tratamientos, las muestras se preacondicionaron con CaCl_2 0,01 M y se incubaron a 25°C durante 7 días.

Todos los tratamientos se agregaron a una superficie del suelo rugosa a 1 cm.

Los tratamientos, replicados 3 veces fueron los siguientes:

- 1) Sin control de fertilizante (1000 gpa de agua)
- 2) 18-46-0 @ 560.426 kg/ha (100.877 kg N y 112,085 kg P/ha respectivamente) luego 1000 gpa de agua
- 3) SP-4 5 gpa + 995 gpa de agua sobre 18-46-0 a 560,426 kg/ha
 1. Se molieron 0,42 g de pepitas 18-46-0 por cada taza en un molinillo de café portátil hasta obtener un polvo fino medio.
 2. Los gránulos de fertilizante en polvo se extendieron uniformemente sobre la superficie del suelo para los Tratamientos 2 y 3.
 3. Para los Tratamientos 1 y 2, el agua desionizada solo a 7,03 ml/taza (1000 gpa) se extendió uniformemente sobre la superficie del suelo.
 4. El agua desionizada se mezcló con SP-4 para el Tratamiento 3 y se aplicó como el N° 3 anterior.
 5. Los tratamientos se sentaron en el suelo durante 18 horas, luego comenzaron las aplicaciones de agua (6 a continuación).
 6. Para simular una fuerte lluvia, se aplicó una solución diluida de sal de cloruro mezclada (K, Mg, Na) en 5 incrementos durante 2 horas. Los 300 ml utilizados para cada taza se aproximaron a 6,35 cm de lluvia.

7. Los suelos se dejaron equilibrar y secar durante 48 horas.
8. Para tomar una muestra, las copas se invirtieron en papel de cera y luego se enderezaron para cada uno de los tres incrementos de profundidad de 2 cm para ser removidos del que estaba debajo.
9. Cada uno de los 3 segmentos de profundidad del suelo se analizó para fosfato-P mediante la extracción de NaHCO_3 (Olsen).

Los resultados del análisis de suelo (Figura 10) indican que SP-4 redujo significativamente las cantidades de fósforo de la prueba del suelo de la superficie de 2 cm de suelo en comparación con el tratamiento de fertilizante único. Se ha demostrado que esta prueba está altamente correlacionada con el "fósforo reactivo disuelto", que es el principal problema para los ríos y lagos. La superficie inferior de 2 cm del suelo P indica un potencial de escurrimiento de P reducido. Se contempla que la unión/interacción química entre el SP-4 y el fertilizante P aumenta la movilidad de P en el suelo, donde se considera ampliamente que es inmóvil. El aumento de la movilidad del fósforo aumentaría su movimiento hacia el suelo con agua. Además, una cantidad estadísticamente significativa del fertilizante P se redistribuyó a 2-4 cm de profundidad, donde se reconoce que no es un problema importante de escorrentía. El nivel de P con el tratamiento SP-4 en el nivel de 4-6 cm también se incrementó frente al tratamiento solo de fertilizante. Nuevamente demostrando que el fertilizante P se movió por debajo de la profundidad susceptible de escorrentía con la aplicación SP-4. Ambos tratamientos con fertilizante mostraron un aumento significativo del control de agua. El análisis de laboratorio realizado no es suficiente para un cálculo del balance de masa de todo el fertilizante P ya que solo mide el P soluble y ligeramente soluble (grupo lábil). Se contempla que la adición de SP-4 al fertilizante P puede hacer que P se mueva hacia abajo desde el punto de aplicación y/o que se cambie su solubilidad. La reducción del 18% de fósforo en su ubicación y forma lista para salir del campo es significativa.

Se observaron resultados similares con amonio, Figura 11, extraídos con KCl 2M. Los datos de laboratorio indican que el SP-4 eliminó cantidades significativas de amonio del suelo superficial en comparación con el tratamiento con fertilizantes solamente. Al igual que con el fósforo, esto reduce el potencial de escorrentía de N. El amonio no se considera fácilmente lixiviable hacia abajo desde la superficie del suelo debido a su interacción con los sitios de intercambio de cationes en las partículas del suelo. Se contempla que la unión de SP-4 al amonio y, por lo tanto, limitar las interacciones del sitio de intercambio es la forma más razonable de lograr una reducción del 36% en el nivel promedio de amonio en la superficie del suelo. Parte

del fertilizante N también se redistribuyó a una profundidad de 2-4 cm, donde se reconoce que no es un problema importante de escorrentía. Los niveles de N con el tratamiento son significativamente más altos que los fertilizantes solamente. El nivel de N del tratamiento en el nivel de 4-6 cm fue elevado en comparación con el estándar y el control del agua.

Al final de este experimento, la nitrificación significativa del fertilizante N aún no había comenzado. Los niveles de nitrato en el suelo no mostraron diferencias entre los tratamientos en cualquiera de las 3 profundidades.

El rendimiento de SP-4 para reducir tanto el fosfato como el amonio en la profundidad susceptible de 0-2 cm más propensa de la columna de suelo es un fuerte indicador de su capacidad para reducir la escorrentía de fertilizantes por lluvias intensas o riegos en situaciones de campo.

Referencias

Bundy, L.G. (Sin fecha). http://www.soils.wisc.edu/extension/materials/P_Understanding.pdf

Ejemplo 6: experimentos de campo en maíz para medir el contenido de gas de amoníaco y nitrógeno de grano

Este experimento de campo involucró al maíz cultivado en el campo utilizando prácticas agrícolas estándar usadas en la agricultura de producción, tratadas con materiales que contienen la nueva sustancia a diferentes tasas y nitrógeno ureico a diferentes tasas. Se evaluaron las variables de respuesta relacionadas con la pérdida o conservación de nitrógeno en el sistema suelo-planta, incluyendo NH_3 desarrollado a partir del suelo, NO_3^- , NH_4^+ en el suelo, así como el contenido de nitrógeno en la biomasa y el grano del maíz.

El maíz se sembró en hileras espaciadas 76,2 centímetros en el centro del campo durante la primavera de 2015 en Ohio (OH) y Wisconsin (WI). En el sitio de Ohio, los suelos consistían predominantemente en un lodo limoso Crosby con una representación menor de una marga arcillosa limosa Brookston. En el sitio de Wisconsin, los suelos consistían predominantemente en un marga arcillosa limosa de Milford y una marga limosa Del Rey. Después de la siembra y antes de la aparición del maíz, se realizó una aplicación superficial mediante rociado en el suelo de SP-4 y una solución de urea preparada disolviendo urea en agua en todas las combinaciones a las siguientes velocidades:

- 1) N = 0, 70,0532, 98,075 kg N/ha, aplicado como urea disuelta en agua; y
- 2) SP-4 = 0, 14,04, 28,08, 56,1682 L/ha.

Cuando el maíz alcanzó la etapa de seis hojas (V6), los mismos tratamientos se repitieron como un rocío sobre la superficie del suelo. Hubo 12 tratamientos en total, y la cantidad total de nitrógeno y SP-4 en cada tratamiento varió de 0 a 196,149 kg/ha y de 0 a 112,336 L/ha, respectivamente. El tamaño de la parcela era de 4,572 metros x 15,24 metros y cada tratamiento se replicó cuatro veces en un diseño de bloques completos al azar. Otros métodos de gestión de campo siguieron las mejores prácticas estándar en uso por los agricultores en cada ubicación.

En el sitio de Ohio, se midió la volatilización de NH_3 en el tratamiento con urea de 196,149 kg N/ha, con y sin SP-4, un día después de la aplicación, usando tubos Drager (Anónimo, 2011) y una modificación de los métodos descritos por Pacholski y compañeros, 2006, y Watkins, 2013. Las copas invertidas colocadas en la superficie del suelo se usaron para recolectar gas evolucionado. Cada evento de muestreo usó dos tazas para recolectar la volatilización de amoníaco (NH_3) durante un período de 24 horas en cada parcela. Después de 24 horas, se realizó una medición de la concentración de NH_3 en la copa. La concentración se promedió entre las dos copas para producir un valor medio de volatilización, en ppm, para cada parcela.

En el sitio de Wisconsin, en la madurez del grano de maíz, el grano se cosechó desde la mitad de la parcela con una cosechadora. Se analizó y registró el contenido de nitrógeno en el grano en kg N/ha. El contenido de N en el grano cosechado se calculó midiendo el porcentaje de nitrógeno en el grano y multiplicando por el rendimiento del grano para cada tratamiento.

El análisis de varianza (ANOVA) se realizó utilizando el software estadístico Minitab en cada variable de respuesta.

Una reducción en la volatilización de NH_3 se asoció con un tratamiento SP-4 de 56,17 L por ha, como se muestra en la Figura 12. En el control, la concentración media de NH_3 en la superficie del suelo fue de 5.51 ppm, pero cuando se trató con SP-4, la concentración fue de 4.28 ppm, una reducción del 22% cuando se aplicó SP-4. El valor p calculado por ANOVA fue $p = 0.2$. Este resultado respalda la afirmación de que Ag-3FL reduce las pérdidas de nitrógeno debido a la volatilización de amoníaco.

El contenido de nitrógeno en el grano se muestra en la Figura 13. Hubo un aumento lineal en el contenido de nitrógeno del grano en kg por ha con una tasa creciente de SP-4. En comparación con el control de urea solamente, la tasa más alta de SP-4 se asoció con un aumento de 22,305 kg de N por ha en el grano de maíz. Este resultado fue estadísticamente significativo al nivel del 5%.

Referencias

Anónimo. 2011. Drager-tubes y Manual CMS. Drager Safety AG & Company. Lubeck, Alemania.

Pacholski, A., G. Cai, R. Nieder, J. Richter, X. Fan, Z. Zhu y M. Roelcke. 2006. Calibración de un método simple para determinar la volatilización de amoníaco en el campo - mediciones comparativas en la provincia de Henan, China. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 74: 259–273.

Watkins, P.H. 2013. Manejo de nitrógeno en maíz: Influencias de las aplicaciones de nitrato de amonio y urea (UAN) con y sin productos estabilizadores de nitrógeno (Universidad de Maryland, tesis de maestría).

Ejemplo 7: Experimento de campo en suelo sin cultivo para medir transformaciones de nitrógeno y lixiviación

Este experimento se realizó en un campo cultivado sin maíz u otras plantas en crecimiento. De esta manera, los efectos de Ag-3FL en la prevención del agotamiento de nutrientes de los suelos podrían examinarse sin el factor adicional de un crecimiento del cultivo y la absorción asociada de nutrientes. La intención era observar las tasas variables de Ag-3FL y nitrógeno, manteniendo constante la relación entre ellas.

Diseño experimental

El experimento se realizó en un campo en Sheridan, Indiana. Hubo cinco tratamientos.

1. Solo agua (control)
2. 44,93 L/ha de agua con 112,085 kg de urea N/ha (tasa baja)
3. 44,93 L/ha de SP-4 con 112,085 kg de urea N/ha (tasa baja)
4. 1123,36 L/ha de SP-4 con 2802,128 kg de urea N/ha (tasa alta)
5. 1123,36 L/ha de agua con 2802,128 kg de urea N/ha (tasa alta)

La baja tasa de urea N se ubicó en el rango de una tasa de emisión estándar de nitrógeno para cultivos de campo, particularmente para una aplicación dividida. La alta tasa fue pensada para simular la tasa que se puede encontrar en una aplicación por franjas, donde el agricultor aplica el líquido en una franja estrecha, lo que aumenta la concentración en la franja. En las dos tasas de urea N, la relación de SP-4 a urea N se mantuvo constante.

El diseño experimental fue un diseño de bloques completos al azar con 4 repeticiones. Antes de la aplicación, el suelo se labraba como si se estuviera preparando para la siembra de maíz, pero el experimento se mantuvo libre de cultivos y libre de malezas. El tamaño de la parcela era de 1,8288 metros x 3,048 metros con buffers de 4 pies entre cada tratamiento. Dentro de cada parcela, se aplicaron 2 franjas de aplicación líquida a la superficie del suelo a una tasa designada. Las franjas se aplicaron con una pluma portátil con 2 boquillas espaciadas a 152,4 centímetros. Cada franja tenía 3,048 metros de largo. Debido a las condiciones de suelo seco, el día tres se aplicó una única precipitación simulada de 0,635 centímetros a cada parcela con un aspersor portátil y un sistema de medición.

Mediciones

Mediciones de gas NH_3 . La volatilización de NH_3 se midió en cada gráfico a los diez días después de la aplicación para evaluar las diferencias en la concentración de NH_3 en la superficie del suelo, usando el mismo método que el descrito en el Ejemplo 6.

Núcleos del suelo. Los núcleos de suelo se tomaron a 0-10,16 cm de profundidad en cada parcela en el pretratamiento, luego a 1, 2, 3, 4, 5 y 8 semanas después de la aplicación. Para cada evento de muestreo, se tomaron 3 núcleos (un compuesto de ambas franjas) y se combinaron en una muestra in situ para cada parcela. Estas muestras se congelaron y luego se analizaron para la concentración de nitrato (NO_3^-).

Mediciones de lixiviación de nitrato utilizando lisímetros. Se instalaron un total de 36 lisímetros (Soilmoisture Equipment Corporation, Goleta, California). En cada parcela se instalaron 2 lisímetros, cada uno en una ubicación aleatoria a lo largo de cada franja de aplicación, a excepción del tratamiento de control, donde solo se instaló un lisímetro por parcela. La profundidad del lisímetro en el punto de muestreo fue de 25,4 centímetros debajo de la superficie del suelo. Hubo ocho eventos de muestreo total durante las nueve semanas posteriores a la solicitud. Durante cada evento de muestreo, se aplicó vacío a cada lisímetro a 60 centibares, luego 48 horas más tarde se recogió el lixiviado líquido y se analizó para NO_3^- . Debido a que los volúmenes de lixiviados dependen de la lluvia y la cantidad de agua del suelo, no se pudieron extraer volúmenes de muestra adecuados durante cada evento de muestreo semanal. Se obtuvieron muestras adecuadas entre los tratamientos en las semanas 1, 3 y 9. Esto se atribuyó a la falta de lluvias significativas durante la parte media del experimento. Cada submuestra se analizó por separado, y los promedios de la gráfica se utilizaron para los análisis estadísticos. Cuando los valores de ANOVA fueron significativos, se utilizó la prueba de LSD de Fisher para evaluar las diferencias entre los medios de tratamiento.

Resultados

La Figura 14 ilustra la reducción en la liberación de gas NH_3 asociada con SP-4. Mientras que la concentración de NH_3 en la superficie del suelo en el tratamiento control fue de 3.75 ppm, en el tratamiento SP-4, fue de 2.08, una reducción del 45% en la pérdida de NH_3 . Este resultado fue significativo por ANOVA ($p = 0.03$). Esto respalda la afirmación de que Ag 3FL está asociado con una reducción en las pérdidas de nitrógeno debido a la volatilización de amoníaco.

Con respecto a la reducción en el NO_3 del suelo (Figura 15), durante las primeras 1-2 semanas después de la aplicación, los niveles de nitratos del suelo fueron similares entre los tres tratamientos. A medida que avanzaba la nitrificación, los dos tratamientos que contenían urea mostraron niveles aumentados de NO_3 en el suelo en comparación con el tratamiento con SP-4. En la semana 4 y la semana 8, el tratamiento con SP-4 tuvo niveles de nitratos del suelo significativamente menores frente a la urea sola ($p \leq 0.05$, $p \leq 0.18$, respectivamente), mientras que en la semana 5, no fueron significativamente diferentes.

Los resultados del muestreo de suelo representados en la Figura 15 mostraron que las concentraciones de nitrato SP-4 en las semanas 4 y 8 fueron aproximadamente 20 ppm menores que las del tratamiento con urea solamente, una reducción del 25% o más. El hecho de que el efecto no fue significativo en la semana 5 parece debido a la variabilidad en el resultado SP-4. Esto respalda la afirmación de que Ag-3FL está asociado con la reducción en los niveles de nitratos del suelo y, por lo tanto, la reducción de las pérdidas por lixiviación del nitrato en el suelo.

Con respecto a la lixiviación de nitratos, las muestras de las semanas 1 y 2 no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. Esto se juzgó debido al tiempo requerido para que la urea se convierta en nitrato y luego se mueva hacia abajo en el perfil del suelo. Sin embargo, en la semana 9, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos Figura 16. La concentración media de nitrato para el tratamiento de control (sin aplicación de urea o SP-4) fue de 106 ppm, mientras que el nivel de la tasa baja de urea con SP-4 fue de 170 ppm. Estos dos valores no fueron significativamente diferentes según la prueba de Fisher. A una baja tasa de urea, el tratamiento SP-4 redujo significativamente la lixiviación de nitratos de 320 ppm a 170 ppm, mientras que a una alta tasa de urea, SP-4 nuevamente se asoció con una lixiviación reducida (413 ppm con SP-4 frente a 525 ppm sin), también un resultado estadísticamente significativo. Estos resultados respaldan la afirmación de que AG-3FL reduce la lixiviación de nitratos en suelos agrícolas.

Ejemplo 8: Efecto de AG-3FL y SP-4 en pozos de nitrógeno en el suelo

Los efectos de AG-3FL y SP-4 sobre la concentración de nitratos del suelo y el carbono de biomasa microbiana se probaron en un entorno controlado. Se contempló que una aplicación única de AG-3FL o SP-4, combinada con fertilizante de nitrógeno, reduciría la concentración de nitrato del suelo debido a la acumulación temporal de N como resultado de una mayor biomasa microbiana del suelo.

Materiales y métodos

Se realizó una incubación de laboratorio de bioensayo durante el cual se agregó un fertilizante de nitrógeno (sulfato de amonio equivalente a $112,085 \text{ kg N ha}^{-1}$) en un suelo preacondicionado (14 días), en comparación con el mismo suelo aplicado con la misma cantidad de fertilizante N, más AG-3FL a $2,25 \text{ L/ha}$ o SP-4 a $44,93 \text{ L ha}^{-1}$ (tres tratamientos en total). El experimento incluyó cuatro réplicas por tratamiento. Los tratamientos se mezclaron con tierra, se colocaron en tazas pequeñas y las muestras se incubaron a 23°C . Las submuestras se tomaron los días 7, 14, 28 y 42 después de la aplicación y se midieron las concentraciones de nitrato y carbono de biomasa microbiana en el suelo. La biomasa microbiana se midió mediante el método de extracción de fumigación con cloroformo.

Resultados y discusión

A los 7 días después de la aplicación, la concentración de nitrato del suelo asociada con el tratamiento AG-3FL fue de $74,2 \mu\text{g NO}_3^- \text{-Ng suelo}^{-1}$, una reducción significativa ($p = 0,10$) en comparación con el control de solo N, que tenía una concentración media de nitrato de $82,1 \mu\text{g NO}_3^- \text{- N g suelo}^{-1}$. Esto representó una reducción del 9,6% en la concentración de nitrato del suelo asociada con AG-3FL (Figura 20A). Además, a los 14 días después de la aplicación, AG-3FL se asoció con un aumento del 73% en el carbono de biomasa microbiana. El resultado del tratamiento con N^+ AG-3FL fue de $158,6 \mu\text{g-C g de suelo}^{-1}$, mientras que el resultado del tratamiento con solo N fue de $91,6 \mu\text{g-C g de suelo}^{-1}$ (Figura 20B).

En el mismo experimento, 14 días después de la aplicación, la concentración de nitrato del suelo asociada con el tratamiento SP-4 fue de $77,9 \mu\text{g NO}_3^- \text{- Ng suelo}^{-1}$, en comparación con el control solo N, que tenía una media de $89,8 \mu\text{g NO}_3^- \text{- Ng suelo}^{-1}$, una reducción del 13,3%, que fue significativa a $p = 0,10$. En la misma fecha de muestreo, SP-4 se asoció con un aumento significativo ($p = 0,10$) en el carbono de biomasa microbiana. La media del carbono de biomasa microbiana fue $130,9 \mu\text{g-C g suelo}^{-1}$ en el tratamiento SP-4 vs. $91,6 \mu\text{g-C g suelo}^{-1}$ en el tratamiento de N solamente (Figura 21A y 21B), un aumento de 43%. Este estudio apoya la

hipótesis de que el mecanismo para reducir las concentraciones de nitratos en el suelo fue el aumento de la inmovilización microbiana del nitrato del suelo.

Ejemplo 9: Efecto en los niveles de nitratos y lixiviación de nitratos en tierra no cultivada

Lo siguiente muestra el efecto de dos composiciones descritas en este documento sobre los niveles de nitrato tanto en el suelo como en el lixiviado. Este experimento se realizó en un campo cultivado sin cultivos en crecimiento, por lo que los efectos de Ag-3FL y SP-4 podrían examinarse sin los efectos de un cultivo en crecimiento que afecta la respuesta cíclica al nitrógeno.

Diseño experimental

El experimento se replicó en dos ubicaciones (Frankfort, IN y Sheridan, IN). Los siguientes tres tratamientos fueron empleados:

1. Solo agua (control)
2. 112,085 kg de nitrato de amonio y urea (UAN) N/ha
3. 112,085 kg UAN N/ha con 11,3652 L SP-4/45,3592 kg N

El diseño experimental fue un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Antes de la aplicación, el suelo se labraba como si se estuviera preparando para la siembra de maíz. Las parcelas se mantuvieron libres de vegetación durante todo el experimento. El tamaño de la parcela era de 1,8288 metros x 4,572 metros con buffers de 1.2192 metros entre las parcelas. Dentro de cada parcela, dos franjas de aplicación líquida, cada una de 25,4 centímetros de ancho, se aplicaron con una pluma manual con dos boquillas espaciadas a 152,4 centímetros de distancia y recorrieron los 4,572 metros de longitud de la parcela. No se aplicó riego y la única agua que recibió el experimento provino de la lluvia ambiental que se registró diariamente.

Metodologías

Núcleos del suelo

Los núcleos de suelo se tomaron a dos profundidades, de 0 a 10,16 y de 10,16 a 20,32 centímetros, en cada parcela en el pretratamiento, y luego semanalmente durante 10 semanas después de la aplicación. En cada evento de muestreo, se tomaron seis núcleos (un compuesto de ambas franjas en cada parcela) y se combinaron en una muestra in situ para cada parcela en cada profundidad. Las muestras se congelaron inmediatamente y luego se analizaron para determinar

la concentración de nitrato. Un promedio de las dos profundidades fue el parámetro utilizado para el análisis.

Mediciones de lixiviación de nitrato utilizando lisímetros

Los lisímetros de succión (SoilMoisture Equipment Corporation, Goleta, California) se instalaron para medir el nitrato lixiviable. En cada parcela, se instalaron dos lisímetros, uno al azar a lo largo de cada franja de aplicación. La profundidad de los lisímetros era de 25,4 centímetros debajo de la superficie del suelo, con la ventosa colocada directamente debajo de la franja de aplicación. Se recogieron muestras después de eventos de lluvia lo suficientemente significativos como para producir un volumen suficiente de lixiviado. Durante cada evento de muestreo, se aplicó vacío a cada lisímetro a 60 centibares, luego 24 a 48 horas después, se recogió el lixiviado líquido y se analizaron los nitratos. Cada submuestra se analizó por separado, y los medios de la gráfica se utilizaron para los análisis estadísticos.

Mediciones de volatilización

La volatilización del gas NH_3 y NO_x se midió usando el método del tubo Drager descrito en el Ejemplo 5.

Análisis estadístico

Los resultados para el suelo y el nitrato de lixiviado se analizaron en un ANOVA de medidas repetidas y se empleó la prueba LSD de Fisher para evaluar las diferencias entre los medios de tratamiento.

Resultados

Ambas concentraciones de nitrato del suelo y lixiviados se redujeron cuando SP-4 se aplicó con UAN. Los datos del suelo de Frankfort, IN encontraron que la adición de SP-4 se asoció con una disminución del 12,3% en las concentraciones de nitratos en el suelo. Como se ilustra en la Figura 22, los promedios de nitratos del suelo durante la temporada para UAN y UAN + SP-4 (11,36 L) fueron 52.2 y 45.8 ppm, respectivamente. Esta diferencia se mantuvo durante la temporada de crecimiento ($P < 0.01$).

Los resultados de lixiviación medidos a partir de los lisímetros también muestran que SP-4 reduce las concentraciones de nitratos en el suelo y las pérdidas por lixiviación (Figura 23). En Sheridan, IN se encontró que la adición de SP-4 se asoció con una reducción del 27,2% en la concentración de nitratos en el lixiviado. Las concentraciones medias de lixiviados durante la temporada para UAN y UAN + SP-4 (11.36 L) fueron 85 y 61.9 ppm, respectivamente. Se

observaron eventos de lluvia significativos dentro de los siguientes dos meses. Después de ambos eventos de lluvia, el tratamiento que contiene SP-4 tuvo una menor concentración de nitratos que el control de UAN. Las concentraciones medias de nitratos a lo largo de todo el período de muestreo fueron significativamente menores con SP-4 ($P < 0.01$) que con el control UAN.

No se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos UAN y UAN + SP-4 para NH_3 o NO_x , por lo tanto, se concluyó que las reducciones de nitrato observadas no fueron influenciadas por las pérdidas gaseosas. Este ejemplo demuestra claramente que Ag-3FL y SP-4 reducen consistentemente y de manera efectiva las concentraciones de nitratos en el suelo, y reduce la lixiviación posterior en las aguas subterráneas en el suelo de un sitio agrícola. El efecto está claramente relacionado con las interacciones en el suelo asociadas con la aplicación SP-4.

Ejemplo 10: Efectos de SP-4 en el suelo y en la acumulación de nitrógeno en el maíz

Materiales y métodos

Selección de sitio y aplicación del tratamiento

Se seleccionaron campos de producción para ocho ubicaciones en Corn Belt. El tipo de método de aplicación de fertilización (difusión y/o acuchillado) difería un tanto en las ocho ubicaciones, de acuerdo con las prácticas locales. Casi todo el fertilizante de nitrógeno se aplicó en forma de nitrato de amonio y urea (UAN). Dos aplicaciones usaron urea como fuente de nitrógeno. La aplicación promedio de fertilizante N en las ocho ubicaciones fue de aproximadamente 201,753 kg N/ha. En el momento de la fertilización con nitrógeno, SP-4 se mezcló en tanque con la UAN en el sitio de acuerdo con la lista de tratamiento a continuación.

Tratamientos:

- 1) Prácticas estándar de cultivo (todas las prácticas de manejo, incluidas las tasas de fertilización nitrogenada, el manejo de plagas, etc., de acuerdo con la práctica local para la producción de maíz en cada sitio específico)
- 2) Prácticas estándar del cultivador + 11,3652 L de SP-4 por 45,3592 kg de nitrógeno aplicado
- 3) Prácticas estándar de cultivo + 11,3652 L de SP-4 por 45,3592 kg de nitrógeno aplicado

Muestreo de suelo

Una vez que se establecieron los límites de la parcela, se seleccionó un conjunto de 9 o 12 puntos, dependiendo de la ubicación, dentro de cada parcela de tratamiento en cada ubicación. El suelo se muestreó desde una profundidad de 0 a 15.24 centímetros dentro de 0.3048 metros o 0,6096 metros de cada uno de los puntos. El suelo de cada una de las ubicaciones de los puntos de tratamiento se mezcló para formar una muestra compuesta de suelo de cada tratamiento. Se tomó una muestra de suelo previa al tratamiento para cada tratamiento antes de cualquier fertilización para establecer las concentraciones de nitrato en el suelo (NO_3^-) y amonio (NH_4^+). Después de cada aplicación de fertilizante, los suelos se recogieron aproximadamente una semana después de la aplicación, y posteriormente cada dos o tres semanas durante la temporada de crecimiento desde las mismas ubicaciones marcadas para cada tratamiento. Las ubicaciones en las que se aplicaba una vestimenta lateral de mitad de temporada de UAN directamente en el suelo mediante un aplicador de cuchillas, se recolectaron muestras de suelo aproximadamente 5,08 centímetros a cada lado de la banda de aplicación. Las muestras de suelo compuestas se analizaron para la concentración de nitrato y amonio.

Determinaciones de la materia seca de la planta y del contenido de nitrógeno

Se recolectaron un total de 10 plantas de cada parcela en cada ubicación aproximadamente en la etapa R1 del maíz. Las plantas fueron recolectadas al azar a aproximadamente 3,048 metros de los puntos determinados para el muestreo del suelo. Las plantas individuales se separaron en tejidos de hojas, tallos y espigas para determinar la materia seca (MS). Luego, para cada tratamiento, en cada ubicación, se pesaron por separado las MS de cada tejido vegetal para las plantas colectivas. Tejidos de la hoja, el tallo y la espiga se cortaron en trozos pequeños y se homogeneizaron a fondo. Se recolectó una submuestra para cada uno de los tejidos cortados y luego se pesó. Las muestras se secaron y se registraron los pesos secos. Las muestras secas se trituraron y analizaron en porcentaje de nitrógeno para cada uno de los tejidos recogidos. Las ubicaciones individuales se muestrearon lo más cerca posible de la misma etapa de desarrollo de maíz en todas las ubicaciones. Los pesos individuales en seco para los tejidos vegetales individuales se sumaron para estimar el peso seco de una planta completa. La materia seca se multiplicó por la concentración de nitrógeno para calcular el contenido de nitrógeno.

Rendimiento de maíz

Se recolectó aleatoriamente una cosecha manual de 15 mazorcas por tratamiento para cada ubicación cerca de los lugares donde se recolectaron las muestras de la planta. Se tomaron aproximadamente cinco espigas de cada una de las ubicaciones de puntos desde el centro del campo. Las espigas se analizaron para determinar el número de filas por espiga y el número de

granos por fila para cada tratamiento. Esos valores se combinaron para determinar la cantidad de granos por espiga. Los granos fueron pelados de las mazorcas y pesados. Se analizó el porcentaje de humedad y el peso de prueba del maíz desgranado, ya que eso podría haber afectado el peso total del grano de las 15 espigas. Esto sirvió para estimar el rendimiento de maíz en cada parcela.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron como un diseño de bloques completos al azar por análisis de varianza (ANOVA), donde las ubicaciones individuales ($n = 8$) se consideraron replicaciones (tres tratamientos con ocho repeticiones cada uno). Cuando ANOVA detectó un efecto de tratamiento significativo, se utilizó la prueba LSD de Fisher para evaluar las diferencias entre los medios de tratamiento. Los datos se analizaron en Minitab 17.1.3.

Resultados y discusión

Nitrato, amonio y N mineral total en el suelo

En las ocho ubicaciones, las concentraciones máximas y estacionales de nitratos del suelo se redujeron ($p \leq 0.05$) en 31 y 11.4 ppm, respectivamente, en 11,36 L SP-4 por 45,36 kg de N aplicadas (Figura 24). los 5,68 L de SP-4 por 45,3592 kg N aplicado redujeron las tasas pico de nitrato ($p \leq 0.10$) en 21 ppm, mientras que el promedio largo de la temporada tuvo una reducción similar a la tasa de 11,36 L de SP-4, lo que se tradujo en una reducción del 15.1% y 22.7% en el momento pico de nitratos y una reducción promedio del 13% y 15.6% de la temporada de nitratos para las tasas de 5,68 y 11,36 L. Está bien documentado que las concentraciones de nitratos en el suelo están directamente relacionadas con la lixiviación de nitratos. El promedio de amonio durante la temporada no fue diferente para los tratamientos con SP-4 en comparación con el tratamiento estándar del cultivador (Figura 24). Por último, al determinar el nitrógeno mineral promedio en la temporada (nitrato + amonio), el modelo fue significativo a $p \leq 0.08$. Los tratamientos SP-4 fueron iguales o menores que el estándar del cultivador (Figura 24). Este N mineral en el suelo más bajo fue un resultado directo de los nitratos más bajos del suelo.

Contenido de MS y nitrógeno vegetal

En ocho lugares, cada uno de los tejidos vegetales individuales exhibió un aumento significativo en la materia seca. En otras palabras, las plantas de maíz fueron más grandes cuando las parcelas se trataron con SP-4 en ambas tasas. El estándar de cultivo promedió 134.1 g de materia seca planta⁻¹ promediada en todas las localidades en comparación con 153.4 y 163.4 g

de materia seca planta⁻¹ para las tasas de 5,68 y 11,36 L, respectivamente (datos no mostrados). Estos resultados fueron significativamente diferentes por ANOVA a $p \leq 0.05$.

Los tratamientos SP-4 también dieron como resultado un mayor contenido de N en los tejidos individuales como resultado directo del nitrógeno del suelo conservado y dio como resultado un aumento en la materia seca. Estas diferencias, cuando se combinaron a nivel de toda la planta, produjeron una diferencia de 2,7 g N planta⁻¹, un aumento del 19% sobre el estándar del cultivador (Figura 25).

Rendimiento del maíz

Cuando se promediaron las 15 espigas, las tasas SP-4 de 5,68 y 11, 36 L tuvieron un peso adicional de 0,27 y 0,38 kg ($p \leq 0,05$) que el estándar del cultivador debido a los granos adicionales llenados al final de cada fila (Figura 26). Esto representa un aumento de 8.4 y 11.9% sobre el estándar del productor.

Cuando se toman en conjunto, este ejemplo demuestra que, en ocho ubicaciones, el tratamiento con SP-4 resulta en concentraciones reducidas de nitratos en el suelo, un aumento significativo en el contenido de nitrógeno en la materia seca del maíz y un mayor crecimiento y rendimiento del maíz.

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:
Actagro, LLC

Application No.: 15/796,537

Confirmation No.: 8803

Filed: October 27, 2017

Art Unit: 1736

For: SEMI-HUMIC ORGANIC CARBON
MATERIAL AND METHODS OF USE
THEREOF

Examiner: Wayne A. Langel

DECLARATION OF TAHA REZAI UNDER 37 CFR § 1.132

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Commissioner:

I, Taha Rezai, hereby declare that:

1. I have been employed by Actagro, LLC as a Technology Director since 2012
2. I obtained my Ph.D. in Biochemistry from University of California at Santa Cruz.
3. I have more than 6 years of experience in the area of agricultural research and development.
4. A copy of my *curriculum vitae* is attached hereto as Exhibit 1.
5. I am an inventor on the U.S. patent application 15/796,537 (the '537 application) filed October 27, 2017, and I am familiar with the contents of the application.
6. I have reviewed the Office Action dated January 22, 2018.
7. I have read and am familiar with EP 0164908.

8. The following experiments were performed under my direction.

9. A composition prepared as described in Example 1 of the '537 application and a 45-day old sample of the composition obtained according to Example 1 of EP 0164908 were characterized and compared using Liquid Chromatography Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (LC-FTICR-MS). Liquid Chromatography Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (LC-FTICR-MS) is a tool for the molecular characterization of complex organic mixtures. The ultra-high mass resolution and mass accuracy of FTICR-MS allows for the identification of elemental compositions for thousands of species, with minimal sample preparation. For singly charged ions of <700 Da, unambiguous molecular formulas can be assigned directly from the measured mass if ~ 1 ppm mass accuracy can be achieved.

10. Composition 1 was prepared as described in Example 1 of the '537 application. A comparative composition was prepared as follows and according to Example 1 of EP 0164908 ("Comparative Composition"). Nine (9) parts leonardite ore and 75 parts water were combined then the mixture was heated to a temperature of 170-190°F, followed by the addition of 15 parts sodium gluconate. The resulting mixture was then mixed for five hours while a temperature of 170-190 °F was maintained. At the end of the mixing period, the mixture was allowed to settle for three days. The supernatant was then removed and allowed to settle a second time for a period of four days. After the second settling step, the supernatant was isolated and NaOH was used to adjust the pH of the resulting solution to 12.5 The Comparative Composition was then allowed to age for 45 days ("Aged Comparative Composition").

11. The Aged Comparative Composition was analyzed by LC-FTICR-MS. Composition 1 was analyzed by LC-FTICR-MS at 45 days into the aging process (Step 4, Figure 1 of the '537 application).

12. Analysis was performed by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS) on a 7T Solarix FTICR-MS (Bruker) equipped with an Infinity Cell

(Bruker) and a Surveyor Plus HPLC System (Thermo). Each sample was diluted 200-fold by volume in a 5% acetonitrile/water solution and run in ESI negative mode. ESI Source Conditions and LC Method Details are shown in Tables 1 and 2.

Table 1: ESI Negative Source Conditions

Polarity	Capillary Voltage (V)	End Plate Offset (V)	Nebulizer Pressure (bar)	Dry Gas Flow (L/min)	Dry Temp (°C)	FID Transient (s)
ESI Negative	4500	-500	3	3	200	0.4893

Table 2: LC Method Details

Column	Solvent A	Solvent B	Sample Injection Volume	Flow Rate (mL/min)	LC Method Description	Total Method Time (min)
Merck ZIC-pHILIC 150*2.1 mm, 5 µm	Acetonitrile	Water	5µL	0.25-0.9	Ramp: [95%A-5%B], [5%A-95%B] Equilibrate: [95%A-5%B]	50

13. Post-acquisition, mass spectra were externally calibrated against a known standardized tuning mixture. Mass lists including peaks above a S/N threshold of 5, relative intensity threshold of 0.01% and absolute intensity threshold of 0.5 were then generated. Only masses in the 140-700 m/z range were used to determine molecular formulas since mass accuracy is highest in the lower mass range for FTICR-MS. To generate molecular formulas, the maximum error allowed between the measured and theoretical m/z from the calculated molecular formula was set to 1.0 ppm. Deprotonated (M-H) ions were included in formula determination and all final mass lists used for subsequent analysis were converted to their Neutral Sum

equivalent. Molecular formulas were then screened to exclude $O/C > 1.5$ and $N/C > 0.7$ as well as include $H/C \leq 2.25$ and $H/C \geq 0.33$.

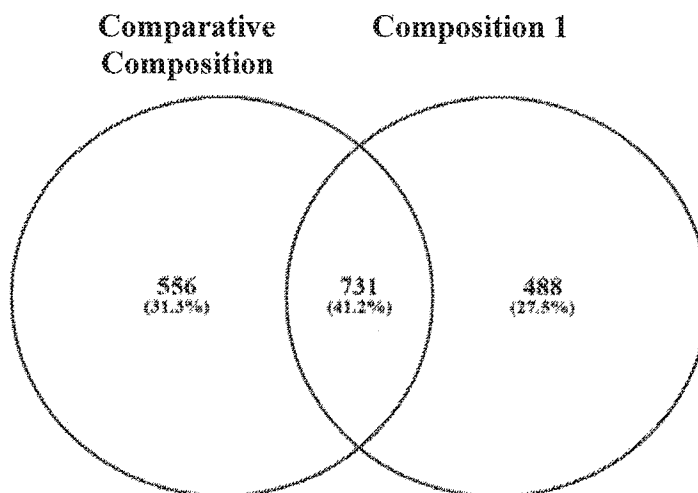
14. Table 3 displays the number of molecular formula identified in each sample. Both samples had a similar number of molecular formulas identified with the LC-FTICR-MS method.

Table 3: Number of Molecular Formula Identified in Each Sample

Sample	Number of Molecular Formulas
Comparative Composition	1287
Composition 1	1219

15. Figure 1 displays a Venn Diagram that shows the number of overlapping and unique molecular formulas assigned to each sample. Only 731 of the 1775 total molecular formulas identified (41.2%) are shared between samples. In addition, 488 molecular formulas are unique to Composition 1.

Figure 1: Venn Diagram Displaying Molecular Formula Overlap between Samples



16. The ultra-high resolution and mass accuracy of FTICR-MS coupled with the separation power of Liquid Chromatography (LC), has allowed for the identification of molecular formulas between m/z 140-700 in Comparative Composition at 45 days and a sample obtained per the '537 application (Composition 1). Results show that Composition 1 has a significant number of unique molecular formulas not found in the Comparative Composition at 45 days.

17. I further declare that all statements made in this declaration of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further, that these statements were made with the knowledge that willful, false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful, false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing therein.

Dated: 7/13/2018

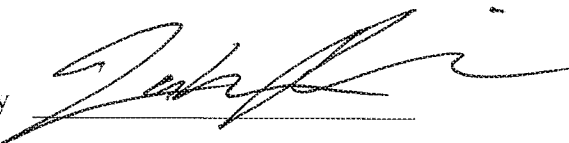
By 

Exhibit 1

Taha Rezai Ph.D.

<https://www.linkedin.com/in/taharezai/>

taharezai@gmail.com

Cell: 831-601-5216

Clovis, CA 93611

SUMMARY

PhD in Biochemistry with expertise in assay development, analytical chemistry, formulations and process chemistry. Over ten years of industry experience in markets including clinical, forensics, proteomics and agricultural chemicals.

EDUCATION

University of California, Santa Cruz

PhD Biochemistry, June 2007

Dissertation Title: **Structural Permeability Relationships of Cyclic Peptides**

University of California, Berkeley

BA Integrative Biology, June 2001

WORK EXPERIENCE

Actagro - (February 2015 - Present)

Technology Director

Fresno, CA

- Directly oversees the Quality, Process Chemistry and Discovery R&D Groups.

Actagro - (January 2014 - February 2015)

Technical Development Manager

Fresno, CA

- Product R&D
 - Lead the technical development of new products
 - Conduct basic research in collaboration with academia
 - Lead efforts in the continuous improvement of current products
 - Manage the Product R&D Group
- Quality
 - Develop a Quality Program
 - Develop and Implement SOP's for the Quality Program
 - Manage the Quality Group

Actagro - (February 2012 - January 2014)
Product R&D Chemist
Fresno, CA

- Product Development
- Analytical Chemistry
- Process Chemistry
- Colloidal Formulation and Stability

California State University, Fresno - (August 2012 – December 2014)
Part Time Biochemistry Lecturer
Fresno, CA

- Lecturer, General Biochemistry
- TA, General Chemistry Lab

Thermo Fisher Scientific - (January 2011 - February 2012)
Senior Marketing Specialist - Clinical and Forensic Toxicology
San Jose, CA

- Led marketing efforts for launch of new quantitative LCMS software
- Responsible for developing and implementing new marketing campaigns and writing business plans for software and hardware
- Product Manager for new CE-IVD product

Thermo Fisher Scientific - (December 2009 - December 2010)
Senior Application Scientist - BRIMS
Cambridge, MA

- New technology evaluations for quantitative proteomics LCMS applications
- Led quantitative proteomics collaborations with customers

BIDMC/Harvard Medical School - (December 2008 - April 2010)
Part Time Research Scientist - Usheva Lab
Boston, MA

- Endocrine Research
- Focus on female fertility and ovarian cancer

Thermo Fisher Scientific - (June 2008 - December 2009)
Application Scientist - BRIMS (Biomarker Research Initiatives for Mass Spectrometry)
Cambridge, MA

- LCMS based proteomics disease research
- Spearheaded quantitative proteomics efforts

- Worked with team to develop high throughput sample prep, LC, software and instrument methodologies

Thermo Fisher Scientific - (May 2007 - June 2008)

Strategic Marketing Specialist - Clinical and Forensic Toxicology - LCMS

San Jose, CA

- Developed quantitative and qualitative small molecule LCMS applications
- Attended conferences and presented posters
- Led marketing efforts for launch of new screening software
- Involved with all aspects of customer support

Thermo Electron - (April 2006 - May 2007)

Part Time Internship in the Scientific Instruments Division

San Jose, CA

- Developed Toxicology screening assays for LCMS
- Prepared market research reports and marketing collateral

UC Santa Cruz - (2003 - 2007)

Graduate Student Researcher - Lokey Lab

Santa Cruz, CA

- Graduate Research in the Structural Permeability Relationships of Cyclic Peptides
- Teaching Assistant in Organic Chemistry Labs

UCSF Earnest Gallo Clinical and Research Center - (2001 - 2002)

Staff Research Associate - Genetics and Tissue Culture

Emeryville, CA

- DNA sample preparation from whole blood samples
- SNP analysis for alcoholism research

UC Berkeley - (2000 - 2001)

Lab Assistant - Tissue Culture Lab, MCB

UC Berkeley, CA

- Maintained cell cultures for the MCB department

UC Berkeley - (1999 - 2000)

Lab Helper - Plant Biology Department

UC Berkeley, CA

- Assisted in basic lab duties

FIRST AUTHOR PUBLICATIONS

"Conformational flexibility, internal hydrogen bonding, and passive membrane permeability: Successful in silico prediction of the relative permeabilities of cyclic peptides" *J Am Chem Soc.* **2006** Nov 1;128(43):14073-80. **Taha Rezai**, Jonathan E Bock, Mai V Zhou, Chakrapani Kalyanaraman, R Scott Lokey, Matthew P Jacobson

"Testing the conformational hypothesis of passive membrane permeability using synthetic cyclic peptide diastereomers" *J Am Chem Soc.* **2006** Mar 1;128(8):2510-1. **Taha Rezai**, Bin Yu, Glenn L Millhauser, Matthew P Jacobson, R Scott Lokey

CO-AUTHORED PUBLICATIONS

"Quantitative Phosphoproteomic Analysis of the STAT3/IL-6/HIF1 α Signaling Network: An Initial Study in GSC11 Glioblastoma Stem Cells" *J. Proteome Res.* **2010**, 9, 430-443. Carol L Nilsson, Roslyn Dillon, Arugadoss Devakumar, Stone D-H Shi, Michael Greig, John C Rogers, Bryan Krastins, Michael Rosenblatt, Gregory Kilmer, Michael Major, Barbara J Kaboord, David Sarracino, **Taha Rezai**, Amol Prakash, Mary Lopez, Yongjie Ji, Waldemar Priebe, Frederick F Lang, Howard Colman, Charles A Conrad

"Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometric Immunoassay Responsive to Human Parathyroid Hormone and Related Variants" *Clin Chem.* **2010** Feb;56(2):281-90. Epub 2009. Dec 18 Mary F Lopez, **Taha Rezai**, David A Sarracino, Amol Prakash, Bryan Krastins, Michael Athanas, Ravinder J Singh, David R Barnidge, Paul Oran, Chad Borges, Randall W Nelson

"A platform for establishing inter-laboratory reproducibility of quantitative, selected reaction monitoring-based mass spectrometry peptide assays" *J. Proteome Res.*, **2010**, 9 (12), pp 6678–6688 Prakash A, **Rezai T**, Krastins B, Sarracino D, Athanas M, Russo P, Ross MM, Zhang H, Tian Y, Kulasingam V, Drabovich AP, Smith C, Batruch I, Liotta L, Petricoin E, Diamandis EP, Chan DW, Lopez M

"Mass Spectrometric Discovery and Selective Reaction Monitoring (SRM) of Putative Biomarker Candidates in First Trimester Trisomy 21 Maternal Serum" *J Proteome Res.* **2011** Jan 7;10(1):133-42. Epub 2010 Jun 4. Mary F Lopez, Ramesh Kuppasamy, David A Sarracino, Amol Prakash, Michael Athanas, Bryan Krastins, **Taha Rezai**, Jennifer N Sutton, Scott Peterman, Kypros Nicolaides

"A Large Network of Interconnected Signaling Pathways In Human Ovarian Follicles Is Supported by the Gene Expression Activity of the Granulosa Cells" *Reprod Sci.* **2011** May;18(5):476-84. Sang Wook Yoo, Stefan Savchev, Luke Sergott, **Taha Rezai**, Mery F Lopez, Tiffany Von Wald, Jennifer L Eaton, Richard Reindollar, Anny Usheva

“Simultaneous analysis of glycosylated and sialylated prostate-specific antigen revealing differential distribution of glycosylated prostate-specific antigen isoforms in prostate cancer tissues” *Anal Chem.* **2011** Jan 1;83(1):240-5. Epub 2010 Dec 8. *Yan Li, Yuan Tian, Taha Rezai, Amol Prakash, Mary F Lopez, Daniel W Chan, Hui Zhang*

“Evaluation of absolute peptide quantitation strategies using SRM” *Proteomics.* **2011** Mar;11(6):1148-52. *James Campbell, Taha Rezai, Amol Prakash, Bryan Krastins, Loïc Dayon, Malcolm Ward, Sarah Robinson, Mary Lopez*

“On-resin N-methylation of cyclic peptides for discovery of orally bioavailable scaffolds” *Nature Chem Biol.* **2011** Sept 25 *White TR, Renzelman CM, Rand AC, Rezai T, McEwen CM, Gelev VM, Turner RA, Linington RG, Leung SS, Kalgutkar AS, Bauman JN, Zhang Y, Liras S, Price DA, Mathiowetz AM, Jacobson MP, Lokey RS.*

“Inter-laboratory reproducibility of SRM assays using multiple upfront analyte enrichment strategies.” *J Proteome Res.* **2012** May 29 *Amol Prakash, Taha Rezai, Bryan Krastins, David Sarracino, Michael Athanas, Paul Russo, Hui Zhang, Yuan Tian, Yan Li, Vathany Kulasingam, Andrei Drabovich, Christopher R Smith, Ihor Batruch, Paul E. Oran, Claudia Fredolini, Alessandra Luchini, Lance Liotta, Emanuel Petricoin, Eleftherios P Diamandis, Daniel W. Chan, Randall Nelson, and Mary Frances Lopez*

CO-AUTHORED INDUSTRIAL APPLICATION NOTES

“Quantitative Analysis of Testosterone in Serum by LC-MS/MS”
App Note 429

“A Complete Toxicology Screening Procedure for Drugs and Toxic Compounds in Urine and Plasma Using LC-MS/MS” *App Note 449*

“Efficient Enrichment and Identification of Cell Lysate Phosphopeptides Using an Automated, Magnetic Bead-Based System Coupled to High-Resolution LC-MS/MS and SRM” *App Note 459*

“Streamlining the Process of Biomarker Verification using Pinpoint Software”
App Note 470

FILED PATENTS

“Semi-Humic Organic Carbon Material and Methods of Use Thereof”
Application Number: 15796537, Application Date: 27.10.2017

“Semi-Humic Composition and Methods of Use Thereof”
Application Number: 15590933, Application Date: 09.05.2017

“Method for Reducing Volatile Emissions from Soil Fumigation”

Application Number: 15520404, Application Date: 19.10.2015

“Method for controlling nutrient depletion from agricultural soils”

Application Number: 15501427, Application Date: 04.08.2015

“Assay for Monitoring Parathyroid Hormone (PTH) Variants by Tandem Mass Spectrometry” *Application Number: 12881115, Application Date: 13.09.2010*

“Assays for Differentiating between Ischemic and Hemorrhagic Stroke in a Human Patient” *Application Number: 12881115, Application Date: 13.09.2010*

“Methods for Predicting Trisomy 21 in a Fetus”

Application Number: 12710062, Application Date: 22.02.2010

FIRST AUTHOR POSTERS

A General Unknown Screening Method for Drugs and Toxic Compounds in Urine Using Liquid Chromatography - Mass Spectrometry

AACC 2008, ASMS 2008

A Quantitative Screening Method for Drugs and Toxic Compounds in Urine Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry

ASMS 2008

ToxID Software for the Identification of Analytes in Various LC-MS Based Toxicology Screening Applications

TIAFT 2008

A Semi-Quantitative General Unknown Screening Method for Drugs and Toxic Compounds in Urine Using Liquid Chromatography - Mass spectrometry

DABFT 2008

Significant Improvement in the LOD of Dansyl-Estradiol using LC-MS/MS on the TSQ Vantage *Published On Thermo.com 2008*

An Evaluation of Three Peptide Quantitation Strategies for Serum Samples using Liquid Chromatography-Selected Reaction Monitoring

CNPN 2010

Investigation Into the Peptide Selectivity of TurboFlow Columns

ASMS 2010

Improving the Efficiency and Throughput of an Enzymatic Digestion of Klotho Using Pressure Cycling Technology (PCT)

MSACL 2010

A Quantitative and Qualitative Molecular Analysis of High Organic Content Liquids (HOCL) in Agriculture

SSSA 2017



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2018/0008176
Recibo: 22-2153
Fecha: 14/01/2022

CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO
CC: 66.783.790
Pago PSE No: 624841
CUS: 1284282929

Patente PCT
MATERIAL DE CARBONO ORGÁNICO SEMI-HÚMICO Y MÉTODOS DE USO DEL MISMO

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-03	Modificaciones / Correcciones al registro Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 176,000	\$ 176,000
TOTAL					\$ 176,000