

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 746**

21 Número de solicitud: 201630562

51 Int. Cl.:

C05F 5/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

29.04.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.06.2016

71 Solicitantes:

FUNDACIO UNIVERSITARIA BALMES (34.0%)
C/ Perot Rocaguinarda, 17

08500 Vic (Barcelona) ES;

HIDALGO SANTAMARÍA, Rubén Gerardo (33.0%)
y

MOSQUERA COLINAS, Verónica (33.0%)

72 Inventor/es:

HIDALGO SANTAMARÍA, Rubén Gerardo;
MOSQUERA COLINAS, Verónica y
CULLELL DALMAU, Marta

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

54 Título: **Procedimiento de obtención de una composición promotora del crecimiento vegetal que comprende *Pseudomonas putida* y usos de la misma**

57 Resumen:

Procedimiento de obtención de una composición promotora del crecimiento vegetal que comprende *Pseudomonas putida* y usos de la misma.

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de una composición promotora del crecimiento vegetal que comprende *Pseudomonas putida*, que comprende las siguientes etapas: a) cultivar la bacteria *Pseudomonas putida* en un medio de cultivo que comprende un desecho industrial; y b) coleccionar el cultivo obtenido y conservarlo a 4°C. Dicho desecho industrial puede ser lactosuero o melaza. Además, la presente invención se refiere al uso de la composición obtenida mediante dicho procedimiento para incrementar la productividad del cultivo de vegetales, tales como acelgas, tomates y lechugas, y para la conservación de un césped, tal como el césped de un campo de golf.

Crecimiento *Pseudomonas putida*

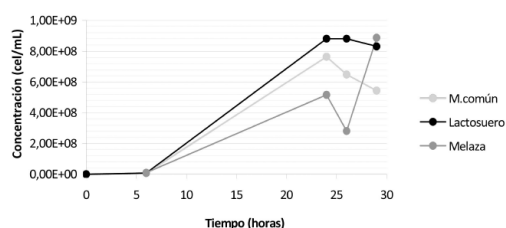


Figura 1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de una composición promotora del crecimiento vegetal que comprende *Pseudomonas putida* y usos de la misma

5

La presente invención se refiere al sector de la biotecnología aplicada a la agricultura, y en particular se refiere a un procedimiento de obtención de una composición que promueve el crecimiento vegetal, cuya composición comprende la bacteria *Pseudomonas putida* como único agente biológico y al uso de dicha composición. El procedimiento de obtención está
10 basado en el uso de desechos industriales, tales como el lactosuero y la melaza, como medio de cultivo de la *Pseudomonas putida*, lo que implica una considerable reducción de los costes de producción de dicha bacteria, así como la utilización de residuos que pueden ser contaminantes del medio ambiente.

15 La composición obtenida mediante el procedimiento de la presente invención se puede clasificar como bioestimulante o rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés), ya que se trata de un microorganismo que aumenta el crecimiento de las plantas, observándose un incremento en la emergencia, vigor, biomasa, desarrollo en sistemas radiculares e incrementos de hasta el 30% en la producción de cultivos de interés
20 comercial. Este efecto se consigue gracias a una simbiosis establecida entre la raíz de la planta y la bacteria que se adhiere a esta. La bacteria obtiene de la raíz nutrientes que no puede obtener en el suelo y proporciona a su vez otros nutrientes a la planta mediante la degradación de componentes presentes en el suelo, tales como nitratos y fosfatos. Además, otra función conocida de esta bacteria es la de ser un Agente de Control Biológico (BCA por
25 sus siglas en inglés). Esto quiere decir que al instalarse esta bacteria en las raíces de las plantas se evita la aparición de otras bacterias y hongos perjudiciales para éstas por el principio de competencia.

La *Pseudomonas putida* es una bacteria que vive en suelos y aguas, y en ocasiones
30 también se puede encontrar viviendo en la rizosfera de las plantas (la zona del suelo alrededor de la raíz), con las que se asocia en relación simbiótica. En esta asociación mutualista, la planta proporciona nutrientes a la bacteria y ésta, a su vez, puede movilizar nutrientes para la planta o protegerla frente a patógenos y plagas.

35 Es una bacteria no patógena para animales y humanos, que posee una gran capacidad metabólica, puede degradar un alto número de compuestos carbonados diferentes, entre

ellos algunos que resultan tóxicos y contaminantes. Por ello esta bacteria se emplea en tareas de biorremediación de derivados del petróleo y de la industria química.

Es conocido que la *Pseudomonas putida* es un organismo promotor del crecimiento vegetal, y ha mostrado ser un organismo altamente eficiente para aumentar el crecimiento de las plantas e incrementar su tolerancia a otros microorganismos causantes de enfermedades.

Otra característica de esta bacteria es que es capaz de sintetizar la enzima 1-aminociclopropano-carboxilo desaminasa (ACC), que hidroliza a nivel rizosférico al ACC, precursor inmediato de la biosíntesis del etileno en plantas, provocado una disminución en la concentración ACC en plantas, que se traduce en una elongación radicular. Además, el etileno estimula la germinación y rompe la dormancia de las semillas.

Un problema que existe para la obtención industrial de esta bacteria es que el medio de cultivo que habitualmente se utiliza para su crecimiento es muy costoso, dado que presenta componentes como extracto de carne, peptona de carne y peptona, que son muy costosos y, por lo tanto, hasta la fecha ha resultado en que los productos que se encuentran en el mercado tengan un precio muy elevado.

Los inventores de la presente invención, tras extensos estudios han encontrado sorprendentemente un procedimiento de obtención de *Pseudomonas putida* a escala industrial, que utiliza como materia prima en el medio de cultivo desechos industriales, tales como el lactosuero y la melaza, que permite disminuir significativamente los costes de producción y, además, colabora con la mejora del medio ambiente, lo cual aporta un valor adicional al producto obtenido.

En la presente invención, el término lactosuero o suero lácteo se refiere a la fracción líquida obtenida durante la coagulación de la leche en el proceso de fabricación del queso y de la caseína, después de la separación de la fase micelar. Es un líquido de color amarillo verdoso, turbio, de sabor fresco, débilmente dulce, de carácter ácido que contiene un 94% de agua, proteínas y grasas. Es un subproducto rico en proteínas globulares hidrosolubles, lactosa, grasas y minerales por lo que constituye una importante fuente de nutrientes para la salud humana y animal. Debido a ello es una de las principales fuentes de contaminación ambiental. Cada año se producen grandes cantidades de suero lácteo, ya que para fabricar 1 Kg de queso a partir de 10 litros de leche, se obtienen 9 litros de suero lácteo o lactosuero.

El lactosuero ha sido considerado durante mucho tiempo como un desecho difícil de tratar y eliminar, debido a las grandes cantidades producidas en la industria del queso. La industria láctea genera un gran volumen de agua residual, con una alta contaminación en materia orgánica compuesta principalmente por lactosa y proteínas. Una concentración de suero entre el 1 – 2% en el agua de los ríos produce rápidamente fermentaciones aerobias ácidas, que dificultan la actividad biológica de los ríos.

Por ejemplo, la normativa medioambiental española (Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas) no permite el vertido del lactosuero al medioambiente y exige a los productores de queso la gestión de ese suero que produce. El coste de una instalación de tratamiento capaz de llevar a cabo no sólo la depuración de los efluentes de la industria quesera, sino la depuración del suero es muy elevado y la gran mayoría de las fábricas de queso no pueden afrontarlo. Esto significa que el suero debe ser gestionado y tratado de forma independiente a los demás efluentes de la planta elaboradora de queso.

Un experto en la materia conoce que es posible obtener lactosuero de otras fuentes alternativas, por ejemplo, del proceso de producción del yougurt, entre otros, que también están dentro del alcance de protección de esta patente.

Por otra parte, en el procedimiento de la presente invención también se puede utilizar melaza. El término melaza se refiere a un producto líquido y espeso derivado del maíz, la caña de azúcar, y en menor medida de la remolacha azucarera y de los cereales, obtenido del residuo restante en las cubas de extracción de los azúcares de las citadas materias primas. Su aspecto es muy similar al de la miel aunque de color pardo muy oscuro, prácticamente negro. El sabor es dulce, ligeramente similar al del regaliz, con un pequeño regusto amargo.

Nutricionalmente, la melaza presenta un altísimo contenido en hidratos de carbono además de vitaminas del grupo B y abundantes minerales, entre los que destacan el hierro, el cobre y el magnesio. Su contenido de agua es bajo. Se elabora mediante la cocción del jugo de la caña de azúcar hasta la evaporación parcial del agua que éste contiene, formándose un producto meloso semicristalizado.

La melaza se emplea principalmente como suplemento energético para la alimentación de rumiantes por su alto contenido de azúcares y su bajo coste en algunas regiones. No

obstante, una pequeña porción de la producción se destina al consumo humano, empleándola como edulcorante culinario.

Un experto en la materia conoce que es posible obtener melaza de otras fuentes
5 alternativas, que también están dentro del alcance de protección de esta patente.

Sin embargo, los inventores de la presente invención no conocen los efectos sobre el rendimiento de las plantas cuando se utiliza melaza en el medio de cultivo de la bacteria *Pseudomonas putida*. Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención da a conocer
10 un procedimiento de obtención de una composición promotora del crecimiento vegetal que comprende *Pseudomonas putida*, cuyo procedimiento comprende una etapa de crecimiento bacteriano en la que se utiliza un desecho industrial, tales como el lactosuero o la melaza.

El procedimiento de obtención de una composición promotora del crecimiento vegetal que
15 comprende *Pseudomonas putida* de la presente invención comprende las siguientes etapas:
a) cultivar la bacteria *Pseudomonas putida* en un medio de cultivo que comprende un desecho industrial; y
b) coleccionar el cultivo obtenido y conservarlo a 4°C.

20 En una realización particular, el desecho industrial es lactosuero. En otra realización el desecho industrial es melaza.

En el caso que se utilice lactosuero, el proceso de la presente invención comprende una etapa adicional de tratamiento previo de dicho lactosuero, para que esté en condiciones
25 estériles, aporte los nutrientes necesarios y no presente su turbidez característica. Dicho tratamiento puede incluir etapas de autoclavado, filtración no estéril y estéril, calentamiento, entre otras. Un experto en la materia conoce como se debe tratar previamente el lactosuero para que pueda ser útil como medio de cultivo.

30 La concentración de la melaza en el medio de cultivo de la etapa a) debe estar en el rango de 2,5-10% (v/v), preferentemente de 2,5-5% (v/v). En caso que se utilice lactosuero, su concentración debe estar en un rango de 25%-100% (v/v).

El medio de cultivo de la presente invención puede contener, opcionalmente, otros
35 componentes que ayuden al crecimiento óptimo de las bacterias, tales como extracto de levadura, K₂HPO₄, glucosa, entre otros. El experto en la materia conoce que

concentraciones de estos componentes se deben utilizar para obtener un medio óptimo de crecimiento bacteriano.

Una ventaja adicional del procedimiento de la presente invención, es que no es necesario realizar una etapas adicionales de purificación o de formulación final del producto; es decir, que el producto directamente colectado tras la fermentación es adecuado para su uso como promotor del crecimiento vegetal.

El proceso de cultivo de la bacteria *Pseudomonas putida* de la presente invención consiste en inocular un bioreactor que contenga el medio mencionado anteriormente con entre un 5-10% (v/v) de un inóculo crecido durante 8-24 h. Durante todo el cultivo se mantiene una temperatura entre 20-30°C, una agitación variable según demanda de oxígeno disuelto, un nivel de oxígeno disuelto entre 20-40% y un pH entre 6,0 y 9,0. La duración del cultivo es variable en función de la tasa de crecimiento observada. Alcanzada la concentración celular deseada el cultivo se para y se envasa directamente el producto en recipientes estériles.

Con el procedimiento de la presente invención es posible obtener al menos 10^6 células/mL, preferentemente entre 10^6 y 10^9 células/mL. Con una concentración de al menos 10^6 células/mL, el producto obtenido una vez aplicado a cultivos agrícolas muestra sus propiedades promotoras del crecimiento vegetal. Además, el producto presenta una estabilidad en tiempo real y a una temperatura de 4°C en cuanto a células viables y pH de al menos de 75 días sin necesidad de utilizar un conservante. Opcionalmente, se puede utilizar un conservante y por consiguiente la estabilidad del producto sería significativamente mayor.

La presente invención también se refiere al uso de la composición promotora del crecimiento vegetal que comprende la bacteria *Pseudomonas putida* obtenida mediante el procedimiento mencionado anteriormente para incrementar la productividad del cultivo de vegetales. Por ejemplo, dichos cultivos vegetales pueden ser tomates, acelgas y lechugas, entre otros. La composición de la presente invención también puede aplicarse en otros cultivos tales como cereales, frutales y plantas ornamentales.

Además, la composición promotora del crecimiento vegetal que comprende la bacteria *Pseudomonas putida* obtenida mediante el procedimiento mencionado anteriormente puede utilizarse para el mantenimiento de césped. Por ejemplo, dicho césped puede ser el césped de un campo de golf.

Por último, la presente invención también se refiere al uso del lactosuero o la melaza como medio de cultivo de microorganismos promotores del crecimiento vegetal.

La invención se describe a continuación en referencia a las figuras adjuntas en las que:

5 - La figura 1 es una gráfica que muestra el crecimiento en el tiempo de la bacteria *Pseudomonas putida* en un reactor de 2L en tres medios diferentes: lactosuero pretratado + 7,5 g/L de extracto de levadura; melaza 0,5% (v/v) + 0,5 g/L de extracto de levadura; y el medio comúnmente utilizado para el crecimiento de *Pseudomonas putida* (extracto de carne (1g/L), extracto de levadura (2g/L), peptona (5g/L), NaCl (5g/L), H₂O destilada (1L)).

10 - La figura 2 es un estudio de estabilidad a una temperatura de 4°C del producto colectado tras la fermentación, en el que se midió tanto el número de células viables como el pH.

Para una mejor comprensión, la presente invención se describe a continuación en referencia a los siguientes ejemplos, que en ningún caso pretenden ser limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS

20 Ejemplo 1. Comparación entre los procedimientos de obtención de *Pseudomonas putida* utilizando el medio M.Común, y medios conteniendo lactosuero y melaza.

La cepa de *Pseudomonas putida* utilizada fue la cepa bacteriana depositada con el número de acceso CECT 7881 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

25 Medios de cultivo:

Medio M.Común (medio recomendado por CECT para el cultivo de *Pseudomonas putida*): extracto de carne (1g/L), extracto de levadura (2g/L), peptona (5g/L), NaCl (5g/L), H₂O destilada (1L).

30 Medio lactosuero 1: lactosuero 100% + 7,5 g/L de extracto de levadura.

Medio melaza: melaza 0,5% (v/v) + 0,5 g/L de extracto de levadura.

35 Para los estudios, se utilizó un biorreactor Biostat-A-er (Sartorius Stedim, Alemania) de 2 Litros. Los resultados se muestran en la figura 1. Se observa que en todos los medios

utilizados la bacteria presentó un crecimiento adecuado, alcanzando en todos los casos una concentración celular por encima de 5×10^8 cel/ml a las 29 horas de cultivo.

Ejemplo 2. Estudio de estabilidad del producto obtenido en el Ejemplo 1.

5

Al producto obtenido mediante el procedimiento de la presente invención en el Ejemplo 1 se le realizó un estudio de estabilidad en tiempo real a una temperatura de 4°C. Para ello se realizó un conteo celular en cámara de Neubauer hasta que la concentración celular fue inferior a 10^6 células/mL. El conteo celular fue complementado con la siembra en placa para
10 confirmar que las células contadas eran viables. También se controló el pH, para determinar si éste se encontraba en valores óptimos para la bacteria. Los resultados se muestran en la figura 2 y demuestran que el producto es estable al menos durante 75 días en estas condiciones.

15 Ejemplo 3. Aplicación del producto obtenido según el procedimiento de la presente invención en cultivos de acelgas.

En primer lugar, el producto obtenido mediante el procedimiento del Ejemplo 1 se llevó hasta una concentración de 10^8 células/mL. Se aplicaron 3 dosis diferentes de 3, 6 y 9 mL,
20 respectivamente, a plántulas de acelgas tipo “delta” un día antes de su trasplante, para que el producto llegara a todo el volumen de tierra de cada plántula, fijándose así por toda la raíz. Una vez sembradas se aplicaron dosis de 6, 12 y 18 mL, respectivamente, mediante pipetas Pasteur de 3mL, cada quince días, para un total de 3 aplicaciones. Para cada dosis se utilizaron 5 plantas y 15 plantas de control, a las que se le aplicó solamente agua. Se
25 contabilizó el peso fresco, el volumen de la planta sin raíz y el peso seco de cada una de ellas.

Con la dosis 2 se obtuvieron los mejores resultados, presentando las acelgas “delta” un incremento de peso con respecto al peso medio del grupo de control del 34,8%. El
30 incremento de la materia seca de esta dosis respecto al grupo de control fue del 8,7%.

Ejemplo 4. Aplicación del producto obtenido según el procedimiento de la presente invención en cultivos de tomate.

35 El mismo procedimiento del ejemplo anterior se realizó utilizando tomateras de tipo “raf”. En este caso, cada dosis contenía 10 plantas a estudiar y se compararon con un total de 30

plantas de control, a las que solamente se les aplicó agua. Además, en este caso se esperó hasta la obtención de los frutos para valorar diferentes parámetros de productividad.

Se contabilizó el número de tomates maduros por planta semanalmente. Se obtuvieron unos incrementos en relación a las plantas de control de 69'74% (dosis 2) durante tres meses.

Además, el mismo procedimiento del ejemplo anterior se realizó utilizando tomateras de tipo "pera". En este caso, cada dosis contenía 4 plantas a estudiar y se compararon con un total de 12 plantas de control, a las que solamente se les aplicó agua. Además, en este caso se esperó hasta la obtención de los frutos para valorar diferentes parámetros de productividad.

Se contabilizó el número de tomates maduros por planta semanalmente. Se obtuvieron unos incrementos en relación a las plantas de control de 34'69% (dosis 2) durante un mes.

Ejemplo 5. Aplicación del producto obtenido según el procedimiento de la presente invención en cultivos de lechuga.

El procedimiento de los ejemplos anteriores se repitió utilizando lechugas de tipo "larga", que presentaron un incremento de peso del 40,03%, (dosis 1). El volumen se incrementó un 25,57% (dosis 1).

Ejemplo 6. Aplicación del producto obtenido según el procedimiento de la presente invención en un campo de golf.

Se utilizó el campo de golf del Club de Golf Llaneras (Cataluña, España). Se delimitaron 16 cuadrados de 0'5x0'5 m (0,25 m²) a los que se le aplicó una dosis de 10⁷ células/mL por cada cuadrado de la composición promotora del crecimiento vegetal que comprende la bacteria *Pseudomonas putida* obtenida mediante el procedimiento de la presente invención antes indicado, y 16 cuadrados iguales de control a los que se les aplicó agua.

Se recogieron diferentes muestras de tierra para analizar al cabo de un mes con una sola aplicación del producto. Las pruebas analíticas realizadas en el laboratorio fueron: determinación del pH, determinación de carbonatos mediante calcímetro de Bernard; determinación nitrógeno total mediante el método Kjeldahl, y fósforo asimilable mediante el método Olsen-Watanable.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes. El pH se estabilizó en el césped tratado pasando de 9,07 a 8,3. El nitrógeno medido por el método de Kjeldahl aumentó un 45,7% y el nitrógeno amoniacal aumentó un 49,0%. Además, el fósforo asimilable se redujo un 53,4% en el césped tratado por asimilación del césped.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de una composición promotora del crecimiento vegetal que comprende la bacteria *Pseudomonas putida*, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
 - a) cultivar la bacteria *Pseudomonas putida* en un medio de cultivo que comprende un desecho industrial; y
 - b) coleccionar el cultivo obtenido y conservarlo a 4°C.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque el desecho industrial es lactosuero.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque el desecho industrial es melaza.
4. Procedimiento, según la reivindicación 2, caracterizado porque comprende una etapa adicional de tratamiento previo del lactosuero.
5. Procedimiento, según la reivindicación 2, caracterizado porque la concentración del lactosuero en el medio de cultivo está en el rango entre 25%-100% (v/v).
6. Procedimiento, según la reivindicación 2, caracterizado porque la concentración de melaza en el medio de cultivo está en el rango entre 0,1 -5% (v/v).
7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque opcionalmente comprende otros componentes tales como extracto de levadura, K₂HPO₄, glucosa, entre otros.
8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la etapa de cultivo se realiza a una temperatura entre 20-30°C, una agitación variable según demanda de oxígeno disuelto, un nivel de oxígeno disuelto entre 20-40% y un pH entre 6,0 y 9,0.
9. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque en dicho procedimiento se obtienen al menos 10⁶ células/mL.

10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicha composición promotora del crecimiento vegetal obtenida es estable a 4°C durante al menos 75 días.
- 5 11. Uso de la composición promotora del crecimiento vegetal que comprende la bacteria *Pseudomonas putida* obtenida mediante el procedimiento según las reivindicaciones 1 a 10, para incrementar la productividad del cultivo de vegetales.
12. Uso, según la reivindicación 11, caracterizado porque dichos vegetales son tomates.
- 10 13. Uso, según la reivindicación 11, caracterizado porque dichos vegetales son acelgas.
14. Uso, según la reivindicación 11, caracterizado porque dichos vegetales son lechugas.
- 15 15. Uso de la composición promotora del crecimiento vegetal que comprende la bacteria *Pseudomonas putida* obtenida mediante el procedimiento según las reivindicaciones 1 a 10, para el mantenimiento de un césped.
- 20 16. Uso, según la reivindicación 15, caracterizado porque dicho césped es el césped de un campo de golf.

Crecimiento *Pseudomonas putida*

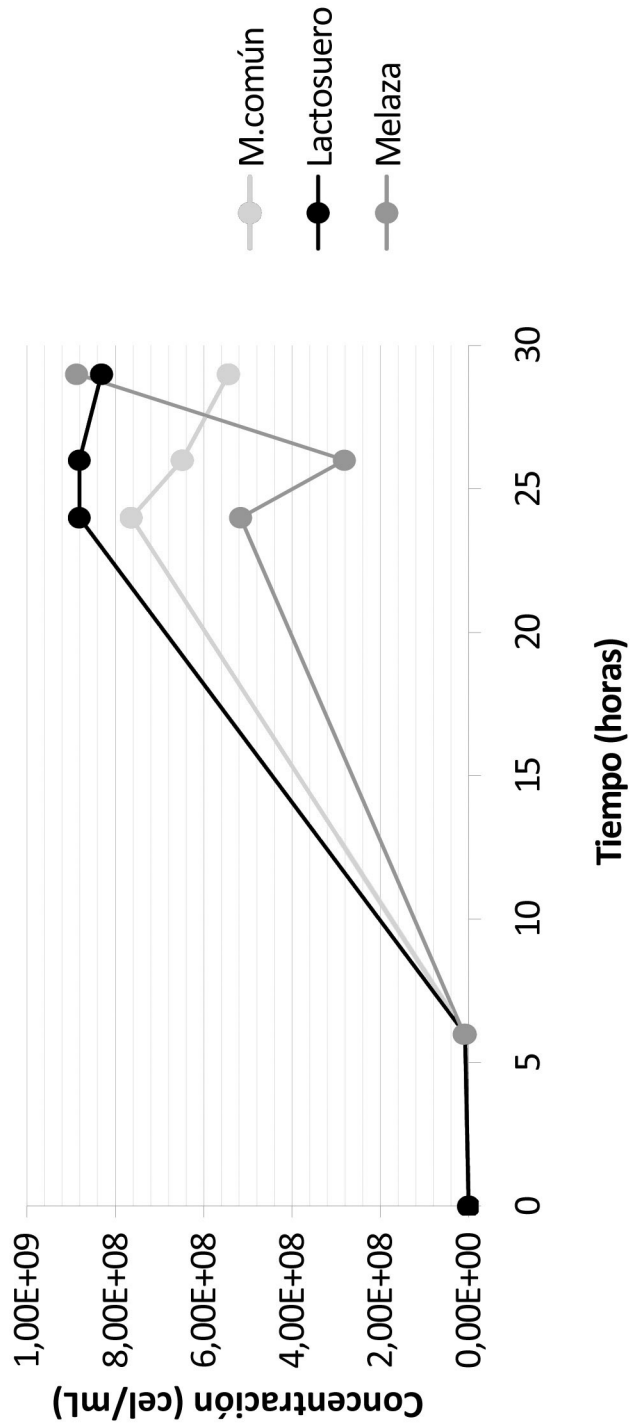


Figura 1

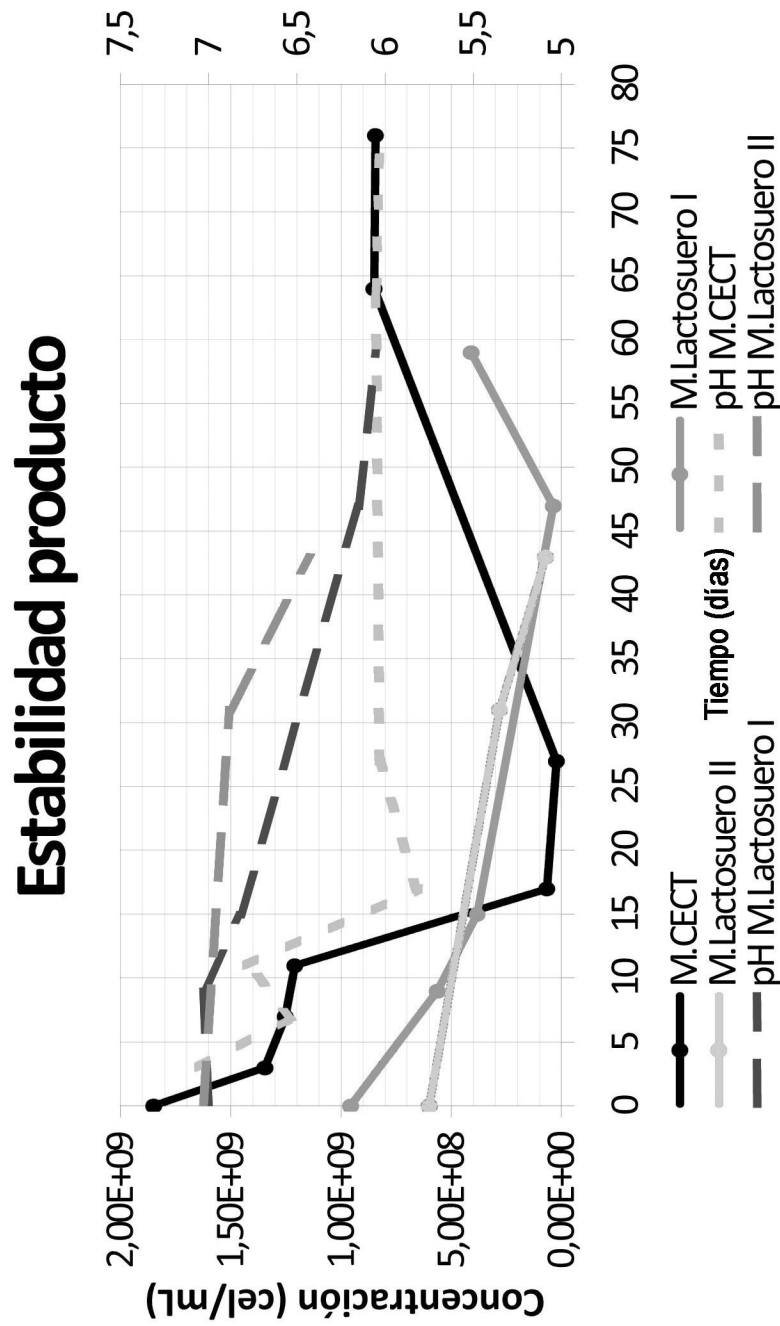


Figura 2



- ②① N.º solicitud: 201630562
②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.04.2016
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C05F5/00** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2338958 A1 (SARL FRANCE CHAMPAGNE APPROVISIONNEMENT) 13.05.2010, descripción.	1-16
A	KR 960002865B B1 (KANG HYUNG MO et al.) 27.02.1996, (resumen). Recuperado de EPOQUENET. Base de datos WPI.	1-16
A	WO 2011119112 A1 (BIOMAX TECHNOLOGIES PTE LTD et al.) 29.09.2011, reivindicaciones.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
25.05.2016

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01P, C05F

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.05.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2338958 A1 (SARL FRANCE CHAMPAGNE APPROVISIONNEMENT)	13.05.2010
D02	KR 960002865B B1 (KANG HYUNG MO et al.)	27.02.1996
D03	WO 2011119112 A1 (BIOMAX TECHNOLOGIES PTE LTD et al.)	29.09.2011

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (artículos 6 y 8 LP11/86)**

En las reivindicaciones 1-10 de la solicitud de patente se reivindica un procedimiento de obtención de una composición promotora del crecimiento vegetal que comprende la bacteria *Pseudomonas putida*, caracterizado porque comprende las siguientes etapas: a) Cultivar la bacteria *Pseudomonas putida* en un medio de cultivo que comprende un desecho industrial; b) coleccionar el cultivo obtenido y b) coleccionar el cultivo obtenido y conservarlo a 4°C.

En las reivindicaciones 11-16 de la solicitud de patente se reivindica el uso de la composición promotora del crecimiento vegetal que comprende la bacteria *Pseudomonas putida* obtenida mediante el procedimiento según las reivindicaciones 1 a 10, para incrementar la productividad del cultivo de vegetales así como para el mantenimiento del césped.

El documento D01 divulga la fabricación de una enmienda de abono a base de azufre asociada a capas de *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* y *Trichoderma harzianum* y que se presenta en forma de granulados. Los ingredientes que constituyen el componente abiótico de la enmienda del abono son dolomía, kainita y melaza. Esta mezcla tal y como indica el documento D01 tiene un valor neutralizante adaptado a la supervivencia e incluso a la multiplicación de los microorganismos añadidos.

El documento D02 muestra un fertilizante que comprende residuos y diferentes tipos de microorganismos entre los que se encuentra *Pseudomonas putida*.

El documento D03 indica un procedimiento para tratar residuos orgánicos con diferentes géneros de microorganismos entre los que se encuentra *Pseudomonas* sp. que posteriormente podrán ser empleados como fertilizantes.

En ninguno de los documentos citados se refleja un procedimiento como el reivindicado en la solicitud de patente. Por tanto, las reivindicaciones 1-16 de la solicitud de patente presentan novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la LP11/86.