

Facultad de Química.  
Universidad de la República

# Estudio del potencial biocatalítico de plantas aromáticas y su comunidad endófitas.

Tutora: Dra. Paula Rodríguez

Co-tutora: Sonia Rodríguez

Bach. Facundo Marconi

30 de Junio de 2015

## Agradecimientos.

Agradezco a mis padres, mi hermana y mi novia, que me apoyaron durante toda la carrera y siempre me dieron para adelante para que terminara.

A mi familia que siempre apoyo y estuvo presente, tanto la de Uruguay como la de Argentina.

A mis compañeros de laboratorio que aguantaron largos monólogos de temas variados (desde como pegarle a la pelota en el FIFA15 hasta "estas bacterias no están dando ningún resultado) Lari, Choni, Agus, Cesar, Diego, Emi, Ale, Luis y Edgar.

A David, Sonia y Paula que me ayudaron en este proceso, me acompañaron y apoyaron cuando surgieron dudas y me aguantaron cuando las cosas no salían durante estos años. Y siempre me tuvieron confianza durante este proyecto.

A Pilar que con su amor violento siempre tiene la palabra justa y logro aguantarme estos años en el laboratorio.

A mis amigos de la vida, que aunque muchas veces no nos vemos, ellos están ahí.

A mis compañeros de facultad, con los que compartimos muchas cosas (fiestas, estudiar, fiestas, clases, fiestas, exámenes) Pato, Iva, Ale, Rut, Vale.

A mis compañeros scout que más de una vez se tuvieron que aguantar que no fuera a las reuniones por LA TESIS.

## Contenido

Introducción.....	4
Biotatálisis.....	4
La biotatálisis como herramienta.....	6
Enzimas aisladas.....	6
Microorganismos.....	7
Vegetales.....	8
Microorganismos endófitos en biotatálisis.....	9
Carvona como sustrato modelo en la búsqueda de actividad biocatalítica.....	11
Enzimas con actividad enoatoredutasa.....	11
Carvona como sustrato modelo.....	11
Introducción al trabajo.....	13
Metodología.....	14
Aislamiento de microorganismos endófitos:.....	14
Evaluación de la actividad reductasa frente a R-Carvona en las cepas endófitas aisladas.....	15
Cromatografía gaseosa.....	15
Identificación de bacterias:.....	16
Pruebas bioquímicas.....	16
Estudio filogenético.....	16
Visualización y determinación de tamaños de los productos de amplificación:.....	17
Secuenciación de los genes del ARN ribosomal 16S.....	17
Análisis filogenético:.....	17
Biotransformación de S- y R-Carvona.....	18
Estudio del sistema enzimático frente a R-carvona en las bacterias seleccionadas.....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
Aislamiento de microorganismos endófitos:.....	19
Evaluación de la actividad reductasa frente a S-carvona en los ensayos a-d:.....	19
Evaluación de la actividad reductasa frente a S-Carvona en las cepas endófitas aisladas:.....	21
Identificación de bacterias:.....	22
Biotransformación de S- y R-carvona mediante las bacterias <i>Pseudomonas</i> sp y <i>Bacillus</i> sp.....	22
Estudio del sistema enzimático involucrado en la biotransformación de R-carvona mediante <i>Pseudomonas</i> sp. y <i>Bacillus</i> sp.....	23
Estudio del sistema enzimático responsable de la biotransformación de R-carvona en la cepa <i>Pseudomonas</i> sp. FM18Mci1.....	24
Estudio del sistema enzimático de la biotransformación de la R-carvona en la cepa <i>Bacillus</i> sp. FM18Mci1.....	25

Conclusión:.....	27
Bibliografía .....	28
ANEXO.....	33

# Introducción.

## Biocatálisis.

En los últimos años la biocatálisis se ha hecho un lugar en el mundo de las reacciones químicas de la industria, el gran incremento en el uso de estos procesos a nivel industrial se debe a las ventajas que presenta la biocatálisis:

- ❖ la eficiencia y selectividad de las enzimas como catalizadores
- ❖ la posibilidad de desarrollar procesos ambientalmente sustentables

Los biocatalizadores son ambientalmente amigables debido a sus condiciones de reacción suaves (pH cercano al neutro, temperatura ambiente) y al uso de solventes no contaminantes (agua normalmente) así como reactivos biodegradables [1].

Adicionalmente, el empleo de estas condiciones minimiza los problemas de formación de subproductos por reacciones colaterales, tales como isomerización, racemización y rearrreglos, lo cual es muy frecuente en síntesis orgánica clásica, siendo esto una ventaja importante [1,2].

Las enzimas son catalizadores, por lo tanto aceleran las reacciones no afectando el equilibrio termodinámico. Muestran muy alta eficiencia como catalizadores y exquisita selectividad (quimioselectividad, regioselectividad y diastereoselectividad, y enantioselectividad).

Las moléculas pueden tener varios grupos funcionales, una enzima generalmente reacciona con uno solo de esos grupos funcionales, esto refiere a la *QUIMIOSELECTIVIDAD*.

Muchas veces las moléculas tienen dos o más grupos funcionales similares o idénticos en reactividad en diferentes regiones de la molécula, las enzimas pueden diferenciar esos grupos funcionales y reaccionar con uno específicamente, o sea, reconocen las moléculas por su estructura 3D. Esto se conoce como *REGIOSELECTIVIDAD* [1].

Las enzimas pueden reconocer quiralidad o proquiralidad en un sustrato, llevando a la formación de un estereoisómero sobre todos los que pueden formarse en la reacción, esto se denomina *ESTEREOSELECTIVIDAD* [1].

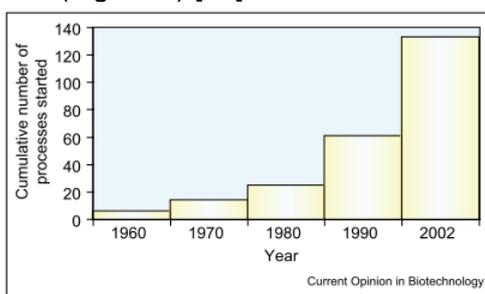
Dado que las reacciones enzimáticas son altamente selectivas, son muy útiles en la industria farmacéutica y de agroquímicos, porque mediante ellas pueden obtenerse compuestos ópticamente puros. Esto es de suma importancia dado que dos isómeros ópticos de una misma molécula pueden presentar efectos biológicos totalmente diferentes.

El primer caso donde quedo claro la importancia de los compuestos ópticamente puros fue el que se dio entre los años 1958 y 1963, con el uso del medicamento talidomida en embarazadas. Debido a este medicamento muchos niños nacieron con diferentes problemas de malformación. La causa de este terrible efecto se debió a que el medicamento comercial no era ópticamente puro. Se descubrió que el enantiómero *S*-talidomida tiene un efecto teratogénico, mientras que la *R*-talidomida tiene el efecto sedante que se utiliza para disminuir las náuseas en las embarazadas [3-5].

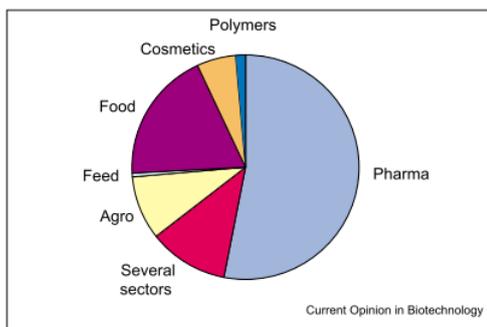
En agroquímicos también es importante la pureza óptica, debido a que muchas veces el isómero que no es biológicamente activo tiene mayor persistencia en el medio ambiente, siendo un contaminante [6].

Una de las primeras reacciones biocatalíticas descritas corresponde a la resolución del racemato ácido ( $\pm$ )- tartárico mediante el hongo filamentoso *Penicillium glaucum*. En esta reacción biocatalítica, que fue llevada a cabo en el año 1958 por Louis Pasteur, se obtuvo el ácido (-)-tartárico enantioméricamente puro debido a la degradación enzimática de la forma del ácido (+)-tartárico [7]. La resolución quiral del ácido tartárico racémico por las células microbianas no sólo ha sido de interés científico para el estudio de sistemas de biodegradación y de biosíntesis sino que también despertó el interés en el área de la química orgánica para explorar el uso de biocatalizadores (células microbianas y enzimas) en reacciones de síntesis [8].

La importancia de obtener compuestos ópticamente puros en la industria farmacéutica, hace que la biocatálisis venga creciendo con el paso de los años, ganándose un lugar importante [9-10]. Straathof y colaboradores muestran un incremento en el empleo de procesos biocatalíticos a nivel industrial entre los años 1960 al 2002. En la figura 1, se observa el aumento correspondiente a esos años, de menos de una decena de procesos biocatalíticos a más de 130 en procesos industriales [11]. De hecho, más de 100 procesos biocatalíticos ya se han desarrollado a escala industrial [6], siendo la industria farmacéutica donde se emplean la mayor cantidad de procesos biocatalíticos a gran escala (Figura 2) [11].



**Figura 1.** Total acumulado de procesos biocatalíticos que han alcanzado la etapa industrial entre los años 1960 y 2002 [11].



**Figura 2.** Sectores de la industria donde son usadas las biotransformaciones (basado en 134 procesos)

## La biocatálisis como herramienta.

En la biocatálisis se puede usar diferentes biocatalizadores:

- Enzimas aisladas
- Vegetales
- Bacterias, levaduras y hongos

### Enzimas aisladas.

La "Enzyme Commission" clasifica las enzimas en base a un número de 4 dígitos, donde el primer dígito es el tipo de reacción que la misma cataliza (tabla 1).

**Tabla 1.** Tabla de clasificación de enzimas según la Enzyme Commission.

EC numero	Clase de la enzimas	Rección
1.x.x.x	Oxidoreductasas	Oxido-reducción: oxigenación de C-H, C-C, C=C enlaces, o eliminación o adición de átomos de hidrógenos
2.x.x.x	Transferasas	Transferencia de grupos: aldehidos, cetonas, acil, azucar, forforilo o metilo
3.x.x.x	Hidrolasas	Hidrolisis-formación de esters, amidas, lactones, eoxidos, nitrilos, anhídridos, glucosidos.
4.x.x.x	Liasas	Adición/eliminación de pequeñas moléculas en C=C, C=N, C=O enlaces.
5.x.x.x	Isomerasas	Isomerización como racemización, epimerización.
6.x.x.x	Ligasas	Formación-escisión de C-O, C-S, C-N, C-C enlaces con escisión de trifosfato.

El uso de enzimas aisladas reduce el número de pasos necesarios para llegar al producto final en comparación con metodologías no biocatalíticas, debido a que no son necesarios los pasos donde se agrega un grupo protector a la molécula para evitar reacciones secundarias, lo cual es importante en la industria debido a la reducción en los tiempos y en los costos [12].

Asimismo, su uso resulta más ventajoso que la biocatálisis con células enteras o cultivos celulares pues se evitan las reacciones secundarias debidas a la presencia de otras enzimas, el proceso resulta sumamente eficiente y selectivo, y la purificación posterior de los productos de reacción es más sencilla.

Las enzimas aisladas han tenido amplia aplicación en síntesis, sobre todo las enzimas hidrolíticas como proteasas, lipasas o epóxido hidrolasas. En el caso de enzimas que requieren cofactores, el costo de los mismos ha sido un obstáculo para la utilización de enzimas aisladas, si bien se han desarrollado procesos eficientes de regeneración de cofactores [1].

Entre las desventajas asociadas a la biocatálisis con enzimas aisladas, se encuentran que la mayoría actúa sólo en medio acuoso, no pueden actuar fuera de la célula y/o

aceptan bajas concentraciones del sustrato ya que con altas concentraciones del mismo su rendimiento puede disminuir. La restringida especificidad de sustrato asociado con algunas enzimas también ha sido señalada como desventaja [13-15].

Sin embargo, hay enzimas que tienen la capacidad de biotransformar varios sustratos, por ejemplo la enzima SYE-4 de *Shewanella yellow* que reduce dobles enlaces carbono-carbono, muestra un gran potencial biocatalítico ya que actúa sobre sustratos tales como cetonas cíclicas insaturadas, diésteres e imidas sustituidas [16].

Cuando las reacciones se vuelven más complejas, donde se necesiten varios pasos de reacción el uso de enzimas aisladas es más complicado y se vuelve más común el uso de cultivos celulares [17, 18].

Hay algunas excepciones de enzimas que no pueden ser utilizadas en medio acuoso, como es el caso de las lipasas, por lo cual es necesario el uso de técnicas de inmovilización de enzimas para lograr usarlas en medio acuoso, esto implica la unión de la enzima sobre materiales de apoyo sólidos inertes [19, 20]. Se han estudiado diferentes formas de inmovilizar las enzimas, con diferentes estrategias de inmovilización [19, 21].

La inmovilización de la enzima mejora la actividad de la enzima, comparada con la actividad de la enzima libre, además de dar mayor estabilidad a la enzima, facilitando su recuperación y permitiendo también reusar las enzimas por varios ciclos de reacción [22-23].

Por otra parte, muchas enzimas muestran baja actividad en solventes orgánicos debido a la agregación de enzimas en los mismos, donde se da el secuestro del sitio activo bajando la actividad de las enzimas [24], por lo que el uso de enzimas inmovilizadas también es de utilidad a la hora de trabajar con este tipo de solventes debido al efecto de protección de la enzima del medio polar [22, 23].

### Microorganismos

El uso de enzimas aisladas tiene muchas ventajas, pero es un proceso costoso sobre todo por la necesidad de purificar la enzima y por el requerimiento de cofactores. Por esto, si bien es común el uso de enzimas hidrolíticas como enzima aislada, muchas reacciones biocatalíticas se llevan a cabo con células enteras. Las células aportan la fuente de biocatalizador así como los cofactores necesarios para la reacción [1].

Entre las células enteras, los cultivos microbianos son sencillos y económicos, aseguran un rápido crecimiento, pueden utilizar un espectro amplio de sustratos y son sencillos de mantener (comparado con células vegetales y animales) [25].

La aplicación de los organismos microbianos en biotecnología tiene una larga historia, especialmente la producción de aminoácidos, ácidos orgánicos, alcoholes y proteínas, a partir de fuentes de carbono como la glucosa a través de fermentaciones tradicionales ha sido implementada con éxito y está muy extendida en la industria [26].

Los microorganismos han extendido su uso en la biocatálisis, desde los primeros usos con Pasteur [5] como se mencionó anteriormente hasta el día de hoy. Uno de los microorganismos más utilizados en química orgánica, debido a que ha sido ampliamente estudiado para la producción de alcoholes quirales, y a su fácil manipulación, es la levadura de panificación *Saccharomyces cerevisiae* [1]. Se han descrito muchísimos microorganismos con aplicación en una amplia variedad de reacciones, pero no han tenido tanto éxito como otro tipo de catalizadores debido a la reticencia del químico orgánico de tener que manejar cultivos microbianos [1].

Un área de particular interés en el campo de las reacciones redox es la reducción de dobles enlaces C-C. Las enzimas involucradas en estos procesos son enoatoreductasas (ER) NADP(H) dependientes, las cuales reducen selectivamente dobles enlaces C-C en carbonilos de compuestos  $\alpha,\beta$ -insaturados o nitrilos, y por tanto pueden ser utilizados para la síntesis de aldehídos, cetonas, ésteres y nitrilos enantioméricamente puros [27].

Si bien ER de *Saccharomyces carlsbergensis*, también denominada Old Yellow Enzyme (OYE), fue aislada en 1933 [28], el uso de ERs como biocatalizadores en la reducción estereoselectiva de doble enlace C-C es aún incipiente. La gran mayoría de las biotransformaciones llevadas a cabo mediante ER se han realizado mediante células en crecimiento [29-37] siendo la levadura de panificación *Saccharomyces cerevisiae* ampliamente utilizada tanto en la industria como en la investigación en la reducción de dobles enlaces carbono-carbono debido a tener un alto grado de enantio-, regio- y quimioselectividad [38].

El escaso conocimiento que hay en cuanto a la diversidad microbiana [39], permite suponer que hay un gran potencial en los microorganismos. Sumado a esto hay un gran número de nichos poco explorado, como es el caso de los microorganismos extremófilos marinos, estos microorganismos pueden soportar temperaturas, salinidad y presiones extremas, siendo de gran interés para los procesos biotecnológicos [40].

Otro nicho poco explorado es el de los microorganismos endófitos, en el cual se centrará el presente trabajo.

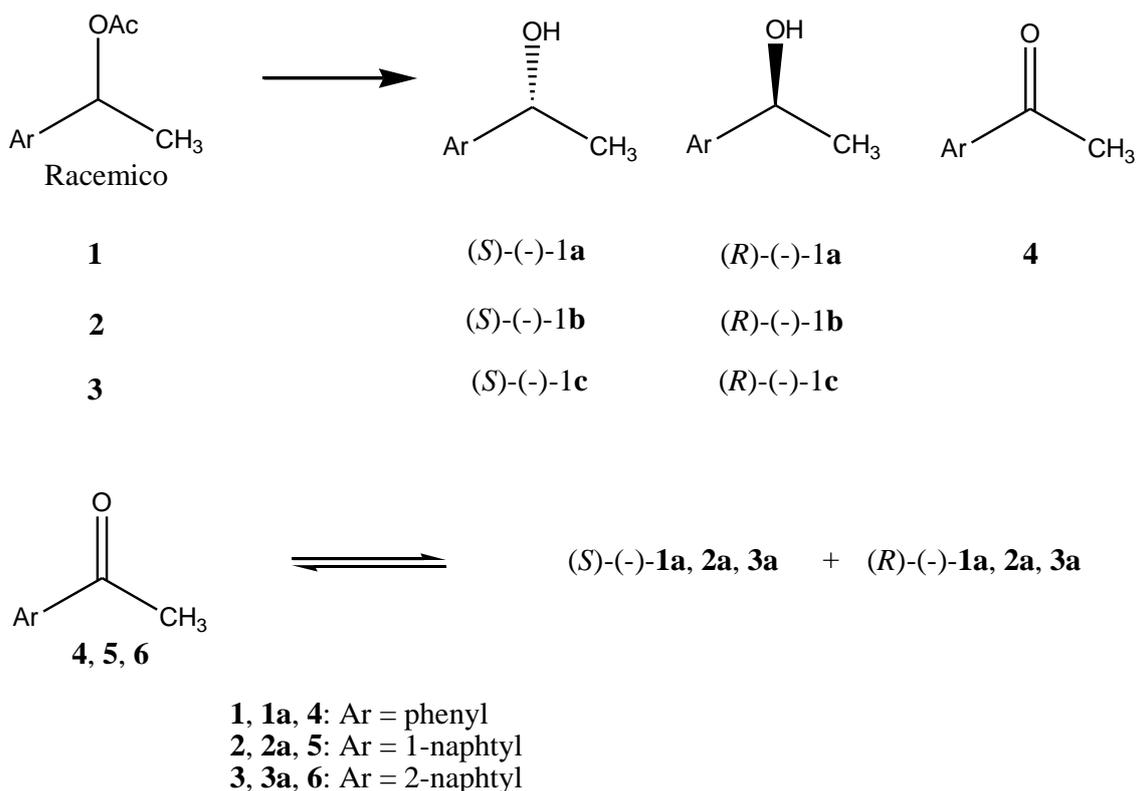
### Vegetales

Otra forma en la que se han utilizado biocatalizadores de célula entera, es el uso de partes frescas de vegetales. Uno de los primeros ejemplos en este sentido lo constituye el uso de *Daucus carota* (zanahoria) como biocatalizador para la reducción de cetonas proquirales a su alcohol quiral correspondiente. Este proceso tiene elevados rendimientos (60% – 95%) y una enantioselectividad de entre 76% - 99%, dando los alcoholes de configuración Prelog como producto mayoritario, por lo tanto el uso de *Daucus carota* es un proceso práctico y eficiente para la obtención de estos alcoholes [41].

Otros reportes han utilizado raíces de *Manihot esculenta* y *Manihot dulcis* (mandioca) para reducir cetonas, aldehídos alifáticos y aromáticos. Estas reducciones dan un altos rendimientos (entre 80% - 96%) y un excelente exceso enantiomérico de 94% - 98%, dando como producto mayoritario los alcoholes S [42].

Estos dos casos demuestran el potencial que tienen las plantas en biocatálisis y a su vez queda claro que hay una preferencia en estereoselectividad por el producto que cumple la regla de Prelog [43].

El primer reporte de biocatálisis con trozos de vegetales es un trabajo de Wanda K. Maczka y Agnieszka Mironowicz en el cual realizaron las hidrólisis de los compuestos **1-3** de la figura 3 utilizando como biocatalizador raíces de *Daucus carota*, *Apium graveolens* y *Armoracia lapathifolia*. Los resultados son variados, siendo *Daucus carota* la que muestra siempre la mejor conversión de los acetatos [44].



**Figura 3.** Sustratos utilizados para obtener los respectivos alcoholes quirales utilizando vegetales como biocatalizadores.

Posteriormente otros autores utilizaron *Daucus carota* para la biorreducción de cetonas proquirales [45, 46]. Estos ensayos llevaron a pensar que tal vez no eran las células vegetales las que realizaban las reacciones, sino que era la comunidad de microorganismos que vivían dentro del vegetal (microorganismos endófitos), o bien podrían ser ambos. En ensayos realizados en el Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformación de la Facultad de Química, UdelaR, en el año 2007, se aislaron microorganismos endófitos de *D. carota*, para comprobar si los mismos podían realizar las mismas reacciones que la planta, comprobándose no solo que se aislaban microorganismos con la misma actividad, sino que la adición de inhibidores microbianos alteraba los resultados de la reacción evidenciando la participación de los microorganismos endófitos en la misma [47].

#### Microorganismos endófitos en biocatálisis.

Los endófitos son los microorganismos que viven dentro de los tejidos vegetales presentando una relación simbiótica con la planta hospedera, proporcionando protección y condiciones de supervivencia a la planta mediante la producción de compuestos, que la protegen de la depredación por herbívora o bien disminuyen el número de plagas en la planta. Los microorganismos endófitos también actúan protegiendo a la planta de estrés biótico o abiótico [48, 50].

Los metabolitos secundarios producidos por los endófitos pueden estar relacionados con rutas metabólicas de la planta hospedera, lo cual puede deberse a la coevolución entre el endófito y la planta y a la incorporación de material genético de la planta, dando una mejor adaptación al medio [48].

Esta característica de los microorganismos endófitos ha hecho que la industria este

cada vez más interesada en el potencial que muestran los mismos, ya que muchos de los productos utilizados por la industria farmacéutica y alimenticia, vienen de plantas [49-50], por lo cual buscar microorganismos endófitos que logren producir o metabolizar estos compuestos es de suma importancia.

El desarrollo de esta área tiene su origen en el descubrimiento del paclitaxel. Este compuesto, aislado a partir de la corteza de *Taxus brevifolia* [53] es una droga sumamente importante en el tratamiento de cáncer. Se aislaron y se caracterizaron microorganismos endófitos presentes en la corteza de *Taxus brevifolia* y se estudió la producción de Taxol mediante estos microorganismos [54], aislándose el primer hongo productor de Taxol [9]. Este antecedente sentó las bases de una nueva área: la producción de metabolitos secundarios de plantas por microorganismos endófitos [10-14].

Otro ejemplo es la producción de vincristina a partir de vinblastina (droga aislada de la planta *Catharanthus roseus*), siendo la primera una droga de mayor valor pero menos abundante, ambas drogas son utilizadas en el tratamiento de cáncer. La bioconversión se realiza usando el hongo *Fusarium oxysporum* aislado de la planta *Catharanthus roseus* [55].

En el área de biotransformaciones, uno de los primeros trabajos con endófitos fue el realizado por Werner, el cual aisló microorganismos capaces de metabolizar afeladrina (compuesto presente en la raíz de la planta) [56]. El mismo grupo realizó luego biotransformaciones de los compuestos 2-benzoxazolinona (BOA) y 2-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona (HBOA), productos que constituyen una barrera de defensa química en la planta, empleando el hongo endófito *Fusarium sambucinum* aislado de *Aphelandra tetraona* [57].

Por otra parte, Bastos aisló microorganismos epifíticos y endófito del árbol *Platanus orientalis* L., para emplearlos en la biotransformación de ácido botulínico y ácido betulónico, debido a sus actividades farmacológicas frente a VIH y melanoma [58].

Cuatro de los hongos aislados lograron metabolizar ambos compuestos, con estos resultados los autores argumentan que microorganismos aislados de la planta donde se encuentra el sustrato aumentan la probabilidad de obtener derivados del mismo [59].

Son pocos los trabajos que describen el uso de microorganismos endófito para ser usados en reacciones biocatalíticas. Entre las actividades enzimáticas descritas hasta el momento se encuentran lipasas y reductasas.

En lo referente a la búsqueda de nuevas lipasas, Torres y colaboradores describieron el aislamiento de microorganismos endófito a partir de plantas Mediterráneas. De esta forma obtuvieron una cepa de *Rhizopus oryzae* aislada a partir de hinojo (*F. vulgare*) con alta actividad hidrolítica y sintética [60].

Siguiendo en esta línea Oliveira y colaboradores aislaron la levadura endófito *Candida guilliermondii* de hojas ricino (*Ricinus communis*). La misma produjo lipasas extracelulares con potencial para ser utilizado en síntesis de ésteres en las industrias alimenticias, de biocombustibles o para aplicaciones de laboratorio [61].

Hay pocos trabajos realizados sobre la importancia de los endófitos en la biocatálisis, la cual es ensayada actualmente en el Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformación, arrojando resultados alentadores, donde se ve el gran potencial biocatalítico que tienen los endófitos [25, 45, 63].

Respecto a la actividad reductasa en microorganismos endófitos el primer reporte fue en 2007 donde el Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformación (LBB) describió el aislamiento de bacterias y levaduras endófitas de zanahoria para la reducción de  $\alpha$ -propargilacetato de etilo y acetofenona como sustratos modelo [63].

Posteriormente Pedrini y colaboradores describieron el uso de hongos filamentosos endófitos para la reducción enantioselectiva de cetonas proquirales. Las cuatro cepas que presentaron buena actividad fueron *Phomopsis* (FE86 y FE290), *Pestalotia* y *Epicoccum*. En todas las bio-reducciones analizadas se obtuvieron los alcoholes con configuración S en rendimientos y ee variables. Asimismo, nuestro grupo ha continuado con esta línea de trabajo, demostrando la utilidad de microorganismos endófitos aislados de ceibo (*Erythrina crista-galli*), hinojo (*Foeniculum vulgare*), zapallo (*Curcubita maxima*) y quinoto (*Fortunella margarita*), en la producción de diversos alcoholes ópticamente puros por reducción de la correspondiente cetona proquiral [25, 45, 63]

## Carvona como sustrato modelo en la búsqueda de actividad biocatalítica.

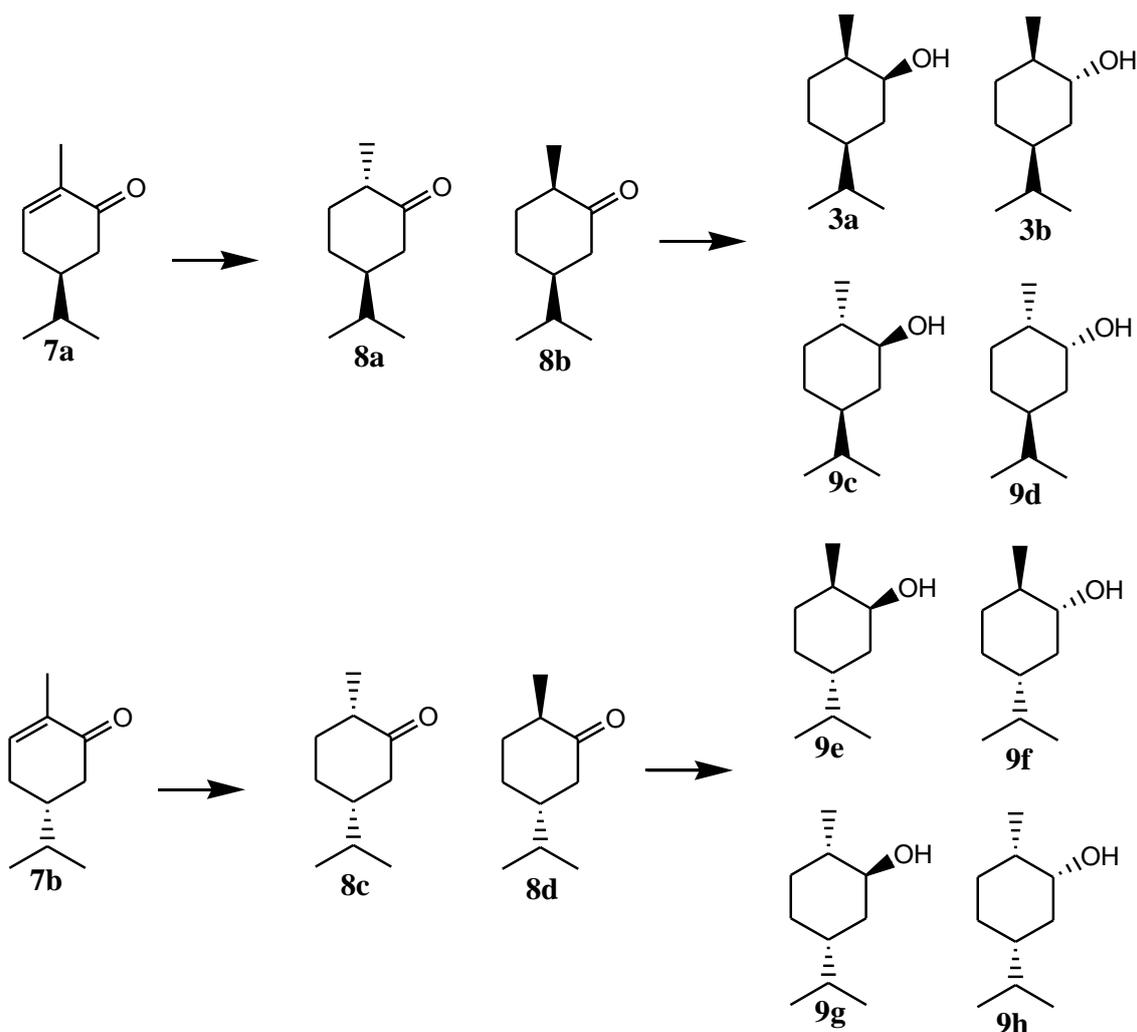
### Enzimas con actividad enoatoreductasa

Como se mencionó anteriormente, las enzimas enoatoreductasas son aquellas que reducen un doble enlace, esta actividad es de suma importancia debido a que con los métodos tradicionales es difícil reducir los dobles enlaces, además de la alta especificidad y la gran cantidad de sustratos que pueden reducir las enzimas [1], preparando así alcoholes, cetonas, ésteres y nitrilos enantioméricamente puros

### Carvona como sustrato modelo.

Los terpenos resultan de interés en biocatálisis, debido al potencial de aplicaciones que tienen los productos de biotransformación de los mismos en la industria de la perfumería [64, 65], además algunos productos tienen actividad farmacológica interesante [66, 67].

La carvona es una cetona monoterpénica sintetizada por más de 70 plantas [66]. Este terpeno se encuentra en dos formas estereoisoméricas: (4R)-(-)-carvona (**7b**) y (4S)-(+)-carvona (**7a**) (Figura 4). Algunos trabajos describen la biotransformación de este monoterpene mediante bacterias [44,69], hongos filamentosos, levaduras [68,69], cultivos vegetales [45, 61, 72] y microalgas marinas [73]. En estos trabajos se obtuvieron como productos de biotransformación cetonas saturadas, dihidrocarvonas, alcoholes saturados, dihidrocarveoles, alcoholes alílicos y carveoles lo cual evidenció la existencia de diferentes enzimas responsables de la reducción de los enlaces C=C [74, 53] y C=O [75].



**Figura 4.** Reacción de la S-carvona (**7a**) y la R-carvona (**b**) hasta los dihidrocarveoles (**9a-h**) posibles.

Los enantiómeros del compuesto dihidrocarvona (**8a-d**) son inhibidores potentes de bacterias, hongos filamentosos y presentan actividad anti-insecto [76 - 78]. Por otro lado, estos compuestos han sido utilizados como compuestos quirales para la síntesis de productos naturales tales como drogas antimalaria [79].

Los dihidrocarveoles (**9a-h**) (Figura4) se utilizan como fragancia finas en cosmética, (cremas, champús, jabones de tocador) así como en productos no cosméticos tales como limpiadores domésticos y detergentes [56].

Por otra parte, la carvona es un sustrato pasible de sufrir múltiples transformaciones enzimáticas, con lo cual constituye un sustrato modelo que permite rastrear con una única molécula varias actividades enzimáticas.

Entre estas actividades se encuentra la actividad enoatoreductasa que nos resulta de interés, la cual ya fue reportada anteriormente [80].

## Introducción al trabajo

En el presente trabajo se utilizó tanto la *R*- como la *S*-carvona como sustrato modelo en la búsqueda de microorganismos endófitos con actividad enoatoreductasa a partir de menta poleo (*Mentha pulegium*). La elección de esta planta de menta se basó en el compuesto pulegona, que está presente en forma mayoritaria en el aceite esencial de esta menta [58], y que es estructuralmente similar a la carvona (nuestro compuesto de trabajo). Los microorganismos endófitos aislados con actividad sobre la carvona fueron ensayados en su actividad biocatalítica frente a la *R* y *S*-carvona y se llevó a cabo el estudio de los sistemas enzimáticos implicados en las biotransformaciones.

Por otra parte, se estudió la incidencia de la comunidad de endófitos en las biotransformaciones de carvona utilizando hojas y tallos de menta poleo continuando de esta forma con la hipótesis de la evaluación de los microorganismos endófitos como biocatalizadores cuando se utilizan vegetales en biotransformaciones planteada en el Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones [25, 45, 61]. En este trabajo se aislaron dos microorganismos endófitos que resultaron de interés por su potencial biocatalítico.

## Metodología

### Aislamiento de microorganismos endófitos:

Se emplearon hojas de menta poleo (*Mentha pulegium*), adquirida del vivero Pachamama (Canelones - Solyamar) para realizar el aislamiento de los microorganismos endófitos

Las mismas se desinfectaron de la siguiente forma:

- 1) se sumergieron en alcohol 70% -durante 2 minutos
- 2) se lavaron con agua destilada estéril
- 3) se sumergieron en hipoclorito 5% -durante 1 minuto
- 4) se lavaron con agua destilada estéril
- 5) se sumergieron en alcohol 70% durante 1 minuto
- 6) se lavaron con agua destilada estéril

Para verificar que el proceso de desinfección fue adecuado se llevó a cabo un control del mismo, mediante impresión del material vegetal desinfectado en los medios de cultivo Tryptic Soy Agar (TSA, Sigma) y Potato Dextrose Agar (PDA, Difco). Las placas se incubaron a 28°C durante 96hs. Luego de finalizado el tiempo de incubación de las placas para el control de desinfección se verificó que el proceso fue correcto ya que no hubo crecimiento en dichas placas.

Las hojas desinfectadas se cortan, en condiciones asépticas, con un bisturí estéril descartable sobre placa de Petri estéril descartable. Los trozos de hojas de menta desinfectados se inocularon en los medios de reacción utilizados para los ensayos de prospección de actividad biocatalítica de la siguiente forma: se realizaron 4 ensayos en paralelo y por duplicado, cada uno de estos ensayos consistió en un matraz de 50mL de capacidad con agua destilada estéril (10mL) donde se colocaron 2gr (aprox.) de material vegetal; se agregó a cada matraz 5,0µL del sustrato S-carvona, sometiendo al cultivo a una presión selectiva, utilizando una bolita de saturación con 5,0µL de S-carvona [81]. Luego separamos los matraces en los siguientes ensayos según la adición de compuestos antimicrobianos:

- a) Sin inhibidores microbianos.
- b) Cloranfenicol (ver proveedor)
- c) Cicloheximida (ver proveedor)
- d) Cloranfenicol + cicloheximida.

Estos ensayos se incubaron en shaker orbital a 150 rpm y 28°C durante 96 horas, haciendo extracciones a las 24, 48 horas y 72hs.

A las 96 horas, tiempo final de los experimentos, se procedió a realizar un recuento de viables realizando siembra en superficie en medios TSA (Tryptic Soy Agar, Sigma) de diluciones apropiadas de los cultivos. Para ello se realizaron diluciones para estandarizar las suspensiones microbianas con la escala 1 de Mac Farland ( $1,0 \times 10^8$  UFC). Una vez que se estandarizaron todos los inóculos se realizaron diluciones seriadas  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  en suero fisiológico y se sembraron 100µL de las mismas en

superficie en los medios de cultivo correspondientes.

Las placas se incubaron a 28°C y se fueron observando cada 24 horas durante 96 horas para los cultivos en TSA. Las colonias obtenidas se caracterizaron como bacterias y se procedió al aislamiento de distintas colonias, para obtener un cultivo puro, en TSA obteniéndose 13 aislamientos entre los 4 matraces (tabla 1 resultados).

Las cepas bacterianas aisladas fueron conservadas en una suspensión de glicerol 17% y depositadas en freezer a -70°C.

### Evaluación de la actividad reductasa frente a R-Carvona en las cepas endófitas aisladas.

Para obtener cultivos bacterianos frescos se realizó la siembra de las cepas conservadas a -70°C en placas de TSA y se incubaron a 28°C durante 48 horas. Posteriormente, se tomó una colonia de cada una de las cepas aisladas y se sembraron en tubos de TSB, los cuales se incubaron en shaker a 150rpm y 28°C durante 24 horas, realizando el precultivo. Se tomaron 500µL del precultivo y se sembraron en un matraz de 20mL de capacidad con 5mL de TSB y 5,0 µL del sustrato *R*-carvona en el medio de cultivo y 5,0 µL en la bola de saturación.

Se realizaron extracciones a las 24 y 48 horas, tomando para ello 400 µL de muestra y se le adicionó 600 µL de acetato de etilo. Se mezcló mediante agitación vortex y luego se separaron las fases por centrifugación. Se tomó el acetato de etilo (fase superior) y se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro.

### Cromatografía gaseosa

Los extractos de las biotransformaciones fueron analizados mediante:

- Cromatografía gaseosa (GC) en un equipo Shimadzu GC 2014 con columna capilar Carbowax 20 (0.25mm x 30m x 0.25µm), detector FID, sistema de inyección Split (1:50).

#### Condiciones de corrida:

Temperatura del inyector: 220°C.

Temperatura del detector: 250°C.

Programa de temperatura: 60°C (8 min) – 140°C (0 min) a 3°C/min – 200°C (5 min) 15°C/min

Gas carrier: H<sub>2</sub>

Los datos fueron analizados con software GC Solutions, Labsolutions, Shimadzu.

- GC Shimadzu 2010 con una columna OPTIMA-5-MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm; Macherey-Nagel), acoplado a un espectrómetro de masas (MS) Shimadzu QP2010 Plus (30m x 0.25mm x 0.25µm), detector FID.

### Condiciones de corrida:

Temperatura del inyector e interfase 250°C.

Programa de temperatura: 40°C (2min)-240°C (1min) a 5°C/min- 300°C (5min) a 10°C/min.

Los estándares utilizados para la identificación de los productos de la biotransformación de *R*- y *S*-carvona fueron los carveoles correspondientes y (+)-dihidrocarvona (Aldrich).

Los tiempos de retención de los diferentes compuestos se consiguieron mediante la inyección de los estándares comerciales de los compuestos, en la tabla 2 se encuentran tabulados los tiempos de retención.

**Tabla 2.** Tiempos de retención de los diferentes compuestos.

Compuesto	Tiempo de retención
Carvona	32,5
Cis-dihidrocarvona	28,1
Trans-dihidrocarvona	27,39
Neoiso-Dihidrocarveol	30,24
Alcanfor	23,1

### Identificación de bacterias:

#### Pruebas bioquímicas

Se realizó el examen microscópico de células vivas y frotis teñido por coloración Gram. Determinándose así forma, movilidad, pared celular (Gram positivo o negativo) y presencia de esporas de las bacterias en estudio.

Se realizaron pruebas bioquímicas primarias a las 2 bacterias que resultaron de interés biocatalítico. Las pruebas realizadas fueron: catalasa, oxidasa, Oxidador/Fermentador de glucosa, crecimiento en caldo tioglicolato.

#### Estudio filogenético

Se complementó la identificación de las dos bacterias que fueron seleccionadas por su actividad biocatalítica frente a la *R*-carvona mediante el análisis del gen del ARNr 16S.

Para llevar a cabo este análisis se procedió a realizar la extracción de ADN genómico de ambas bacterias. A partir de un cultivo de 24 horas en placa de TSA se tomó una colonia y se sembró en 5 mL de TSB, se incubó a 28°C en un shaker orbital a 150 rpm durante 12 horas. Se tomó 1 mL y se realizó la extracción del ADN genómico mediante

kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) siguiendo los pasos descritos a continuación:

1. Se centrifugó 1 mL de cultivo overnight ( $2 \times 10^9$  células) a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C
2. Se suspendió el pellet en 180 µL de buffer de digestión genómico PureLink™, 20 µL de Proteinasa K (20mg/mL) y se incubó a 55°C por 30 minutos.
3. Se agregaron 20 µL de RNasa A (20mg/mL) y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos.
4. Se agregaron 200 µL de buffer de lisis PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer y se mezcló con vortex hasta obtener una solución homogénea.
5. Se agregaron 200 µL de etanol 95% frío y se siguieron con los pasos de purificación.

Luego se realizó la amplificación por PCR del gen de ARN ribosomal 16S para cada cepa utilizando los oligonucleótidos universales para Eubacterias (Weisburg, Barns et. al. 1991): 27 forward (5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3') Y 1492 reverse (5'-ACGG(C/T)TACCTTGTTCTGACTT-3').

Las reacciones de PCR fueron realizadas con el protocolo provisto por Invitrogen para la enzima Taq polimerasa. Se usaron los reactivos suministrados por el proveedor y los dNTPs de New England Biolabs.

#### Visualización y determinación de tamaños de los productos de amplificación:

Para la visualización de los productos de amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Sigma-Aldrich) al 0,8% para las corridas electroforéticas y se empleó buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5X. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich). Se corrió en paralelo un marcador de peso molecular Gene Ruler 1Kb DNA LADDER (Fermentas®) para determinar tamaño y poder realizar la cuantificación del ARN.

#### Secuenciación de los genes del ARN ribosomal 16S

Los productos de PCR fueron secuenciados con un secuenciador automático ABI 3730XL Applied Biosystems en Macrogen Corp. Seoul, Korea.

Para ambas cepas que fueron secuenciadas se utilizaron los primers generales de Eubacterias 27 forward (5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3') Y 1492 reverse (5'-ACGG(C/T)TACCTTGTTCTGACTT-3') para su secuenciación.

#### Análisis filogenético:

Las secuencias obtenidas fueron analizadas, alineadas y ensambladas utilizando el programa Vector NTI 10.3 Advance™. Las secuencias depuradas fueron comparadas con secuencias relacionadas en la base de datos GenBank usando BLAST (National Center for Biotechnology Informatic) (ver anexo).

## Biotransformación de *S*- y *R*-Carvona

Las bacterias que resultaron de interés fueron ensayadas con *S*-Carvona. El procedimiento fue el mismo que se describió en "Evaluación de la actividad reductasa frente a *R*-Carvona en las cepas endófitas aisladas"

### Estudio del sistema enzimático frente a *R*-carvona en las bacterias seleccionadas.

A partir de un cultivo fresco de cada una de las cepas bacterianas en estudio se realizó un precultivo en medio líquido (TSB) y se incubó en shaker a 150rpm y 28°C durante 24 horas.

Se tomaron 10mL del precultivo y se colocan en un matraz de 2L de capacidad conteniendo 500mL de TSB y 100,0 µL del sustrato a ser ensayado en el medio de cultivo y 100,0 µL en la bola de saturación.

Se realizaron extracciones cada 1 hora, tomando 1mL de muestra de los cultivos. Para realizar la curva de crecimiento de ambas bacterias en presencia de *R*-carvona, se utilizaron 500 µL del cultivo y se llevó a cabo la medición de absorbancia a 600nm en un equipo Thermo scientific Evolution 60S (Abs. Vs tiempo).

Los otros 500µL de muestras de los cultivos fueron utilizados para la extracción de los compuestos de biotransformación. Para ello, se añadieron 600 µL de acetato de etilo. Se mezcló mediante agitación vortex y luego se separaron las fases por centrifugación. Se tomó la fase de acetato de etilo (fase superior) y se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro.

Los extractos de las biotransformaciones fueron analizados por cromatografía gaseosa igual que el apartado "Cromatografía gaseosa"

Los estándares utilizados para la identificación de los productos de la biotransformación de *R*- y *S*-carvona fueron los carveoles correspondientes y (+)-dihydrocarvona (Aldrich).

Se utilizó el monoterpeno alcanfor como estándar interno para cuantificar las biotransformaciones. Los cálculos de los compuestos obtenidos y consumo de sustrato fueron los siguientes:

$$\% \text{conversión} = 100 \times \left( \frac{\sum \text{área}_{\text{productos}}}{\text{área}_{\text{sustrato}} + \sum \text{área}_{\text{productos}}} \right)$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamiento de microorganismos endófitos:

En el presente trabajo se llevó a cabo el aislamiento de microorganismos endófitos de la planta menta poleo (*Mentha pulegium*), con el objetivo de obtener nuevos biocatalizadores frente a los sustratos R- (**7b**) y S-carvona (**7a**) (figura 4), así como para evaluar la incidencia que tienen los mismos en las biotransformaciones de S-carvona cuando se emplea menta poleo como biocatalizador.

Los aislamientos realizados con la estrategia de prospección de actividad biocatalítica, así como los realizados para estudiar la contribución de los microorganismos endófitos, fueron divididos en 4 grupos:

- a) S-carvona + agua + hojas de menta.
- b) S-carvona + agua + hojas de menta + cloranfenicol (inhibidor bacteriano)
- c) S-carvona + agua + hojas de menta + cicloheximida (inhibidor fúngico)
- d) S-carvona + agua + hojas de menta + cloranfenicol + cicloheximida

Se obtuvieron un total de 13 cepas bacterianas endófitas en los **ensayos a – d**. En la tabla 3 se muestran el recuento de microorganismos viables obtenidos a las 72 horas de incubación, así como la cantidad de bacterias aisladas diferenciándolas por su morfología de colonia.

Se observa que en el ensayo donde se encontraban ambos inhibidores (ensayo d) el recuento fue muy bajo como era de esperar. El recuento de microorganismos en el matraz con cloramfenicol fue dos órdenes menores que en los matraces sin inhibidores o con inhibidor fúngico. Esto es coherente dado que el cloramfenicol inhibe a la mayoría de las bacterias. Aunque los hongos no fueron aislados para su posterior uso como biocatalizadores se observaron hongos filamentosos en el ensayo b, en la placa de PDA.

**Tabla 3.** Aislamiento de microorganismo de los matraces: a - d

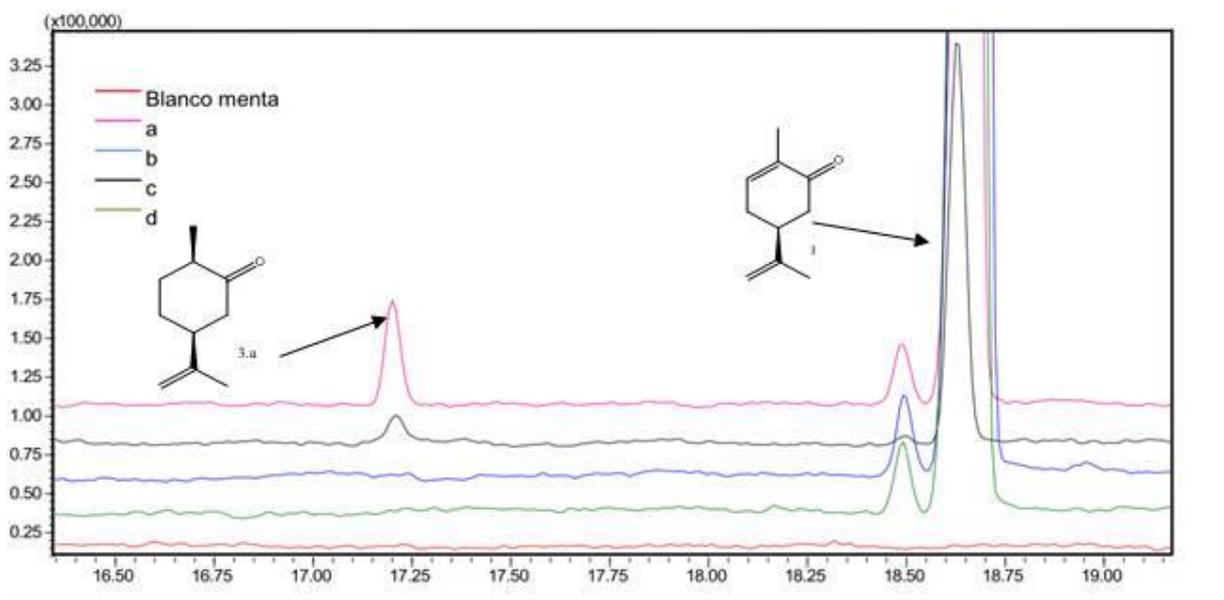
Matraz	ufc/mL (TSA)	Ufc/mL (PDA)	Bacterias aisladas
a	$1,6 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	FM18ci1, FM18ci2, FM18ci3
b	$3,5 \times 10^6$	<10	FM18cii1, FM18cii2, FM18cii3
c	$1,4 \times 10^8$	$8,7 \times 10^7$	FM18ciii1, FM18ciii2, FM18ciii3, FM18ciii4, FM18ciii5
d	<10	<10	FM18civ1, FM18civ2

### Evaluación de la actividad reductasa frente a S-carvona en los ensayos a-d:

Se realizó el estudio de la biotransformación de S-carvona mediante hojas de menta poleo en los cuatro sistemas a-d, anteriormente mencionados, con la finalidad de evaluar la incidencia de los microorganismos endófitos en la biotransformación del monoterpeno cuando se utiliza menta poleo como biocatalizador. En este estudio al utilizar individualmente los inhibidores microbianos, cloranfenicol (antibiótico) y cicloheximida (antifúngico) así como emplearlos en forma conjunta permitió establecer una correlación entre el perfil de biotransformación obtenido en cada caso y los microorganismos presentes en cada una de las biotransformaciones.

Para evaluar el proceso de biotransformación en los diferentes ensayos se realizaron extracciones cada 24 horas. En la figura 5 se muestra un cromatograma

correspondiente a un análisis en GC de las biotransformaciones a las 72 horas de reacción.



**Figura 5.** Cromatografía gaseosa de las extracciones a las 72 horas de los ensayos a-d y del blanco menta.

En la tabla 4 se muestran los porcentajes de bioconversión obtenidos en los ensayos realizados. Se determinó bioconversión de S-carvona a dihidrocarvona (figura 4) en los ensayos a y c, mientras que en los ensayos adicionados con cloranfenicol, b y d, no se observó biotransformación.

**Tabla 4:** porcentaje de bioconversión de los ensayos a – d

Ensayo	S-carvona (%)	cis-dihidrocarvona (%)
a	94	6
b	100	0
c	95	5
d	100	0

Si se compara la carga de microorganismos viables con las bioconversiones se observa que los dos ensayos con mayor carga microbiana (ensayo **a** y **c**) son los que presentan bioconversión. En el ensayo **d** la carga microbiana fue muy baja, esto puede deberse a la presencia de ambos inhibidores y en el mismo no se observa bioconversión, en este ensayo se aislaron 2 bacterias. En el ensayo **b** la carga microbiana fue 100 veces menor que los ensayos **a** y **c**, y tampoco se observa bioconversión.

El hecho de que los dos ensayos que no presentan bioconversión (**c** y **d**) fueron aquellos realizados en presencia de cloranfenicol, permite aventurar la hipótesis de que la biotransformación de la S-carvona se esté llevando a cabo por microorganismos

sensibles al cloranfenicol, o bien indicar que este inhibidor afecta la capacidad biocatalítica de la planta misma.

Evaluación de la actividad reductasa frente a S-Carvona en las cepas endofitas aisladas:

Para determinar la actividad biocatalítica en las bacterias aisladas se realizó la biotransformación de la S-carvona mediante las mismas. En la tabla 3 se muestran los porcentajes de los productos obtenidos correspondientes a las extracciones en tiempo final de los diferentes ensayos (72 horas).

**Tabla 5:** Porcentajes de bioconversión de las bacterias aisladas de los ensayos **a – d** frente a S-carvona

Bacteria	% S-Carvona (%)	<i>cis</i> -dihidrocarvona (%)	<i>trans</i> -dihidrocarvona (%)	<i>neoiso</i> -dihidrocarveol (%)
FM18ci1	44	52	4	0
FM18ci2	100	0	0	0
FM18ci3	95	5	0	0
FM18cii1	100	0	0	0
FM18cii2	80	17	3	0
FM18cii3	90	9	1	0
FM18ciii1	100	0	0	0
FM18ciii2	96	4	0	0
FM18ciii3	93	7	0	0
FM18ciii4	0	0	0	0
FM18ciii5	0	0	0	0
FM18civ1	55	31	4	10
FM18civ2	100	0	0	0

Como se observa en la tabla 5 con las bacterias FM18ci1 y FM18civ1 se obtuvieron porcentajes de bioconversión de 55% y 45% respectivamente (ver anexo), identificándose los productos como *cis*-dihidrocarvona (**8a**), *trans*-dihidrocarvona (**8b**) y *neoiso*-dihidrocarveol (**9a**) mediante GC-MS.

Estas bacterias (FM18ci1 y FM18civ1) fueron aisladas de los ensayos *a* y *d* respectivamente, y si comparamos los datos de los ensayos con los de microorganismos aislados observamos que en el ensayo *d* no habíamos obtenido actividad y el recuento bacteriano había sido bajo, en cambio una bacteria aislada de ese mismo ensayo

presenta actividad frente a la S-carvona, esto puede deberse a la baja carga bacteriana que hay en el ensayo **d**.

### Identificación de bacterias:

Las dos bacterias que resultaron de interés, FM18ci1 y FM18civ1, fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas primarias, secuenciación del gen que codifica para el rARN16s y MALDI-TOF. En la tabla 6 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas primarias, con lo que se identificó a la bacteria FM18Mci1 como perteneciente al género *Pseudomonas* sp. y la bacteria FM18Mci1 como *Bacillus* sp. En el análisis de la secuencia del gen del rARN 16S se corroboró esta caracterización para ambas bacterias (ver anexo), la identificación de estas cepas se complementó con un análisis por MALDI-TOF. Este análisis fue realizado por la Q.F. Victoria Giorgi en el laboratorio de la profesora Anita Marsaioli en la Universidad de Campinas. Los resultados obtenidos en este análisis concuerdan con la identificación realizada por los métodos anteriores.

**Tabla 6.** Pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias endófitas FM18ci1 y FM18civ1

	<b>FM18Mci1</b>	<b>FM18civ1</b>
Morfología	Bacilos	Bacilos
Tinción de Gram	-	+
Catalasa	+	+
Oxidasa	+	-
OF/Glucosa	Oxidador	Inactivo
Caldo Tioglicolato	Aerobio	Aerobio
Movilidad	+	+
Presencia de esporas	N/D	Presenta esporas

### Biotransformación de S- y R-carvona mediante las bacterias *Pseudomonas* sp y *Bacillus* sp.

Se estudió la capacidad biocatalítica de las bacterias *Pseudomonas* sp. FM18Mci1 y *Bacillus* sp. FM18Mci1 frente a S- y R-carvona. Se probaron las biotransformaciones con estos monoterpénos en atmósfera saturada, realizándose la extracción final a las 96 horas, manteniendo los matraces cerrados durante los ensayos. En la tabla 5 se encuentran los resultados obtenidos en estas biotransformaciones.

**Tabla 7:** Porcentajes de área en GC de sustratos y productos en las biotransformaciones de S y R-carvona mediante *Pseudomonas sp.* FM18Mci1y *Bacillus sp.*FM18Mci1a las 96 horas de reacción

Bacteria	Sustrato	Carvona (%)	cis-dihidrocarvona (%)	trans-dihidrocarvona (%)	neoiso-dihidrocarveol (%)
<i>Pseudomonas sp.</i>	R-carvona	75.1	2.3	22.6	0
<i>Pseudomonas sp.</i>	S-carvona	77.2	16.5	6.3	0
<i>Bacillus sp.</i>	R-carvona	100	0	0	0
<i>Bacillus sp.</i>	S-carvona	75.2	20.0	3.1	1.7

En los ensayos realizados con S-carvona se observa la misma estereoselectividad con ambas bacterias, dando las dos *cis*-dihidrocarvona (**8b** y **8c**) como productos mayoritarios frente a la *trans*-dihidrocarvona, en cambio cuando se utiliza R-carvona se obtiene el *trans*-dihidrocarvona (**8a** y **8d**) como producto mayoritario.

Esta diferente estereoquímica obtenida en el producto se explica por la diferente estereoquímica del sustrato y la disposición del mismo en igual orientación en el sitio activo, ya que el ataque por hidruro ocurre desde la misma cara de la molécula.

Los porcentajes de bioconversión con S-carvona obtenidos en estos ensayos (tabla 7) son menores a los obtenidos en los ensayos iniciales (tabla 3), esto puede deberse a que en los primeros ensayos realizados (los de evaluación de actividad biocatalítica) el sistema fue abierto cada 24 horas, permitiendo la aireación del sistema, en cambio los resultados presentados en la tabla 5 son con sistemas cerrados durante 96 horas, no permitiendo aireación en el sistema. En el caso del *Bacillus sp.* FM18civ1 se observa algo interesante, si bien la S-carvona es sustrato de este biocatalizador, la R-carvona no lo es para el sistema cerrado durante 96 horas (tabla 7). Asimismo, es interesante observar que este biocatalizador presenta mayor estereoselectividad, ya que el isómero *cis*-dihidrocarvona se obtiene con mayor pureza óptica.

### Estudio del sistema enzimático involucrado en la biotransformación de R-carvona mediante *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.*

En paralelo al estudio realizado con S- y R-carvona en un sistema cerrado 96 horas se realizaron las curvas de crecimiento para ambas bacterias en presencia de R-carvona para poder determinar si el sistema enzimático responsable de la biotransformación de R-carvona es inducible o constitutivo en cada caso. El objetivo de este estudio se debe a que conocer si un sistema enzimático de una bacteria es inducible o constitutivo permitirá diseñar la metodología de biotransformación apropiada para optimizar la obtención de un producto de interés. En el caso de un sistema inducible, por ejemplo, se pueden hacer crecer las bacterias en presencia del monoterpeno para posteriormente realizar la biotransformación utilizando la metodología células en reposo.

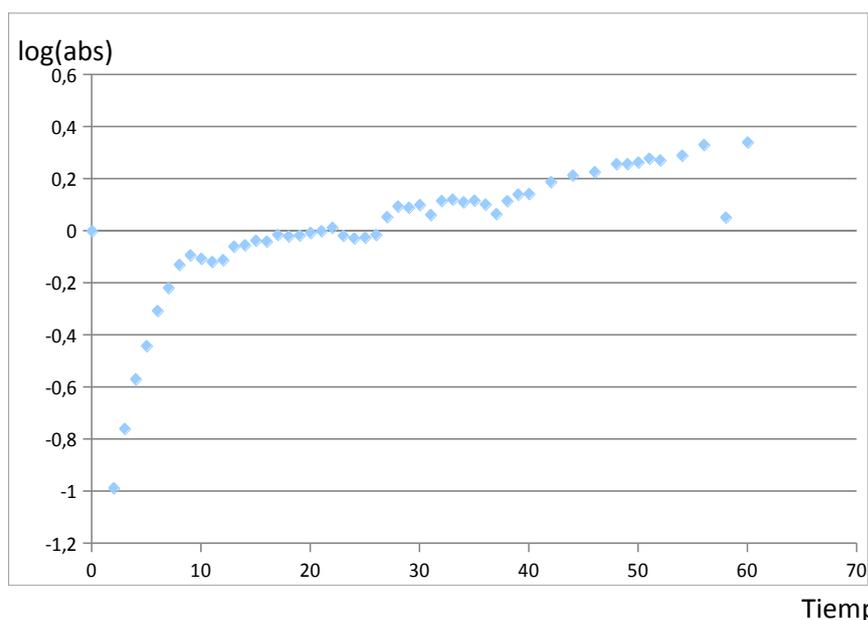
Para llevar a cabo este estudio se realizaron extracciones del medio en el que se dio el crecimiento de cada una de las bacterias en presencia de R-carvona. De esta forma se analizó el crecimiento bacteriano mediante la medida de absorbancia a 600nm y en

paralelo se efectuó el análisis de la biotransformación (mediante GC). Para ambas bacterias se observaron los productos de biotransformación *trans*-dihidrocarvona y *cis*-dihidrocarvona, este último en menor porcentaje.

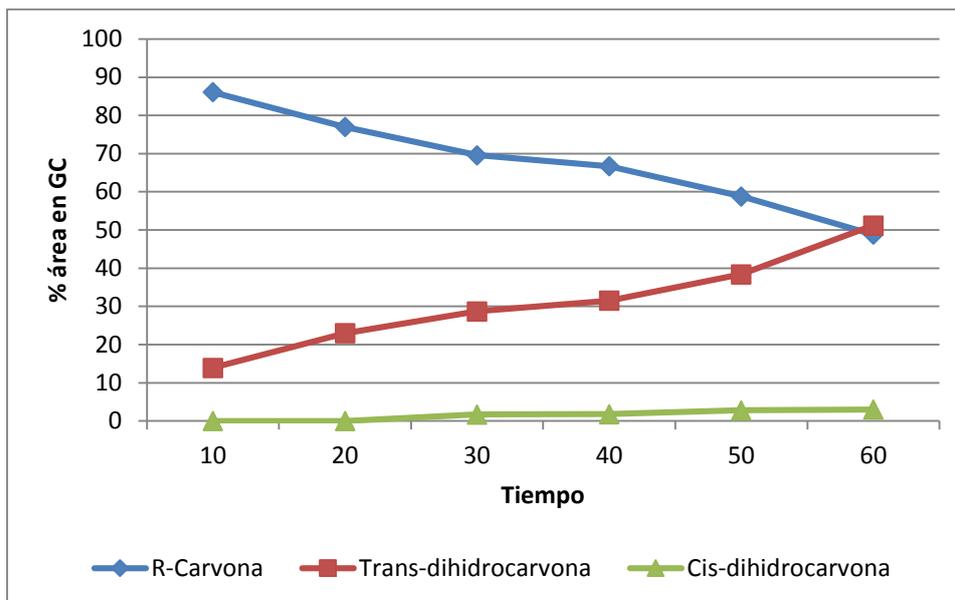
### Estudio del sistema enzimático responsable de la biotransformación de *R*-carvona en la cepa *Pseudomonas* sp. FM18Mci1

En el caso de la biotransformación de *R*-carvona con *Pseudomonas* sp. FM18Mci1 se observó que el crecimiento acompañó la biotransformación a partir de las 12 horas (ver graficas 1 y 2). No se presentan datos anteriores a las 12 horas debido a que la biotransformación ensayada en ese lapso de tiempo da un bajo rendimiento. Por tanto este resultado nos estaría indicando que el sistema enzimático responsable de la reducción del doble enlace en la molécula de *R*-carvona es un sistema constitutivo en la bacteria endófito.

Por otra parte a las 60 horas de incubación en estas condiciones (apertura del sistema cada 1 hora para realizar los análisis) se obtuvo un 43% de conversión, que al comparar con el 25% obtenido en el ensayo con el sistema cerrado (ver tabla 8) se puede deducir, como se mencionó anteriormente.



**Grafica 1.** Curva de crecimiento de la cepa *Pseudomonas* sp. FM18Mci1 en presencia de *R*-carvona



**Gráfica 2.** Estudio de la biotransformación de *R*-carvona mediante *Pseudomonas* sp. FM18Mci1 en el transcurso del tiempo

A partir de todas las biotransformaciones efectuadas de *R* y *S*-carvona utilizando la cepa endófitra *Pseudomonas* sp. FM18Mci1 como biocatalizador se puede observar que el sistema enzimático responsable de la reducción del doble enlace ataca en los dos sustratos en la misma posición. Esto puede visualizarse a partir de los porcentajes obtenidos de los compuestos *cis*- y *trans*-dihidrocarvona en cada caso ver tabla 8 y figura 4.

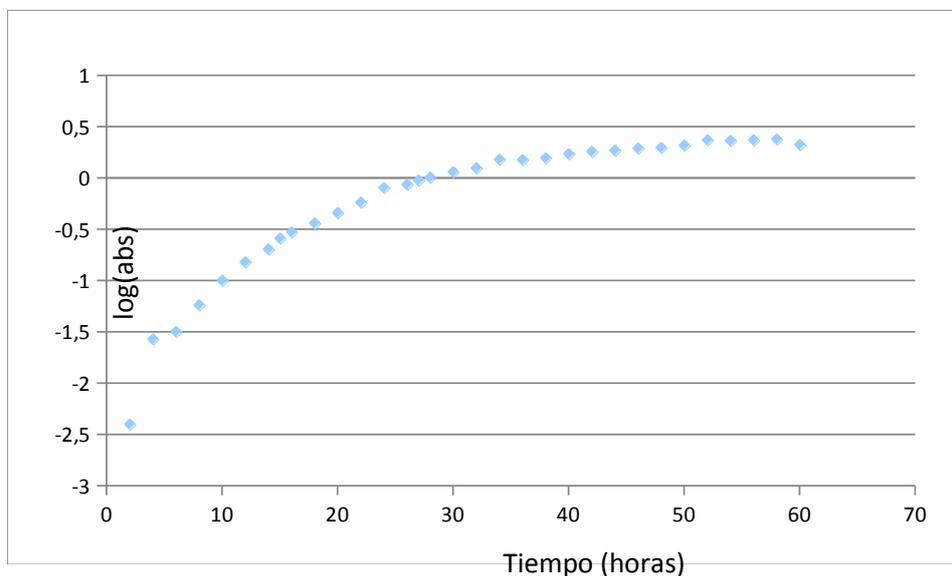
**Tabla 8.** Porcentajes de conversión obtenidos en la biotransformación de *R* y *S*-carvona mediante *Pseudomonas* sp. FM18Mci1

Tiempo de reacción (hs)	Sustrato	% cis-dihidrocarvona	% trans-dihidrocarvona
72	<i>S</i> -carvona	52	4
96	<i>S</i> -carvona	17	6
96	<i>R</i> -carvona	2	23
60	<i>R</i> -carvona	3	40

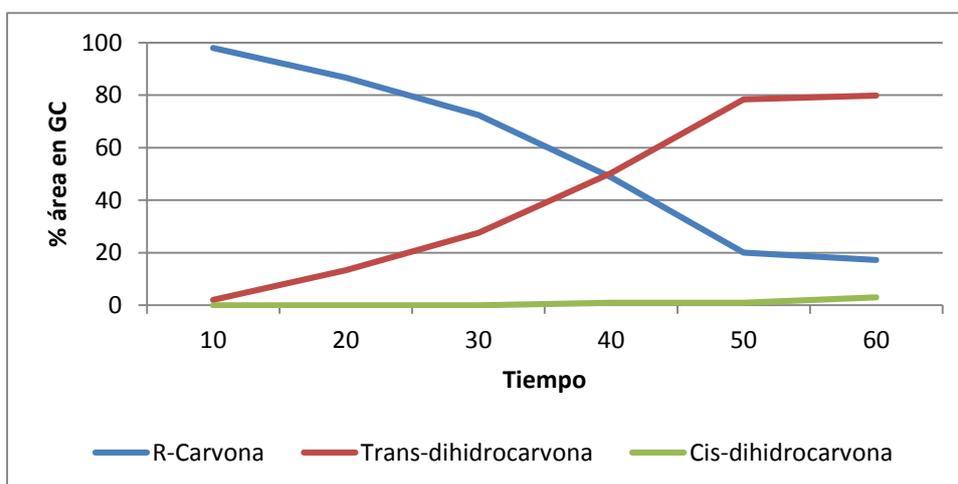
### Estudio del sistema enzimático de la biotransformación de la *R*-carvona en la cepa *Bacillus* sp. FM18Mci1

En la gráfica 3 y 4 se muestra la curva obtenida del análisis de absorbancia (600nm) cada dos horas del crecimiento de la bacteria *Bacillus* sp. FM18Mci1 en presencia de *R*-carvona. Por otro lado, en la gráfica 4 se muestra la biotransformación de *R*-carvona en este cultivo en el transcurso del tiempo. Los resultados obtenidos muestran que la bioconversión luego de 12 horas es de aproximadamente 2%, por lo cual se puede pensar que no es un sistema constitutivo si no que es inducido por la presencia de carvona en el medio.

La mayor bioconversión se observa de las 24 a las 48 horas, donde la conversión es de 56-66%, en este lapso de tiempo la curva de crecimiento está pasando de su fase exponencial a la fase estacionaria (gráfica 4). De las 36 a las 48 horas de incubación el porcentaje de conversión oscila entre 30%-40%. Luego de las 48 horas la conversión se detiene, queda evidenciado en la gráfica 4 donde se observa que la conversión en el lapso de tiempo 48-60 horas es de 1%.



**Gráfica 3.** Curva de crecimiento de la cepa *Bacillus* sp.FM18Mciv1 en presencia de *R*-carvona



**Gráfica 4.** Estudio de la biotransformación de *R*-carvona mediante *Bacillus* sp. FM18Mciv1 en el transcurso del tiempo

Es de destacar que en esta biotransformación se obtuvo un muy buen porcentaje de conversión (83%) produciendo en un porcentaje muy bueno trans-dihidrocarvona (80%) al final de periodo evaluado. Por otra parte se observó que en este ensayo únicamente ocurrió la reducción del doble enlace de la *R*-carvona, no observándose la reducción del carbonilo para obtener dihidrocarveol como sí se obtuvo en la biotransformación de *S*-carvona (ver tabla 9).

En la tabla 9 se muestran los porcentajes de los productos obtenidos en la biotransformación de *R*- y *S*-carvona por este biocatalizador en todos los ensayos realizados. Al igual que en el caso de *Pseudomonas* sp. se observa que la biotransformación en sistema cerrado (96 horas de reacción) tuvo un efecto negativo ya que no se observó conversión. Sin embargo en el sistema que se fue aireando por la apertura del matraz para efectuar los análisis de crecimiento y biotransformación la biotransformación alcanzó el 83%.

**Tabla 9.** % de compuestos obtenidos en la biotransformación de *R* y *S*-carvona mediante *Bacillus* sp.

Tiempo de reacción (hs)	Sustrato	cis-dihidrocarvona %	trans-dihidrocarvona %	neoiso-dihidrocarveol %
72	<i>S</i> -carvona	31	4	10
96	<i>S</i> -carvona	17	6	2
96	<i>R</i> -carvona	0	0	0
60	<i>R</i> -carvona	3	80	0

## Conclusión:

Se obtuvieron dos microorganismos endófitos que presentan buena actividad tanto frente a *R*-carvona como a *S*-carvona, dando altos porcentajes de exceso enantiomérico.

Respecto a la teoría endófitas podemos observar que en los sistemas con las hojas de menta poleo la bioconversión no fue alta, dando solo uno de los alcoholes como producto de la reacción, en cambio en los sistemas donde se utilizaron los microorganismos aislados los porcentajes de productos fueron muchos mayores. Esto demuestra la incidencia de las bacterias endófitas en las reacciones biocatalíticas realizadas con plantas, apoyando así la teoría endófitas.

Se partió de un vegetal con rico contenido en terpenos similares a la carvona y se obtuvieron microorganismos con capacidad para biotransformar este sustrato. Esto constituye un indicativo de que los microorganismos endófitos pueden albergar actividades biocatalíticas sobre sustratos presentes en la planta, como ya se vió en trabajos anteriores. Puede por tanto constituir una nueva estrategia en la búsqueda de biocatalizadores con una especificidad de sustrato en particular.

## Bibliografía

1. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*; 6ta. ed.; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, 2011.
2. Patel, R. N. (2008). *Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis*. *Coordination Chemistry Reviews*, 252(5), 659-701.
3. Curran, W. J. (1971). *The thalidomide tragedy in Germany: the end of a historic medicolegal trial*. *The New England journal of medicine*, 284(9), 481.
4. Ananth, J. (1975). *Congenital malformations with psychopharmacologic agents*. *Comprehensive psychiatry*, 16(5), 437-445.
5. McBride, W. G. (1961). *Thalidomide and congenital abnormalities*. *The Lancet*, 278(7216), 1358.
6. Müller, T. A., & Kohler, H. P. (2004). *Chirality of pollutants—effects on metabolism and fate*. *Applied microbiology and biotechnology*, 64(3), 300-316.
7. Gal, J., *The discovery of biological enantioselectivity: Louis Pasteur and the fermentation of tartaric acid, 1857—a review and analysis 150 yr later*. *Chirality*, 2008. 20(1): p. 5-19.
8. Rasmussen, J., G. Dumsday, and M. Zachariou, *New technology for biotransformations*. *Chem. Aust.*, 2005. 4-7.
9. Nakamura, K., et al., *Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts*. *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2003. 14: p. 2659–2681.
10. Wohlgemuth, R., *Asymmetric biocatalysis with microbial enzymes and cells*. *Current opinion in microbiology*, 2010. 13(3): p. 283-292.
11. Straathof, A.J., S. Panke, and A. Schmid, *The production of fine chemicals by biotransformations*. *Current opinion in biotechnology*, 2002. 13(6): p. 548-556.
12. Palomo, J.M. and M. Filice, *New emerging bio-catalysts design in biotransformations*. *Biotechnology advances*, 2015.
13. Mahmoudian, M., Lowdon, A., Jones, M., Dawson, M., & Wallis, C. (1999). A practical enzymatic procedure for the resolution of N-substituted 2-azabicyclo [2.2. 1] hept-5-en-3-one. *Tetrahedron: Asymmetry*, 10(6), 1201-1206.
14. Taylor, S. J., Brown, R. C., Keene, P. A., & Taylor, I. N. (1999). Novel screening methods—the key to cloning commercially successful biocatalysts. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 7(10), 2163-2168.
15. Solano, D. M., Hoyos, P., Hernáiz, M. J., Alcántara, A. R., & Sánchez-Montero, J. M. (2012). Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresourcetchnology*, 115, 196-207.
16. Iqbal, N., Rudroff, F., Brigé, A., Van Beeumen, J., & Mihovilovic, M. D. (2012). Asymmetric bioreduction of activated carbon-carbon double bonds using *Shewanella* yellow enzyme (SYE-4) as novel enoatereductase. *Tetrahedron*, 68(37), 7619-7623.
17. Buckland, B. C., Robinson, D. K., & Chartrain, M. (2000). Biocatalysis for pharmaceuticals—status and prospects for a key technology. *Metabolic engineering*, 2(1), 42-48.
18. Rasor, J. P., & Voss, E. (2001). Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry. *Applied Catalysis A: General*, 221(1), 145-158.
19. Palomo, J. M., Ortiz, C., Fuentes, M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2004). Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. *Journal of Chromatography A*, 1038(1), 267-273.
20. Aryee, A. N., & Simpson, B. K. (2012). Immobilization of lipase from grey mullet. *Applied biochemistry and biotechnology*, 168(8), 2105-2122.
21. Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, A., Fernandez-Lafuente, R., & Rodrigues, R. C. (2011). Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353(16), 2885-2904.

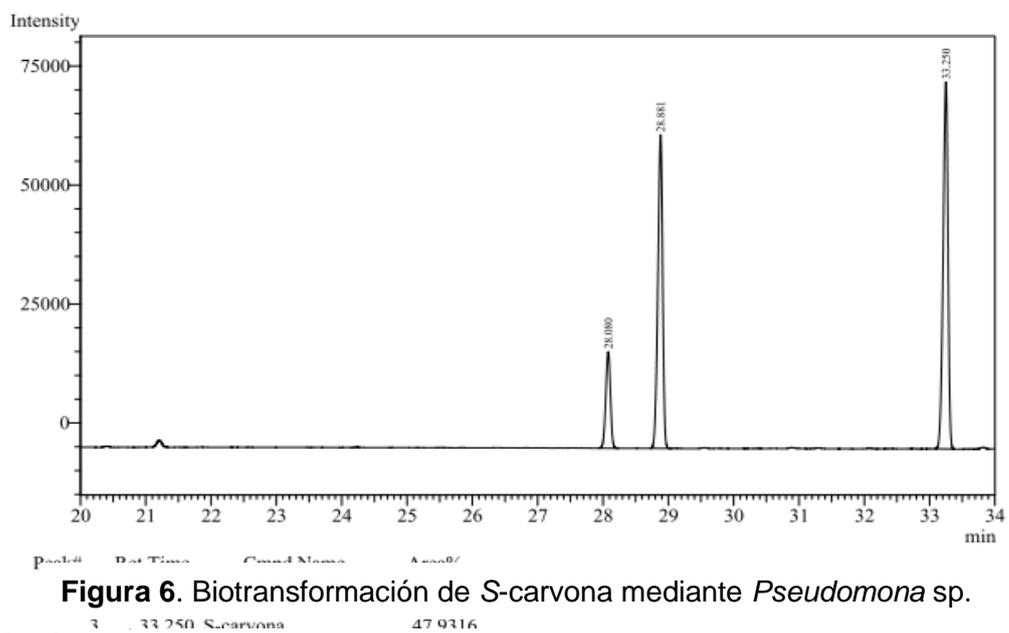
22. Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., & Shrestha, S. (2001). Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16(1), 53-58.
23. Fjerbaek, L., Christensen, K. V., & Norddahl, B. (2009). A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnology and bioengineering*, 102(5), 1298-1315.
24. Pencreac'h, G., & Baratti, J. C. (2001). Comparison of hydrolytic activity in water and heptane for thirty-two commercial lipase preparations. *Enzyme and microbial technology*, 28(4), 473-479.
25. Rodriguez, P. (2013). *Rol de endófitos en reacciones biocatalíticas mediadas por vegetales. Identificación y caracterización de nuevos biocatalizadores.* Facultad de Química - UDeLaR, Universidad de la República, Uruguay.
26. Mishra, S., Sachan, A., & Sachan, S. G. (2013). Production of natural value-added compounds: an insight into the eugenol biotransformation pathway. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 40(6), 545-550.
27. Walsh, C. T., & Chen, Y. C. J. (1988). Enzymic Baeyer–Villiger oxidations by flavin-dependent monooxygenases. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 27(3), 333-343.
28. Kayser, M., Mihovilovic, M., Mrstik, M., Martinez, C., & Stewart, J. (1999). Asymmetric oxidations at sulfur catalyzed by engineered strains that overexpress cyclohexanone monooxygenase. *New Journal of Chemistry*, 23(8), 827-832.
29. Romano, D., Contente, M. L., Molinari, F., Eberini, I., Ruvutuso, E., Sensi, C., & Raimondi, S. (2014). Recombinant *S. cerevisiae* expressing Old Yellow Enzymes from non-conventional yeasts: an easy system for selective reduction of activated alkenes. *Microbial cell factories*, 13(1), 60.
30. Katopodis, A. G., & May, S. W. (1990). Novel substrates and inhibitors of peptidylglycine. alpha.-amidating monooxygenase. *Biochemistry*, 29(19), 4541-4548.
31. Bradbury, A. F., Mistry, J., Roos, B. A., & Smyth, D. G. (1990). 4-Phenyl-3-butenic acid, an in vivo inhibitor of peptidylglycine hydroxylase (peptide amidating enzyme). *European Journal of Biochemistry*, 189(2), 363-368.
32. Ramer, S. E., Cheng, H., Palcic, M. M., & Vederas, J. C. (1988). Formation of peptide amides by peptidylglycine. alpha.-amidating monooxygenase: a new assay and stereochemistry of hydrogen loss. *Journal of the American Chemical Society*, 110(25), 8526-8532.
33. Ping, D., Katopodis, A. G., & May, S. W. (1992). Tandem stereochemistry of peptidylglycine. alpha.-monooxygenase and peptidylamidoglycolate lyase, the two enzymes involved in peptide amidation. *Journal of the American Chemical Society*, 114(10), 3998-4000.
34. Merkler, D. J., Kulathila, R., Consalvo, A. P., Young, S. D., & Ash, D. E. (1992). Oxygen-18 isotopic carbon-13 NMR shift as proof that bifunctional peptidylglycine. alpha.-amidating enzyme is a monooxygenase. *Biochemistry*, 31(32), 7282-7288.
35. MarkáZabriskie, T. (1991). Incorporation of aerobic oxygen into the hydroxyglycyl intermediate during formation of C-terminal peptide amides by peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase (PAM). *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (8), 571-572.
36. Noguchi, M., Seino, H., Kochi, H., Okamoto, H., Tanaka, T., & Hiram, M. (1992). The source of the oxygen atom in the alpha-hydroxyglycine intermediate of the peptidylglycine alpha-amidating reaction. *Biochem. J*, 283, 883-888.
37. Schaefer, C. A., D Silva, V., Stambuk, B. U., & Nascimento, M. D. G. (2013). Use of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in the chemoselective bioreduction of (1E,

- 4E)-1, 5-bis (4-methoxyphenyl)-1, 4-pentadien-3-one in biphasic system. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(7), 1116-1122.
38. Bull, A. T., Ward, A. C., & Goodfellow, M. (2000). Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 573-606.
  39. Dalmaso, G. Z. L., Ferreira, D., & Vermelho, A. B. (2015). Marine Extremophiles: A Source of Hydrolases for Biotechnological Applications. *Marine drugs*, 13(4), 1925-1965.
  40. Soni, P., Kaur, G., Chakraborti, A. K., & Banerjee, U. C. (2005). *Candida viswanathii* as a novel biocatalyst for stereoselective reduction of heteroaryl methyl ketones: a highly efficient enantioselective synthesis of (S)- $\alpha$ -(3-pyridyl) ethanol. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16(14), 2425-2428.
  41. Machado, L. L., Souza, J. S. N., de Mattos, M. C., Sakata, S. K., Cordell, G. A., & Lemos, T. L. (2006). Bioreduction of aldehydes and ketones using *Manihot* species. *Phytochemistry*, 67(15), 1637-1643.
  42. Prelog, V. (1964). Specification of the stereospecificity of some oxido-reductases by diamond lattice sections. *Pure and Applied Chemistry*, 9(1), 119-130.
  43. Maćzka, W. K., & Mironowicz, A. (2002). Enantioselective hydrolysis of 1-aryl ethyl acetates and reduction of aryl methyl ketones using carrot, celeriac and horseradish enzyme systems. *Tetrahedron: Asymmetry*, 13(21), 2299-2302.
  44. Baldassarre, F., Bertoni, G., Chiappe, C., & Marioni, F. (2000). Preparative synthesis of chiral alcohols by enantioselective reduction with *Daucus carota* root as biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(1), 55-58.
  45. Yadav, J. S., Reddy, G. S., Sabitha, G., Krishna, A. D., Prasad, A. R., Rao, K. V., & Rao, A. B. (2007). *Daucus carota* and baker's yeast mediated bio-reduction of prochiral ketones. *Tetrahedron: Asymmetry*, 18(6), 717-723.
  46. Rodríguez, P., Barton, M., Aldabalde, V., Onetto, S., Panizza, P., Menéndez, P., & Rodríguez, S. (2007). Are endophytic microorganisms involved in the stereoselective reduction of ketones by *Daucus carota* root? *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 49(1), 8-11.
  47. Anitha, D., Vijaya, T., Reddy, N. V., Venkateswarlu, N., Pragathi, D., & Mouli, K. C. (2013). Microbial endophytes and their potential for improved bioremediation and biotransformation: a review. *Indo Am J Pharm Res*, 3, 6408-6417.
  48. Ludwig-Müller, J. (2015). Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? *Biotechnology letters*, 1-10.
  49. Wani, Z. A., Ashraf, N., Mohiuddin, T., & Riyaz-Ul-Hassan, S. (2015). Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(7), 2955-2965.
  50. Kumar, A., & Ahmad, A. (2013). Biotransformation of vinblastine to vincristine by the endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 31(2), 89-93.
  51. Mei, Y. Z., Liu, R. X., Wang, D. P., Wang, X., & Dai, C. C. (2015). Biocatalysis and biotransformation of resveratrol in microorganisms. *Biotechnology letters*, 37(1), 9-18.
  52. Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., & McPhail, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93(9), 2325-2327.
  53. Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D., Grothaus, P., & Bignami, G. (1995). The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. *Journal of natural products*, 58(9), 1315-1324.
  54. Kumar, A., & Ahmad, A. (2013). Biotransformation of vinblastine to vincristine by the endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 31(2), 89-93.

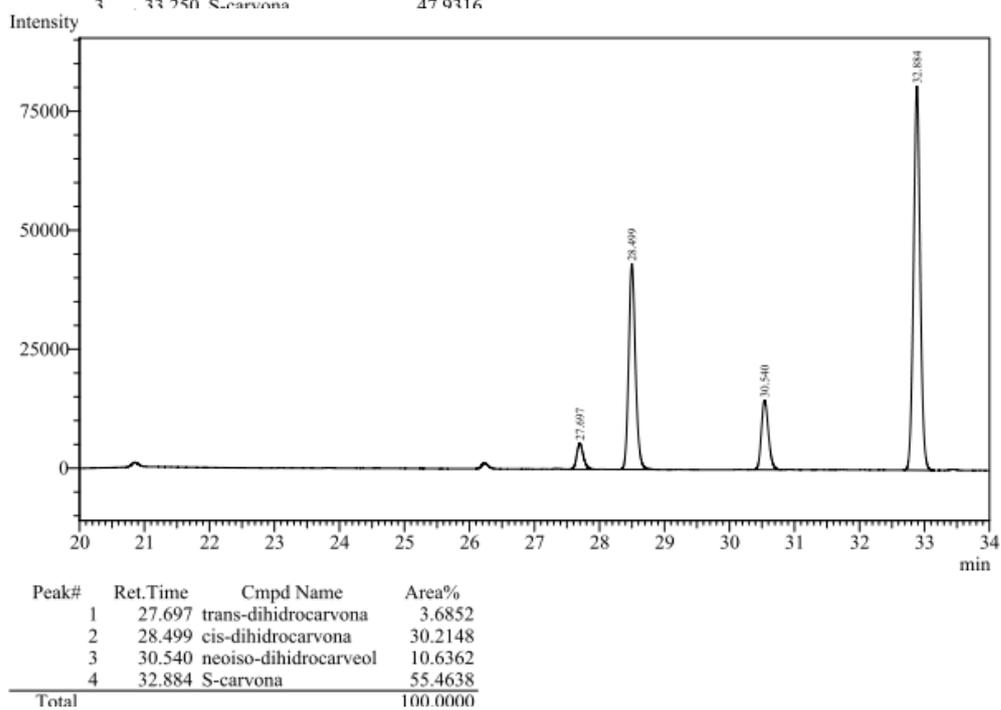
55. Werner, C., Petrini, O., & Hesse, M. (1997). Degradation of the polyamine alkaloid aphelandrine by endophytic fungi isolated from *Aphelandratetragona*. *FEMS microbiology letters*, 155(2), 147-153.
56. Bastos, D. Z. L.; Pimentel, I. C.; Dykstra, C.; Kania, C. E.; Gabardo, J. & De Oliveira, B. H. (2004). *Fungi associated with bark of Platanus orientalis L.* *Estud. Biol.* 26, 37-41
57. Bastos, D. Z., Pimentel, I. C., de Jesus, D. A., & de Oliveira, B. H. (2007). Biotransformation of betulinic and betulonic acids by fungi. *Phytochemistry*, 68(6), 834-839.
58. Torres, M., Dolcet, M. M., Sala, N., & Canela, R. (2003). Endophytic fungi associated with Mediterranean plants as a source of mycelium-bound lipases. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(11), 3328-3333.
59. Oliveira, A. C. D., Watanabe, F. M. F., Vargas, J. V. C., Rodrigues, M. L. F., & Mariano, A. B. (2012). Production of methyl oleate with a lipase from an endophytic yeast isolated from castor leaves. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(4), 295-300.
60. Rodríguez, P., Reyes, B., Barton, M., Coronel, C., Menéndez, P., Gonzalez, D., & Rodríguez, S. (2011). Stereoselective biotransformation of  $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -keto esters by endophytic bacteria and yeast. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71(3), 90-94.
61. Venkatesagowda, B., Ponugupaty, E., Barbosa, A. M., & Dekker, R. F. (2012). Diversity of plant oil seed-associated fungi isolated from seven oil-bearing seeds and their potential for the production of lipolytic enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 71-80.
62. Pedrini, P., Giovannini, P. P., Mantovani, M., Andreotti, E., & Colalongo, C. (2009). Reduction screening with endophytic fungi: Synthesis of homochiral secondary alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 60(3), 145-150.
63. Machado, L. L., Souza, J. S. N., de Mattos, M. C., Sakata, S. K., Cordell, G. A., & Lemos, T. L. (2006). Bioreduction of aldehydes and ketones using *Manihot* species. *Phytochemistry*, 67(15), 1637-1643.
64. Cordell, G. A., Lemos, T. L., Monte, F. J., & de Mattos, M. C. (2007). Vegetables as Chemical Reagents. *Journal of natural products*, 70(3), 478-492.
65. Fonseca, A. M., Monte, F. J. Q., Maria da Conceição, F., de Mattos, M. C., Cordell, G. A., Braz-Filho, R., & Lemos, T. L. (2009). Coconut water (*Cocos nucifera* L.)—A new biocatalyst system for organic synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57(1), 78-82.
66. Assunção, J. C. C., Machado, L. L., Lemos, T. L., Cordell, G. A., & Monte, F. J. Q. (2008). Sugar cane juice for the bioreduction of carbonyl compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 52, 194-198.
67. Ferreira, D. A., Da Silva, R. C., da Costa Assunção, J. C., de Mattos, M. C., de Lemos, T. L. G., & Monte, F. J. Q. (2012). *Lens culinaris*: A new biocatalyst for reducing carbonyl and nitro groups. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17(2), 407-412.
68. Suárez-Franco, G., Hernández-Quiroz, T., Navarro-Ocaña, A., Oliart-Ros, R. M., & Valerio-Alfaro, G. (2010). Plants as a green alternative for alcohol preparation from aromatic aldehydes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(3), 441-445.
69. Kumaraswamy, G., & Ramesh, S. (2003). Soaked *Phaseolus aureus* L: an efficient biocatalyst for asymmetric reduction of prochiral aromatic ketones. *Green Chem.*, 5(3), 306-308.
70. Xie, Y., Xu, J. H., Lu, W. Y., & Lin, G. Q. (2009). Adzuki bean: a new resource of biocatalyst for asymmetric reduction of aromatic ketones with high stereoselectivity and substrate tolerance. *Bioresource technology*, 100(9), 2463-2468.

71. Surette, M. A., Sturz, A. V., Lada, R. R., & Nowak, J. (2003). Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant and soil*, 253(2), 381-390.
72. Coronel, C., Arce, G., Iglesias, C., Noguera, C. M., Bonnacarrère, P. R., Giordano, S. R., & Gonzalez, D. (2014). Chemoenzymatic synthesis of fluoxetine precursors. Reduction of  $\beta$ -substituted propiophenones. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 102, 94-98.
73. Carroll, G. (1988). Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, 2-9.
74. Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D., Grothaus, P., & Bignami, G. (1995). The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. *Journal of natural products*, 58(9), 1315-1324.
75. Strobel, G. A., Hess, W. M., Li, J. Y., Ford, E., Sears, J., Sidhu, R. S., & Summerell, B. (1997). *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol-producing endophyte of the wollemi pine, *Wollemia nobilis*. *Australian Journal of Botany*, 45(6), 1073-1082.
76. Li, J. Y., Sidhu, R. S., Ford, E. J., Long, D. M., Hess, W. M., & Strobel, G. A. (1998). The induction of taxol production in the endophytic fungus—*Periconiasp* from *Torreya grandifolia*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(5), 259-264.
77. Daisy, B. H., Strobel, G. A., Castillo, U., Ezra, D., Sears, J., Weaver, D. K., & Runyon, J. B. (2002). Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodorvigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, 148(11), 3737-3741.
78. Zikmundova, M., Drandarov, K., Bigler, L., Hesse, M., & Werner, C. (2002). Biotransformation of 2-benzoxazolinone and 2-hydroxy-1, 4-benzoxazin-3-one by endophytic fungi isolated from *Aphelandratetragona*. *Applied and environmental microbiology*, 68(10), 4863-4870.
79. Iqbal, N., Rudroff, F., Brigé, A., Van Beeumen, J., & Mihovilovic, M. D. (2012). Asymmetric bioreduction of activated carbon-carbon double bonds using *Shewanella* yellow enzyme (SYE-4) as novel enoate reductase. *Tetrahedron*, 68(37), 7619-7623.
80. Menendez, Pilar. (1995). *Biotransformación de productos naturales*. Facultad de Química - UDeLaR, Universidad de la República , Uruguay

## ANEXO.



**Figura 6.** Biotransformación de S-carvona mediante *Pseudomonas* sp.



**Figura 7.** Biotransformación de S-carvona mediante *Bacillus* sp.

**Figura 8.** BLAST de las secuencias de la bacteria FM18ci1 analizadas utilizando el programa Vector NTI 10.3 AdvanceTM

30/6/2015 NCBI Blast:Nucleotide Sequence (1351 letters)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas brenneri strain CFML 97-391 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2486	2486	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_025103.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas proteolytica strain CMS 64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2473	2473	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_025588.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas gessardii strain CIP 105469 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2453	2453	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_024928.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas libanensis strain CIP 105460 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2451	2451	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_024901.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas migulae strain NBRC 103157 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2446	2446	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_114223.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas synxantha strain NBRC 3913 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2446	2446	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_113583.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas migulae strain CIP 105470 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2446	2446	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_024927.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas panacis strain CG20106 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2442	2442	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_043195.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas mucidolens strain NBRC 103159 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2436	2436	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_114225.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas fluorescens strain NBRC 14160 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2435	2435	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_113647.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas marginalis strain ICMP 3553 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2435	2435	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_117821.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas extremaustralis strain 14-3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2435	2435	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_114911.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas fluorescens strain CCM 2115 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2435	2435	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_115715.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas fluorescens strain ATCC 13525 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2435	2435	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_114476.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas poae RE*1-1-14 strain RE*1-1-14 16S ribosomal RNA, complete sequence</a>	2429	2429	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_102514.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas trivialis strain P 513/19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2429	2429	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_028987.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas veronii strain CIP 104663 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2429	2429	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_028706.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas azotoformans strain NBRC 12693 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2425	2425	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_113600.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas grimontii strain CFML 97-514 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2425	2425	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_025102.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas synxantha strain IAM 12356 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2425	2425	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_043425.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas lurida strain P 513/18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2423	2423	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_042199.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas poae strain P 527/13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2423	2423	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_028986.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas meridiana strain CMS 38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2423	2423	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_025587.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas antarctica strain CMS 35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2423	2423	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_025586.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas rhodesiae strain CIP 104664 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2423	2423	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_024911.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas orientalis strain CFML 96-170 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2418	2418	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_024909.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas cedrina strain CFML 96-198 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2412	2412	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_024912.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas constantinii strain CFBP 5705 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2412	2412	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_025164.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas lini strain DLE411J 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2410	2410	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_029042.2</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas brassicacearum subsp. brassicacearum NFM421 strain NFM421 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2410	2410	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_074834.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas brassicacearum subsp. neaurantiaca strain CIP 109457 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2410	2410	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_116299.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas cedrina subsp. fulgida strain P 515/12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2407	2407	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_042147.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas arsenicoxydans strain VC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2407	2407	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_117022.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas kilonensis strain 520-20 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2405	2405	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_028929.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas rhodesiae strain CIP 104664 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2405	2405	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_112074.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas mucidolens strain IAM 12406 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2403	2403	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_043422.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas tolaasii strain ATCC 33618 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2401	2401	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_114481.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas tolaasii strain NBRC 103163 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2401	2401	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_114227.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas tolaasii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2401	2401	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_117823.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas umsongensis strain Ps 3-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2401	2401	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_025227.1</a>

data:text/html;charset=utf-8,%3Ctable%20id%3D%22dscTable%22%20class%3D%22jig-ncbigrid%20%20ui-ncbigrid%22%20data-jigconfig%3D%22%22%20... 1/3

30/6/2015

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (1351 letters)

<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas tolaasii strain LMG 2342 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2401	2401	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_041799.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas marginalis strain ATCC 10844 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2401	2401	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_112072.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas veronii strain CIP 104663 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2399	2399	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_112075.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas marginalis strain LMG 2210 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2399	2399	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_027230.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas thivervalensis strain SBK26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2398	2398	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_024951.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas fluorescens strain IAM 12022 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2396	2396	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_043420.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas corrugata 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2394	2394	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_117826.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas tolaasii strain NCPPB 2192 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2392	2392	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_114595.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas baetica strain a390 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2390	2390	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_116899.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas palleroniana strain CFBP 4389 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2390	2390	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_029050.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens strain DSM 6698 16S ribosomal RNA gene, c</a>	2390	2390	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_119340.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas simiae strain OLI 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2388	2388	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_042392.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas extremorientalis strain KMM 3447 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2388	2388	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_025174.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas mandelii strain NBRC 103147 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2386	2386	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_114216.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas salomonii strain CFBP 2022 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2386	2386	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_029051.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas mandelii strain CIP 105273 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2386	2386	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_024902.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens strain ATCC 13985 16S ribosomal RNA gene,</a>	2386	2386	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_114473.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas corrugata strain Slade 939/1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2386	2386	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_037135.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas chlororaphis strain NBRC 3904 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2383	2383	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_113581.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas chlororaphis strain ATCC 9446 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2383	2383	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_116763.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas chlororaphis strain DSM 50083 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2383	2383	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_044974.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas brassicacearum strain DBK11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2381	2381	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_024950.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca strain NCIB 10068 16S ribosomal RNA gene, pa</a>	2379	2379	100%	0.0	98%	<a href="#">NR_043935.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas chlororaphis strain ATCC 9446 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2377	2377	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_114474.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas frederiksbergensis strain DSM 13022 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc</a>	2375	2375	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_117177.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas azotoformans strain KS 0034 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2374	2374	100%	0.0	98%	<a href="#">NR_037092.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas mohnii strain IpA-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2372	2372	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_042543.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas tolaasii strain ATCC 33618 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2372	2372	100%	0.0	98%	<a href="#">NR_115613.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas syringae pv. phaseolicola 1448A strain 1448A; BAA-978 16S ribosomal RNA, cc</a>	2370	2370	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_074598.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas tremae strain TO1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2370	2370	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_025549.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens strain DSM 6698 16S ribosomal RNA gene, cc</a>	2368	2368	100%	0.0	98%	<a href="#">NR_042939.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas jessenii strain CIP 105274 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2366	2366	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_024918.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas savastanoi strain CFBP 1670 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2364	2364	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_117822.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas cannabina strain CFBP 2341 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2364	2364	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_025550.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas syringae strain ATCC 19310 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2364	2364	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_114480.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas caricapapayae strain Robbs ENA-378 16S ribosomal RNA gene, partial sequen</a>	2364	2364	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_036830.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas helmanticensis strain OHA11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2362	2362	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_126220.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas syringae strain ICMP 3023 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2359	2359	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_117820.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas congelans strain P 538/23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2359	2359	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_028985.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas reinekei strain MT1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2359	2359	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_042541.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas frederiksbergensis strain JAJ28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2359	2359	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_028906.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas koreensis strain Ps 9-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2357	2357	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_025228.1</a>
<input type="checkbox"/>							

data:text/html;charset=utf-8,%3Ctable%20id%3D%22dscTable%22%20class%3D%22jig-ncbigrid%20%20ui-ncbigrid%22%20data-jigconfig%3D%22%22%20... 2/3

30/6/2015

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (1351 letters)

<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas vancouverensis strain DhA-51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2357	2357	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_041953.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas asturiensis strain LPPA 221 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2351	2351	100%	0.0	98%	<a href="#">NR_108461.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas fragi strain ATCC 4973 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2351	2351	100%	0.0	98%	<a href="#">NR_024946.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas syringae strain NCPPB 281 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2348	2348	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_043716.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas fluorescens Pf0-1 strain Pf0-1 16S ribosomal RNA, complete sequence</a>	2346	2346	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_102835.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas savastanoi strain ATCC 13522 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2346	2346	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_024707.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas fragi strain NBRC 3458 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2344	2344	100%	0.0	98%	<a href="#">NR_113578.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca strain ATCC 33663 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2342	2342	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_112076.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas psychrophila strain E-3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2338	2338	100%	0.0	98%	<a href="#">NR_028619.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas ficuserectae strain JCM 2400 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2338	2338	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_040798.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 strain DC3000 16S ribosomal RNA, complete sequence</a>	2337	2337	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_074597.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas moorei strain RW10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2335	2335	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_042542.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas moraviensis strain 1B4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2335	2335	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_043314.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas deceptionensis strain M1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2333	2333	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_117552.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas mediterranea strain CFBP 5447 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2333	2333	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_028826.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas syringae strain ATCC 19310 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2333	2333	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_115612.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas lutea strain OK2 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2329	2329	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_029103.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas amygdali strain ATCC 33614 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2327	2327	99%	0.0	98%	<a href="#">NR_115609.1</a>

data:text/html;charset=utf-8,%3Ctable%20id%3D%22dscTable%22%20class%3D%22jig-ncbigrid%20%20ui-ncbigrid%22%20data-jigconfig%3D%22%22%20... 3/3

**Figura 9.** BLAST de las secuencias de la bacteria FM18civ1 analizadas utilizando el programa Vector NTI 10.3 AdvanceTM

30/6/2015 NCBI Blast:Nucleotide Sequence (1423 letters)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus pumilus SAFR-032 strain SAFR-032 16S ribosomal RNA, complete sequence</a>	2577	2577	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_074977.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus pumilus strain NBRC 12092 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2567	2567	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_112637.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus safensis strain NBRC 100820 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2556	2556	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_113945.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus stratosphericus strain 41KF2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2543	2543	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_042336.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus altitudinis strain 41KF2b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2543	2543	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_042337.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus pumilus strain ATCC 7081 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2514	2514	97%	0.0	99%	<a href="#">NR_043242.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus stratosphericus strain 41KF2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2507	2507	98%	0.0	99%	<a href="#">NR_118441.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus aerius strain 24K 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2505	2505	98%	0.0	99%	<a href="#">NR_118439.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus safensis strain FO-36b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2503	2503	97%	0.0	99%	<a href="#">NR_041794.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus pumilus strain SBMP2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2407	2407	97%	0.0	98%	<a href="#">NR_118381.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus atropheus 1942 strain 1942 16S ribosomal RNA, complete sequence</a>	2366	2366	100%	0.0	97%	<a href="#">NR_075016.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus atropheus strain NBRC 15539 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2359	2359	99%	0.0	97%	<a href="#">NR_112723.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus atropheus strain JCM 9070 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2357	2357	99%	0.0	97%	<a href="#">NR_024689.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis strain 168 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2355	2355	100%	0.0	97%	<a href="#">NR_102783.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus vallismortis strain DSM 11031 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2355	2355	100%	0.0	97%	<a href="#">NR_024696.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus amylioliquefaciens subsp. plantarum strain FZB42 16S ribosomal RNA gene, complete</a>	2344	2344	100%	0.0	96%	<a href="#">NR_075005.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus tequilensis strain 10b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2344	2344	100%	0.0	96%	<a href="#">NR_104919.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis strain DSM 10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2344	2344	100%	0.0	96%	<a href="#">NR_027552.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus vallismortis strain NBRC 101236 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2342	2342	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_113994.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis subsp. inaquosorum strain BGSC 3A28 16S ribosomal RNA gene, partial sequi</a>	2338	2338	100%	0.0	96%	<a href="#">NR_104873.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus amylioliquefaciens strain MPA 1034 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2338	2338	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_117946.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">[Brevibacterium] halotolerans strain DSM 8802 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2338	2338	100%	0.0	96%	<a href="#">NR_115063.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis subsp. subtilis strain OS-109 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2338	2338	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_115002.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis strain IAM 12118 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2338	2338	100%	0.0	96%	<a href="#">NR_112116.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus amylioliquefaciens strain NBRC 15535 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2337	2337	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_112685.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus amylioliquefaciens strain BCRC 11601 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2337	2337	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_116022.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis subsp. subtilis strain OS-44 a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2337	2337	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_114997.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis strain JCM 1465 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2335	2335	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_113265.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis strain NBRC 13719 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2335	2335	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_112629.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis subsp. spizizenii strain NBRC 101239 16S ribosomal RNA gene, partial sequer</a>	2335	2335	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_112686.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus amylioliquefaciens strain NBRC 15535 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2335	2335	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_041455.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis subsp. subtilis strain OS-6.2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2335	2335	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_114996.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis subsp. spizizenii strain ATCC 6633 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2333	2333	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_112049.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus siamensis strain PD-A10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2329	2329	100%	0.0	96%	<a href="#">NR_117274.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus mojavensis strain IFO15718 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2327	2327	100%	0.0	96%	<a href="#">NR_024693.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis strain BCRC 10255 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2326	2326	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_116017.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus axarquiensis strain LMG 22476 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2326	2326	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_115929.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus nematocida strain B-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2324	2324	100%	0.0	96%	<a href="#">NR_115325.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis subsp. subtilis strain OS-105 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2322	2322	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_115001.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis subsp. spizizenii strain NRRL B-23049 16S ribosomal RNA gene, partial sequ</a>	2320	2320	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_024931.1</a>

data:text/html;charset=utf-8,%3Ctable%20id%3D%22dscTable%22%20class%3D%22jig-ncbigrid%20%20ui-ncbigrid%22%20data-jigconfig%3D%22%22%20... 1/3

30/6/2015

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (1423 letters)

<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus mojavensis strain NBRC 15718 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2318	2318	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_112725.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus malacitensis strain CR-95 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2313	2313	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_115282.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis subsp. subtilis strain OS-63.a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2311	2311	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_114998.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus methylotrophicus strain CBMB205 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2298	2298	97%	0.0	96%	<a href="#">NR_116240.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis strain NCDO 1769 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2290	2290	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_118972.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis subsp. spizizenii strain ATCC 6633 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2289	2289	97%	0.0	96%	<a href="#">NR_118486.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus axarquensis strain CR-119 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2285	2285	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_115283.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus idriensis strain SMC-4352-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2283	2283	98%	0.0	96%	<a href="#">NR_043268.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus mojavensis strain ifo 15718 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2276	2276	97%	0.0	96%	<a href="#">NR_118290.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus sonorensis strain NBRC 101234 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2276	2276	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_113993.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus licheniformis strain DSM 13 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2274	2274	100%	0.0	96%	<a href="#">NR_118996.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus licheniformis strain NBRC 12200 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2265	2265	99%	0.0	95%	<a href="#">NR_113588.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus licheniformis strain ATCC 14580 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2263	2263	100%	0.0	95%	<a href="#">NR_074923.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus licheniformis strain BCRC 11702 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2261	2261	99%	0.0	95%	<a href="#">NR_116023.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus sonorensis strain NRRL B-23154 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2255	2255	99%	0.0	96%	<a href="#">NR_025130.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus amyloliquefaciens strain ATCC 23350 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2255	2255	99%	0.0	95%	<a href="#">NR_118950.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus aerius strain 24K 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2230	2230	100%	0.0	95%	<a href="#">NR_042338.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus herbersteinensis strain D-1.5 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2217	2217	99%	0.0	95%	<a href="#">NR_042288.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis strain SBMP4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2211	2211	97%	0.0	96%	<a href="#">NR_118383.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus foraminis strain CV53 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2202	2202	100%	0.0	95%	<a href="#">NR_042274.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus gottheilii strain WCC 4585 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2198	2198	100%	0.0	95%	<a href="#">NR_108491.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus indicus strain Sd/3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2196	2196	100%	0.0	95%	<a href="#">NR_029022.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus cibi strain JG-30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2193	2193	99%	0.0	95%	<a href="#">NR_042974.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus acidicola strain 105-2 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2183	2183	100%	0.0	94%	<a href="#">NR_041942.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus marisflavi strain TF-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2182	2182	99%	0.0	94%	<a href="#">NR_025240.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus persicus strain B48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2180	2180	100%	0.0	94%	<a href="#">NR_109140.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Falsibacillus pallidus strain CW 7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2180	2180	97%	0.0	95%	<a href="#">NR_116287.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus niabensis strain 4T19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2174	2174	99%	0.0	94%	<a href="#">NR_043334.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus infantis 16S ribosomal RNA, complete sequence</a>	2169	2169	100%	0.0	94%	<a href="#">NR_121756.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus asahii strain MA001 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2167	2167	99%	0.0	94%	<a href="#">NR_024817.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus fastidiosus strain NBRC 101226 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2163	2163	99%	0.0	94%	<a href="#">NR_113989.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus zhanjiangensis strain JSM 099021 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2161	2161	99%	0.0	94%	<a href="#">NR_117854.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus aquimaris strain TF-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2161	2161	99%	0.0	94%	<a href="#">NR_025241.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus massilloanorexius strain AP8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2158	2158	100%	0.0	94%	<a href="#">NR_125629.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Jeotgalibacillus soli Cunha et al. 2012 strain P9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2158	2158	99%	0.0	94%	<a href="#">NR_125726.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">[Brevibacterium] frigoritolerans strain DSM 8801 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2158	2158	100%	0.0	94%	<a href="#">NR_117474.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus eiseniae strain A1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2158	2158	100%	0.0	94%	<a href="#">NR_108906.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">[Brevibacterium] frigoritolerans strain DSM 8801 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2158	2158	100%	0.0	94%	<a href="#">NR_115064.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus lentus strain NCIM8773 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2158	2158	100%	0.0	94%	<a href="#">NR_040792.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus shackletonii strain LMG 18435 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2156	2156	99%	0.0	94%	<a href="#">NR_025373.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus marisflavi strain TF-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2152	2152	98%	0.0	94%	<a href="#">NR_118437.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus lentus strain IAM 12466 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2150	2150	99%	0.0	94%	<a href="#">NR_115527.1</a>
<input type="checkbox"/>							

data:text/html;charset=utf-8,%3Ctable%20id%3D%22dscTable%22%20class%3D%22jig-ncbigrid%20%20ui-ncbigrid%22%20data-jigconfig%3D%22%22%20... 2/3

30/6/2015

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (1423 letters)

<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus thermotolerans strain SqZ-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2148	2148	99%	0.0	94%	<a href="#">NR_118456.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus songklensis strain CAU 1033 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2148	2148	99%	0.0	94%	<a href="#">NR_109443.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus aryabhatai strain B8W22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2148	2148	100%	0.0	94%	<a href="#">NR_115953.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus lentus strain NBRC 16444 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2148	2148	99%	0.0	94%	<a href="#">NR_112631.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus litoralis strain SW-211 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2148	2148	99%	0.0	94%	<a href="#">NR_043015.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subterraneus strain COOJ3B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2146	2146	100%	0.0	94%	<a href="#">NR_104749.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus firmus strain NBRC 15306 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2146	2146	99%	0.0	94%	<a href="#">NR_112635.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus cohnii strain NBRC 15565 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2145	2145	99%	0.0	94%	<a href="#">NR_113776.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus kochii strain WCC-4582 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2145	2145	100%	0.0	94%	<a href="#">NR_117050.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus acidicerer strain CBD 119 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2143	2143	100%	0.0	94%	<a href="#">NR_043774.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus thioparans strain BMP-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2143	2143	99%	0.0	94%	<a href="#">NR_043762.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus muralis strain LMG 20238 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2143	2143	99%	0.0	94%	<a href="#">NR_042083.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus cohnii strain DSM 6307 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2143	2143	99%	0.0	94%	<a href="#">NR_026138.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus firmus strain IAM 12464 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2141	2141	99%	0.0	94%	<a href="#">NR_025842.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus firmus strain NCIMB 9366 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2141	2141	99%	0.0	94%	<a href="#">NR_118955.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus panaciterrae strain Gsoil 1517 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2139	2139	100%	0.0	94%	<a href="#">NR_041379.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus oleronius strain ATCC 700005 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2139	2139	100%	0.0	94%	<a href="#">NR_043325.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus simplex strain DSM 1321 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2139	2139	100%	0.0	94%	<a href="#">NR_042136.1</a>

data:text/html;charset=utf-8,%3Ctable%20id%3D%22dscTable%22%20class%3D%22jig-ncbigrid%20%20ui-ncbigrid%22%20data-jigconfig%3D%22%22%20... 3/3