



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 337 944**

51 Int. Cl.:

C05B 17/00 (2006.01)

C12P 3/00 (2006.01)

C01B 25/163 (2006.01)

C01B 25/165 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07254360 .6**

96 Fecha de presentación : **05.11.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1964828**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2008**

54 Título: **Método de generación de fertilizantes de fósforo mediante la utilización de tecnología de fermentación microbiana.**

30 Prioridad: **06.11.2006 US 857470 P**

73 Titular/es: **SCI PROTEK, Inc.**
35803 Road 132
Visalia, California 93292, US

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.04.2010

72 Inventor/es: **Grech, Nigel M.**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.04.2010

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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

DESCRIPCIÓN

Método de generación de fertilizantes de fósforo mediante la utilización de tecnología de fermentación microbiana.

5 La presente invención se refiere a la generación de fertilizantes de fósforo (P) usando tecnología de fermentación microbiana y, más particularmente, convirtiendo las fuentes de fosfato en formas más reducidas de fósforo mediante fermentación microbiana anaerobia, siendo los productos finales adecuados para uso en agricultura.

10 Los fosfitos (conocidos también como fosfonatos) son un componente natural del ciclo del fósforo en el suelo, en los sistemas de plantas y plantas marinas. Se definen como las sales de ácido fosforoso (H_3PO_3). Los hipofosfitos son las sales del ácido hipofosforoso. En la siguiente descripción de esta invención, el término fosfito se usará en ocasiones para describir las sales de ácido fosforoso/hipofosforoso. En la agricultura moderna el ciclo del fósforo puede alterarse en gran medida mediante el uso muy extendido de biocidas y fertilizantes inorgánicos. Estos factores a menudo dan como resultado limitaciones del fósforo en muchos suelos agrícolas. Además, se sabe que la fertilización basada en fosfato no es muy eficaz en muchos suelos debido a la fijación y la adsorción. Además, la absorción foliar de fosfato es muy escasa o inexistente.

20 Se sabe desde hace tiempo que los fosfitos tienen actividad tanto en plantas como en microbios como fuentes de nutrientes vegetales (Lovatt, Patente de Estados Unidos 5514200) y como agentes biocidas (Thizy, Patente de Estados Unidos 4075324) y ahora están bien establecidos en términos de su utilización agroquímica. Se ha determinado también que los fertilizantes de fósforo basados en fosfito demuestran capacidades de penetración mejores a través de follaje de las plantas y tienen una propensión a permanecer más disponibles en el suelo y no quedarse fijados o adsorbidos como es el caso del fosfato. Los fertilizantes basados en fosfito también son bastante más eficaces a la hora de suministrar fósforo que los fertilizantes basados en fosfato debido a que tienen una molécula de oxígeno menos y que dicha proporción de "P" en la molécula es correspondientemente más alta. Los fosfitos también son mucho más solubles y menos susceptibles a precipitación y a adsorción en el suelo. La mejor solubilidad de los fosfitos también es ventajosa en términos del anión en la sal. La mayor solubilidad de las sales de amoníaco, potasio, magnesio y calcio da como resultado un suministro nutricional más eficaz cuando se aplica al suelo o particularmente al follaje de las plantas que la sal o sales de fosfato correspondientes.

30 Se ha demostrado también que los fosfitos presentan una actividad marcada contra ciertos microbios tales como hongos y bacterias y se usan como biocidas.

35 Actualmente la fabricación de fertilizantes de fósforo consiste principalmente en fabricar el ácido y después hacer reaccionar el ácido con ciertas bases para generar una sal fertilizante tal como fosfato de amonio, fosfato de potasio, fosfito de potasio, etc. Estos métodos generalmente implican reacciones altamente reactivas y generalmente exotérmicas. También muchos de los reactantes son químicamente peligrosos. Comercialmente la mayoría de fosfitos se producen principalmente mediante la reacción de tricloruro de fósforo y agua, una reacción muy peligrosa y arriesgada. El ácido fosforoso se extrae de los productos de la reacción y se purifica. Es un proceso caro y peligroso. Por lo tanto, sería muy beneficioso si pudiera encontrarse un proceso menos peligroso y más eficaz que pudiera producir fosfitos/hipofosfitos.

45 Los microbios anaerobios son abundantes en la naturaleza y median muchas reacciones bioquímicas complejas en la naturaleza. El metabolismo anaerobio puede tener lugar en cualquier entorno en el que el oxígeno esté ausente o limitado. Los ejemplos de anaerobiosis pueden encontrarse en ecosistemas tales como pantanos y lugares de agua estancada donde la materia orgánica se descompone en ausencia de oxígeno y conduce a la formación de "gas del pantano". El gas del pantano es principalmente metano. La putrefacción anaerobia y la degradación de la materia orgánica normalmente van acompañadas de olores desagradables de sulfuro de hidrógeno y de compuestos orgánicos que contienen azufre, tales como mercaptanos (cualquier compuesto orgánico que contiene azufre). En dichas condiciones reductoras, las moléculas ricas en oxígeno no son abundantes.

50 Esta invención describe los usos y métodos de preparación de fosfitos y/o hipofosfitos (y sus formas poliméricas y/o sus sales) y de compuestos agroquímicos basados en fosfito (fertilizantes y biocidas) a partir de fosfato u otras fuentes de fósforo de origen natural o sintéticas usando fermentación microbiana anaerobia. El proceso de fermentación producirá sales de fosfito/hipofosfito tanto en fase líquida como sólida que pueden usarse como un producto agroquímico. Después de extraerla del recipiente de fermentación, la fase líquida se filtra y se envasa. Para aplicación a plantas el material líquido se diluye adicionalmente con agua y se aplica a las plantas. El material en fase sólida en la cámara de reacción se retira, se seca y puede usarse después como un fertilizante sólido aplicado tal cual, mezclado con otros sólidos (tal como fertilizantes y arcillas) o diluido en agua y aplicado a las plantas. Los fertilizantes derivados de fosfito/basados en hipofosfito son estables y pueden mezclarse en soluciones que tienen un pH que es aceptable para el follaje de la planta y en otras soluciones que tienen un pH aceptable para las raíces. Cuando se extrae del recipiente de fermentación, el material puede secarse o diluirse adicionalmente con agua o prepararse en una suspensión.

65 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar procesos mediante los cuales los suelos de origen natural se usan para generar fosfitos y/o hipofosfitos a partir de fosfatos por fermentación anaerobia.

También es un objeto de la presente invención proporcionar procesos mediante los cuales se usan microorganismos de origen natural para generar fosfitos y/o hipofosfitos a partir de fosfatos por fermentación anaerobia.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar procesos mediante los cuales se usan suelos de origen natural y microorganismos para generar fosfitos y/o hipofosfitos a partir de fosfatos por fermentación anaerobia; en algunos casos los suelos proporcionan una fuente de microorganismos utilizada en el proceso de fermentación anaerobia.

- 5 Otro objeto de la presente invención es proporcionar procesos en los que los fosfitos y/o hipofosfitos que se generan por fermentación anaerobia se usan para formular compuestos agroquímicos tales como fertilizantes, biocidas y otros compuestos agroquímicos para uso en horticultura y en otras partes.

- 10 Otro objeto de la presente invención es el uso de bacterias anaerobias en el proceso de fermentación para producir fosfitos y/o hipofosfitos a partir de fosfatos.

Otro objeto de la presente invención es el uso de hongos anaerobios en el proceso de fermentación para producir fosfitos y/o hipofosfitos a partir de fosfatos.

- 15 Otro objeto de la presente invención es proporcionar procesos en los que los fosfitos y/o hipofosfitos que se generan por fermentación anaerobia se aplican a las plantas, a los microorganismos o al suelo.

- 20 En una realización de la invención los siguientes ingredientes se mezclan juntos en una suspensión y se ponen en un recipiente purgado hermético al aire: una fuente de fosfato adecuada, una muestra de suelo anaerobia (que contiene microbios anaerobios y nutrientes esenciales) o un suelo estéril al que se añade un cultivo puro de microbios seleccionados, una fuente de carbono y agua. Puede usarse helio, gases nobles o nitrógeno para purgar el aire del recipiente de fermentación. El recipiente hermético al aire tiene una purga unidireccional para permitir que los gases de escape se liberen y asegurar una acumulación de presión mínima en el recipiente de fermentación. Dicho consorcio microbiano mixto capaz de reducir el fósforo puede obtenerse en localizaciones en las que el suelo se ha cultivado de forma anaerobia durante varios años. Dichos suelos se prefieren debido a la ausencia de condiciones aerobias que favorecerán la emergencia de microorganismos anaerobios que proliferan en estas condiciones de poca cantidad de oxígeno. En condiciones anaerobias, las demandas energéticas de crecimiento microbiano no se suministran por respiración dependiente de oxígeno sino en lugar de ello por diversas reacciones redox. Dichas reacciones generan un entorno reductor donde los materiales altamente oxidados (tales como oxianiones) pueden reducirse a estados de oxidación inferiores. Dichos ejemplos incluyen, sin limitación, de sulfato a sulfuros, de cloratos a cloruros, de fosfato a fosfito, de nitratos a nitruros (y finalmente metano), etc. De esta manera se ha descubierto que si se proporciona un entorno con una cantidad de oxígeno suficientemente baja, el fosfato puede convertirse en estados de oxidación menores tales como fosfito (+III) e hipofosfito (+I). El resultado del proceso de fermentación anaerobia es la generación de sales de oxiácido reducidas de fósforo tales como sales fosfito e hipofosfito en fase líquida y sólida.

- 35 Esta invención describe métodos para generar fosfitos/hipofosfitos para usos agroquímicos, agrícolas, hortícolas y otros. Las composiciones pueden incubarse durante un tiempo tan corto como algunos días a tan largo como algunos meses. La reacción se acelera mediante temperaturas altas (10-40°C). El resultado del proceso de fermentación anaerobia es la producción de fosfitos/hipofosfitos que pueden usarse después, si se concentran adicionalmente, se diluyen y/o se mezclan con otros fertilizantes y/o biocidas para formar fertilizantes compuestos y/o otros biocidas y que pueden estar en forma sólida o líquida y se usan en agricultura/horticultura u otros. Se han identificado diversos géneros microbianos en este proceso tales como, sin limitación, *Clostridium*, *Vibrio*, *Klebsiella* y/o *Escherichia*. Generalmente, se ha descubierto que las muestras de poblaciones de bacterias aisladas a partir de suelos anaerobios tienen, en una mayor o menor extensión, la capacidad de generar fosfitos/hipofosfitos a partir de fuentes de fosfato en condiciones anaerobias. Las muestras de suelos anaerobios se han recogido en diversas localizaciones en California y tres de estos suelos (designado rrs12, rrs15 y rrs19) han mostrado una generación prometedora de fosfitos a partir de fosfatos.

- 50 En el cultivo de microbios anaerobios tales como bacterias que pertenecen a los géneros tales como *Clostridium*, *Vibrio*, *Klebsiella* y/o *Escherichia*, así como otros anaerobios, es deseable emplear condiciones de cultivo que conducen a la proliferación de anaerobios. Diversos inductores incluyen, aunque sin limitación, adiciones de medio tal como las descritas en Long *et al.* en 1983 (Appl. Environ. Microbiol., 45: 1389-1393). Se emprendió el aislamiento de bacterias a partir de muestras de suelo y dio como resultado la identificación de aislados capaces de generar fosfito a partir de fosfato.

- 55 La invención mencionada anteriormente puede tomar la forma de una fermentación estática o de un sistema de fermentación continuo que proporciona entornos favorables para la fermentación bacteriana anaerobia de manera que se mantiene la digestión óptima de la biomasa y la producción de fosfitos y sus sales. En todos los casos puede usarse helio, nitrógeno o gases nobles para purgar el recipiente de fermentación.

- 60 En general, la biomasa, preferiblemente en forma de una suspensión acuosa, se introduce en un reactor de fermentación provisto de un entorno aerobio. Si el pH de la suspensión de biomasa cae a aproximadamente 4,8, el proceso de fermentación puede verse afectado (es decir, el entorno es demasiado ácido para mantener una fermentación bacteriana anaerobia eficaz). Por tanto, puede añadirse un agente de neutralización al sistema para mantener un pH por encima de aproximadamente 4,8 en cada reactor. Los agentes de neutralización adecuados incluyen sales de amonio, sodio, potasio y calcio de hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos. Preferiblemente, se emplea carbonato cálcico o hidróxido cálcico para mantener el intervalo de pH deseable del sistema. El agente de neutralización puede añadirse al sistema en cualquier punto donde sea necesario mantener el intervalo de pH. La base puede añadirse sola o con la biomasa fresca que entra en el proceso de fermentación.

ES 2 337 944 T3

A continuación se dan los ejemplos de métodos para generar los fosfitos/hipofosfitos:

Ejemplo 1

5 Los siguientes materiales generalmente son materiales en un estado fino, molidos inicialmente a un tamaño de partícula en el intervalo de malla 10-40 (ASTM), usando un equipo de trituración bien conocido, tal como un molino Fitzpatrick se mezclaron juntos en una suspensión y todos los componentes excepto el suelo se esterizaron en una autoclave. El suelo se añadió a la mezcla y se incubó a aproximadamente 35°C en un agitador orbital. El helio se suministró inicialmente a la cámara de fermentación para purgar el aire residente. Los resultados diarios se indican en la siguiente tabla.

	Fosfato de Calcio (coloidal)	2 kg
15	Fosfato Potásico	0,5 kg
	Suelo anaerobio (sitio rrs15)	300 g
	Sacarosa	10 g
20	Lactato Sódico	1 g
	FeCl ₂	0,5
	MnCl ₂	0,1
25	ZnCl	0,05
	CuCl	0,02
	S _e	5 g
30	Solubor	0,01 g
	Agua	1,5 kg

35 El pH inicial de la mezcla se ajustó a 7,5 con ácido clorhídrico. La mezcla se agitó. En el transcurso de 20-30 días el pH de los medios podía caer a niveles donde la fermentación se ve afectada, que podría necesitar el ajuste con una base tal como hidróxido cálcico.

40 Resultados: (Ejemplo 1)

Recuperación de fosfito e hipofosfito (% p/p como un % del P total)

45		Día 1	3	6	9	12	15	18		
	PO ₃ /HPO ₂	0	0	2	7	11	10	8		

50 Ejemplo 2

Se usó una fuente de fosfato inorgánico como en el ejemplo 1. Sin embargo, en este ejemplo se usó una fuente de carbono compleja (paja de trigo). No se añadió ningún otro nutriente inorgánico. Los materiales se mezclaron como en el ejemplo 1. El nitrógeno se usó para purgar el aire residente. Los resultados diarios se indican en la siguiente tabla.

55 4 kg de fosfato de amónico
100 g de paja de trigo
60 1 kg de suelo anaerobio (sitio rrs 12)
2 kg de agua
65 pH 7,5

El nitrógeno se suministró al recipiente de fermentación para purgar cualquier aire restante.

ES 2 337 944 T3

Resultados: (Ejemplo 2)

Recuperación de fosfito e hipofosfito (% p/p como un % del P total)

	Día 1	3	6	9	12	15	18	21	24
PO ₃ /HPO ₂	0	0	8	10	10	11	10	9	8

Ejemplo 3

Igual que el Ejemplo 2 excepto que se usó fosfato de roca en lugar de fosfato amónico.

Fosfato de roca 4 kg
 Suelo anaerobio (sitio rrs19) 0,5 kg
 Paja de trigo 0,5 kg
 Agua 4 kg

Resultados: (Ejemplo 3)

Recuperación de fosfito e hipofosfito (% p/p como un % del P total)

	Día 1	3	6	9	12	15	18	21	24
PO ₃ /HPO ₂	0	0	5	6	12	11	5	7	3

Ejemplo 4

En este ejemplo, todos los componentes se esterilizaron. Después, se añadió una especie de Clostridium (C-rrs19) a la mezcla después de la esterilización en autoclave y se incubó como en el caso anterior.

Molienda (<0.25 mm) fosfato de roca 4 kg
 Suelo anaerobio (sitio rrs19) 0,5 kg
 Paja de trigo 0,5 kg
 Agua 4 kg

Resultados: (Ejemplo 4)

Recuperación de fosfito e hipofosfito (% p/p como un % del P total)

	Día 1	3	6	9	12	15	18	21	24
PO ₃ /HPO ₂	0	0	0	0	6	16	12	3	3

ES 2 337 944 T3

Ejemplo 5

En este ejemplo, al igual que en el ejemplo 4, todos los componentes se esterilizaron. Después, se añadió un aislado de *E. coli* (E.C. rrs 19) a la mezcla después de la esterilización en autoclave y se incubó como en el caso anterior.

Fosfato de roca	4 kg
Suelo anaerobio (sitio rrs19)	0,5 kg
Paja de trigo	0,5 kg
Agua	4 kg

Resultados: (Ejemplo 5)

Recuperación de fosfito e hipofosfito (% en p/p como un % del P total)

	Día 1	3	6	9	12	15	18	21	24
PO ₃ /HPO ₂	0	0	0	0	0	3	2	0	0

Ejemplo 6

En este ejemplo, al igual que en el ejemplo 4, todos los componentes se esterilizaron. Después, se añadió un aislado bacteriano no identificado (UI rrs 19) a la mezcla después de la esterilización en autoclave y se incubó como en el caso anterior.

Fosfato de roca	4 kg
Suelo anaerobio (sitio rrs19)	0,5 kg
Paja de trigo	0,5 kg
Agua	4 kg

Resultados: (Ejemplo 6)

Recuperación de fosfito e hipofosfito (% p/p como un % del P total)

	Día 1	3	6	9	12	15	18	21	24
PO ₃ /HPO ₂	0	0	3	10	16	18	17	18	16

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar formas reducidas de fósforo seleccionadas entre el grupo de fosfito, hipofosfito y combinaciones de los mismos a partir de una fuente de fosfato por fermentación anaerobia que comprende las etapas de:
- a. introducir una suspensión que contiene una fuente de fosfato en una cámara purgada;
 - b. introducir una fuente para al menos un microorganismo en dicha cámara;
 - c. introducir una fuente de carbono en dicha cámara;
 - d. introducir agua en dicha cámara;
 - e. incubar dicha cámara durante un período de tiempo; y
 - f. retirar periódicamente dichas formas reducidas de fósforo de dicha cámara.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha fuente de fosfato es un miembro seleccionado entre el grupo de fosfato cálcico, fosfato de amonio, fosfato potásico, fosfato de roca y combinaciones de los mismos.
3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que dicho período de incubación es entre unos pocos días y unos pocos meses.
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la temperatura en dicha cámara se mantiene entre aproximadamente 10°C y aproximadamente 40°C.
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que dicha fuente de microorganismos son microorganismos de origen natural.
6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que dicha fuente de microorganismos es el suelo.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6 en el que dicha fuente de microorganismos es suelo de origen natural.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7 en el que dicha fuente de microorganismos es suelo cultivado anaerobiamente.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8 en el que dicho suelo contiene microbios anaerobios y nutrientes esenciales.
10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que se usan hongos anaerobios en el proceso de fermentación.
11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que se usan bacterias anaerobias en el proceso de fermentación.
12. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que dicha fuente de fosfato es una fuente de fosfato orgánico seleccionada entre el grupo de: fuentes animales, huesos, plantas, fuentes vegetales, semillas y combinaciones de las mismas.
13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende la etapa adicional de añadir un agente de neutralización para mantener un pH eficaz para producir fosfitos.
14. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende la etapa adicional de mantener el pH del material en dicha cámara por encima de aproximadamente 4,8.
15. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que dicha fuente de microorganismos es una bacteria seleccionada entre el grupo del género *Clostridium*, género *Vibrio*, *Klebsiella*, género *Escherichia* y combinaciones de las mismas.
16. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende la etapa adicional de purgar periódicamente dicha cámara.

ES 2 337 944 T3

17. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende la etapa adicional de purgar el aire de dicha cámara antes de comenzar la fermentación.
18. Un método de acuerdo con la reivindicación 17 en el que se usa uno de los siguientes para purgar el aire del recipiente de fermentación: helio u otro gas noble o nitrógeno.
19. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende la etapa adicional de purgar el exceso de aire de dicha cámara sustituyéndolo por al menos un gas inerte.
20. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende la etapa adicional de esterilizar dicha suspensión antes de introducir dicha fuente de microorganismos.
21. Un método de acuerdo con la reivindicación 20 en el que dicha fuente de microorganismos es un cultivo puro de microbios seleccionados.
22. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende la etapa adicional de moler los componentes de fermentación antes de introducirlos en dicha cámara.
23. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende la etapa adicional de ajustar el pH inicial del material en dicha cámara a aproximadamente 7,5.
24. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que se usan las formas reducidas de fósforo para formular uno del siguiente grupo: compuestos agroquímicos, fertilizantes, biocidas y combinaciones de los mismos.
25. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que las formas reducidas de fósforo se aplican a uno de los siguientes grupos: plantas, microorganismos, el suelo y combinaciones de los mismos.
26. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende las etapas de:
- a. introducir una suspensión que contiene una fuente de fosfato en una cámara purgada;
 - b. introducir una fuente para al menos un microorganismo en dicha cámara,
 - c. introducir una fuente de carbono en dicha cámara;
 - d. introducir agua en dicha cámara,
 - e. purgar el exceso de aire de dicha cámara sustituyéndolo por al menos un gas inerte;
 - f. ajustar el pH inicial del material en dicha cámara a aproximadamente 7,5;
 - g. incubar dicha cámara a una temperatura de entre aproximadamente 10°C y aproximadamente 40°C;
 - h. mantener dicha temperatura durante un período de tiempo;
 - i. mantener el pH en dicha cámara por encima de aproximadamente 4,8; y
 - j. retirar periódicamente dichas formas reducidas de fósforo de dicha cámara.