

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 398**

21 Número de solicitud: 201300612

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/38 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

21.06.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.12.2014

Fecha de la concesión:

06.07.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

13.07.2015

73 Titular/es:

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (100.0%)

Av. Blasco Ibañez, 13

46010 Valencia (Valencia) ES

72 Inventor/es:

PORCAR MIRALLES , Manuel ;

VILANOVA SERRADOR, Cristina ;

LATORRE CASTILLO, Amparo y

BAIXERAS ALMELA, Joaquín

54 Título: **Cepas de Pseudomonas sp. y usos de las mismas**

57 Resumen:

Cepas de Pseudomonas sp. y usos de las mismas.
La presente invención hace referencia a la cepa Pseudomonas sp. CECT8327 y/o mutantes de la misma, así como a su uso para la degradación de terpenos cíclicos y acíclicos y/o derivados terpénicos cíclicos y acíclicos, a su uso como agente antifúngico, además de como agente productor de surfactantes. La presente invención describe también una composición que comprende dicha cepa, sola o en combinación con al menos un segundo agente antifúngico. Así, la presente invención puede englobarse en el campo del medio ambiente, aplicándose particularmente en técnicas de biorremediación, degradación de residuos y metabolismo de terpenos en todo tipo de reacciones industriales.

ES 2 525 398 B2

DESCRIPCIÓN

Cepas de *Pseudomonas* sp. y usos de las mismas.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención hace referencia a una cepa aislada de *Pseudomonas* sp. (en adelante cepa CECT8327 o cepa de la invención), y a su uso para la degradación de terpenos en general y derivados terpénicos; así como a su uso como agente antifúngico o como agente productor de surfactantes. La presente invención se engloba en el sector del medio ambiente, aplicándose particularmente en técnicas de biorremediación, degradación de residuos ambientales de terpenos y derivados terpénicos en todo tipo de reacciones industriales.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La resina de coníferas es una mezcla compleja de metabolitos secundarios de dichas plantas. La resina protege los tejidos dañados de los árboles frente a insectos fitófagos y patógenos de las plantas. Los principales componentes de la resina son los terpenos cíclicos, los flavonoides y los ácidos grasos. Los terpenos son los metabolitos de la resina mejor caracterizados porque pueden ser fácilmente identificados con técnicas tales como la cromatografía de gases. Los terpenos cíclicos más abundantes en la resina de pino son los monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos (TRAPP S y CROTEAU R. Defensive resin biosynthesis in conifers. Annu. Rev. Plant. Phys. 2001. Vol. 52, páginas: 689-724). Dado que muchos de los terpenos de la resina muestran propiedades antibacterianas y antifúngicas, son considerados fitoalexinas que explican la toxicidad de la misma (GRAY JR y HARBORNE JB. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. Phytochemistry 1994, Vol. 37, páginas: 19-42).

Adicionalmente muchos terpenos exhiben características interesantes para la industria química, especialmente en la producción de fragancias, aceites esenciales y aditivos alimentarios; así como en medicina por sus propiedades citotóxicas, cardiotónicas y antiinflamatorias. No obstante, desde un punto de vista ambiental los terpenos y los derivados terpénicos que no son biodegradables bajo condiciones ambientales naturales, representan uno de los principales contaminantes ambientales. Dichos compuestos se encuentran contaminando el agua effluente de plantas industriales tales como el agua de las fábricas de pasta de papel (SUNTIO LR. et al. A review of the nature and properties of chemicals present in pulp mill effluents. Chemosphere. 1988, Vol. 17, páginas: 1249-1290), representando toneladas de residuos anuales procedentes de los materiales basados en terpenos.

Hasta la fecha, en el estado de la técnica se conocen muy pocos microorganismos con capacidad para degradar terpenos. Además entre los microorganismos conocidos con esta capacidad, o bien degradan únicamente terpenos cíclicos (MOHN WW. et al. Physiological and Phylogenetic Diversity of Bacteria Growing on Resin Acids. Syst. Appl. Microbiol. 1999, Vol. 22, páginas: 68-78), o bien degradan solo terpenos acíclicos (LINOS A. et al. Biodegradation of cis-1, 4-polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed surface analysis. Applied and environmental microbiology. 2000, Vol. 66, páginas: 1639-45). Por todo ello, el reciclaje es hasta la presente invención la única alternativa posible ante la acumulación de este tipo de materiales (ABRAHAM E. et al. Recent Developments in Polymer Recycling. 2011; Páginas: 47-100. ISBN: 978-81-7895-524-7; BOONDAMNOEN O. et al. Recycling waste natural rubber latex by blending with polystyrene: characterization of mechanical properties. Advanced Materials Development and Performance (AMDP2011). International Journal of Modern Physics: Conference Series. 2012, Vol. 6, páginas 391-396).

En definitiva, no existe un tratamiento eficaz para la degradación de los distintos tipos de terpenos, cíclicos y acíclicos, así como de los derivados terpénicos, sin necesidad de discriminar el tipo de terpeno concreto. Por ello, los terpenos en general, y los derivados terpénicos de cualquier tipo, continúan siendo un problema, como contaminantes medio-

ambientales, por su difícil degradación. A la vista de lo anterior, existe una necesidad permanente de desarrollar métodos para la degradación y eliminación de los terpenos y derivados terpénicos cíclicos y acíclicos, incluyendo la biorremediación bacteriana.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 Definiciones

A los efectos de la presente invención, la expresión "derivado terpénico" se refiere a materiales, sustratos y sustancias cuya estructura química este total o parcialmente basada en terpenos tanto cíclicos como acíclicos.

10 A los efectos de la presente invención por el término "degradación" se entiende el proceso por el que un terpeno o derivado terpénico pierde uno o varios átomos de carbono, o por el que un terpeno o derivado terpénico se descompone en moléculas más simples.

A efectos de la presente invención, se entiende por el término "degradación", la transformación de la estructura compleja del compuesto, preferentemente, terpenos o derivados terpénicos, en otra de estructura más sencilla.

15 Por la expresión "tratamiento de compuesto hidrofóbico" se entiende el aumento de su biodisponibilidad en procesos de biorremediación.

En la presente invención, las expresiones "terpeno acíclico" y "terpeno lineal" se usan indistintamente y hacen referencia a todo terpeno que no tiene una estructura cíclica.

20 En la presente invención por las expresiones "cepa de la invención" y "cepa CECT8327" se entiende la cepa CECT8327, cepa aislada de *Pseudomonas* sp y mutantes de la misma.

A efectos de la presente invención, los términos "mutante", "cepas mutantes" y "mutantes de la misma", se refieren específicamente a las cepas bacterianas que son generadas u obtenidas mediante técnicas de mutación espontánea o inducida, a partir de la cepa perteneciente a *Pseudomonas* sp CECT8327, que se describe y ejemplifica en el presente documento. Las
25 cepas mutantes descritas en el presente documento y obtenidas a partir de la cepa CECT8327 como material de partida, mantienen o mejoran una o varias de las propiedades de la cepa de la invención, que incluye al menos su capacidad para degradar terpenos cíclicos y acíclicos y derivados terpénicos; pudiendo incluir adicionalmente, su capacidad antifúngica, su capacidad de producir agentes surfactantes en presencia de compuestos hidrofóbicos, su utilización como
30 biofactorías y su capacidad para degradar imazalil. La persona experta en la técnica es capaz de realizar las técnicas apropiadas para verificar si las cepas mutantes obtenidas presentan dichas propiedades. Posibles métodos para determinar dichas propiedades se recogen en el apartado Ejemplos.

La obtención de cepas mutantes a partir de la cepa CECT8327 puede llevarse a cabo por
35 medio de la aplicación de uno o varios métodos de mutagénesis. El método se selecciona, sin limitación, de la lista que comprende mutagénesis química, mutagénesis por radiaciones y mutagénesis por elementos transponibles. Las mutaciones espontáneas pueden ocurrir debido a la acción de las radiaciones naturales e incluso durante la replicación del ADN debido a errores en la lectura de las bases. La frecuencia de mutación puede aumentarse
40 significativamente con el uso de métodos de mutación inducida. Tanto Las mutaciones espontáneas como las inducidas se producen como resultado de cambios estructurales en el genoma como por ejemplo, pero sin limitación, cambio en el número de cromosomas, cambio en el orden de uno o varios genes dentro del cromosoma o cambio en la secuencia de bases dentro de un gen (mutación puntual). Como agentes que provocan mutagénesis química se
45 usan, sin limitación, agentes que reaccionan con el ADN, aunque el ADN no se esté replicando, ocasionando cambios químicos en las bases que provocan un apareamiento incorrecto y agentes intercalantes o análogos de bases. Entre agente que reacciona con el ADN, sin

limitación, están el ácido nitroso, hidroxilamina, agente alquilante (etil metano sulfonato [EMS], metil metano sulfonato [MMS], dietil sulfato [DES], diepoxi butano [DEB], N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina [NTG], N-metil- N-nitroso urea (gas mostaza), agente intercalante (acridina, bromuro de etidio o dihidroetidio).

- 5 La mutagénesis por radiaciones puede ser producida, pero sin limitarse, a radiaciones ultravioleta o radiaciones ionizantes como los rayos X o los rayos gamma.

La mutagénesis por elementos transponibles puede ser producida, pero sin limitarse, a la inserción de una secuencia de inserción o de un transposón en una secuencia de uno o varios genes de la cepa bacteriana de la presente invención.

- 10 A efectos de la presente invención, el término "similitud" se refiere al grado de similitud de secuencia entre dos moléculas de ácido nucleico comparadas mediante la alineación de sus secuencias. El grado de similitud entre dos secuencias de ácidos nucleicos que se comparan es una función del número nucleótidos idénticos que se localizan en posiciones comparables. El porcentaje de similitud de dos secuencias de ácidos nucleicos, a efectos de la presente
15 invención, se determina mediante los programas informáticos ClustalW, BLAST, FASTA o Smith-Waterman.

- A efectos del presente documento y haciendo referencia a la "Lista de Secuencias" que lo acompaña, se incluye la traducción al castellano de las palabras que aparecen en ingles en dicha "Lista de Secuencias". Así, "source": fuente; "mol_type": tipo de molécula; "unassigned
20 DNA": ADN no asignado; y "organism": organismo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención soluciona el problema planteado en el apartado anterior mediante la identificación y uso de una cepa aislada de *Pseudomonas* sp. , la cepa CECT8327 y mutantes de la misma.

- 25 Por lo tanto, el primer aspecto de la presente invención hace referencia a la cepa aislada perteneciente a *Pseudomonas* sp. CECT8327 y cepas mutantes de la misma, donde las cepas mutantes son obtenidas a partir de la cepa de la invención como material de partida y donde las cepas mutantes mantienen una o varias de las propiedades de la cepa de la invención, propiedades que incluye al menos su capacidad para degradar terpenos cíclicos y acíclicos y
30 derivados terpénicos; pudiendo incluir adicionalmente, su capacidad antifúngica y su capacidad de producir agentes surfactantes en presencia de compuestos hidrofóbicos, además de su capacidad para degradar imazalil y como biofactoría para la producción de sustancias o compuestos a escala industrial partiendo de resina rica en terpenos y/o derivados terpénicos, como fuente de carbono.

- 35 En la presente invención por las expresiones "cepa de la invención" y "cepa CECT8327" se entiende la cepa CECT8327, cepa aislada de *Pseudomonas* sp. , y mutantes de la misma, como se han definido anteriormente.

- Sorprendentemente, los inventores de la presente invención, han aislado y caracterizado la cepa de *Pseudomonas* sp. CECT8327 en comunidades microbianas asociadas a una fuente de
40 microorganismos no considerada hasta la fecha en el estado de la técnica como posible fuente de microorganismos, en concreto la resina de *Pinus sylvestris* (*P. sylvestris*, o pino silvestre, en adelante), que incluye la resina asociada a las agallas generadas por el insecto *Retinia resinella* Linnaeus, grupo del orden Lepidoptera (NIEUKERKEN EJ. et al. Animal biodiversity: An outline of higher level classification and survey of taxonomic richness. Order Lepidoptera Linnaeus, 1758.En: Zhang, ZQ (ed). Magnolia Press: New Zealand. 2011, paginas: 212-221).
45

Es conocido en el estado de la técnica que las larvas de *Retinia* causan pequeñas heridas en el *P. sylvestris*, que inducen la secreción de resina, la cual es manipulada por la larva para

construir una cápsula de resina a modo de una dura capa protectora. También es conocido que las agallas son nódulos contruidos con la resina exudada por el pino, en el interior de las cuales viven las larvas de *Retinia*. Cada larva se desarrolla dentro de la agalla de resina durante cerca de dos años, completamente aislada del ambiente externo por su refugio rico en terpenos.

La identificación de la cepa CECT8327 es un hallazgo inesperado por varios motivos. En primer lugar porque la fuente de la que se ha aislado la cepa, la resina, como es bien conocido en el estado de la técnica, es mayoritariamente rica en terpenos cíclicos, y estos, a priori, de acuerdo a los conocimientos generales, inhiben el crecimiento de los microorganismos (WANG J. et al. Robust antimicrobial compounds and polymers derived from natural resin acids. Chem Commun. 2012. Vol: 48, paginas: 916-8), por lo que no era esperable aislar de la resina, la cepa con las propiedades descritas en la presente invención. Pero, además, sorprendentemente, la cepa de la presente invención es capaz de degradar otro tipo de terpenos no presentes en la resina en la que se ha aislado la cepa *Pseudomonas* sp. CECT8327, los terpenos acíclicos.

A la vista de lo anterior, en concreto, la sorprendente capacidad de la cepa CECT8327 y mutantes de la misma, para la degradación tanto de terpenos cíclicos como acíclicos y derivados terpénicos, dichas cepas pueden ser utilizadas industrialmente en la degradación de los mismos. Consecuentemente, la presente invención puede aplicarse en técnicas de biorremediación.

El segundo aspecto de la presente invención hace referencia a una composición que comprenda al menos la cepa CECT8327, y/o posibles mutantes de la misma, tal y como se definen en el primer aspecto de la invención.

Por ello, siguiendo con lo explicado anteriormente en relación a las posibles aplicaciones de la cepa CECT8327, el tercer aspecto de la presente invención hace referencia al uso de la cepa CECT8327 y/o mutantes de la misma, o a una composición que comprenda una cantidad efectiva de la cepa de la invención y/o de mutantes de la misma, según se ha definido anteriormente, para la degradación de terpenos, tanto acíclicos como cíclicos y derivados terpénicos.

La degradación de terpenos por la cepa CECT8327 y/o por los mutantes de la misma, o por una composición que comprenda una cantidad efectiva de la cepa de la invención y/o de mutantes de la misma, posibilita el aprovechamiento energético de los mismos con fines biotecnológicos, en concreto como biofactoría para la producción de sustancias o compuestos a escala industrial partiendo de los terpenos y/o derivados terpénicos como fuente de carbono.

El cuarto aspecto de la presente invención es el uso de la cepa CECT8327 y/o de los mutantes de la misma, o de una composición que comprenda una cantidad efectiva de la cepa de la invención y/o de mutantes de la misma, como biofactoría en la producción de sustancias o compuestos de interés empleando resina como fuente de carbono. Esta aplicación se lleva a cabo mediante la inclusión del gen o los genes de interés que codifican la sustancia o compuesto deseado en el genoma de la cepa CECT8327.

La persona experta en la técnica conoce perfectamente como insertar el gen o los genes de interés en el genoma de la cepa de la invención manteniendo las propiedades sorprendentes de la cepa de la invención usada como material de partida. Entre ellas, y sin carácter limitante, están la transformación con vectores integrativos o la transformación con vectores episomales.

Sorprendentemente, además, la cepa CECT8327 y/o los mutantes de la misma, o una composición que comprenda una cantidad efectiva de la cepa de la invención y/o de mutantes de la misma, muestran acción antifúngica al inhibir el crecimiento de hongos. Esta capacidad antifúngica de la cepa de la invención o de una composición que comprenda una cantidad

efectiva de la misma, permite su uso en el control de hongos fitopatógenos, permitiendo un ahorro en el uso de fungicidas y reduciendo su impacto ambiental.

Por ello, el quinto aspecto de la presente invención es el uso de la cepa CECT8327 y/o de los mutantes de la misma, o de una composición que comprenda una cantidad efectiva de la cepa de la invención y/o de mutantes de la misma, como fungicida. Como se ha mencionado previamente, la composición descrita en la presente invención, puede comprender además, al menos otro agente antifúngico, siendo preferido el imazalil. Por lo tanto, la presente invención describe también, el uso de una composición que comprende una cantidad efectiva de la cepa de la invención y/o de mutantes de la misma en combinación con otro agente antifúngico, preferentemente el imazalil, para el control de hongos fitopatógenos.

La capacidad inesperada de la cepa CECT8327 y/o de los mutantes de la misma, para combinar las actividades previamente citadas, de degradación de terpenos cíclicos y acíclicos, derivados terpénicos y su acción antifúngica, da lugar a aplicaciones industriales adicionales de la cepa o de una composición que comprenda una cantidad efectiva de la misma, debido a la presencia de terpenos y derivados terpénicos en biomásas, al permitir la degradación de terpenos y derivados terpénicos al mismo tiempo que muestra propiedades antifúngicas.

A la vista de lo anterior el sexto aspecto de la presente invención hace referencia al uso de la cepa CECT8327 y/o a los mutantes de la misma, o de una composición que comprenda al menos la cepa CECT8327, y/o posibles mutantes de la misma, para la degradación de terpenos cíclicos y acíclicos y derivados terpénicos y como antifúngico, para inhibir el crecimiento de hongos.

Adicionalmente, y de modo inesperado, la cepa de la invención es capaz de crecer en presencia del fungicida imazalil como única fuente de carbono, de ahí su uso o de una composición que comprenda una cantidad efectiva de la misma, para la descontaminación de fluidos que contienen imazalil.

Otro efecto inesperado de la cepa CECT8327 y/o de los posibles mutantes de la misma, o de una composición que comprenda una cantidad efectiva de la cepa de la invención y/o de mutantes de la misma, es su capacidad para crecer en presencia de medios líquidos que contengan compuestos hidrofóbicos. Este efecto inesperado se basa en la producción de agentes surfactantes que facilitan la emulsión de los compuestos hidrofóbicos, para su posterior tratamiento. Por ello, el séptimo aspecto de la presente invención hace referencia al uso de la cepa CECT8327 y/o de los mutantes de la misma, o de una composición que comprenda una cantidad efectiva de la cepa de la invención y/o de mutantes de la misma, para la producción de agentes surfactantes que faciliten la degradación o tratamiento de compuestos hidrofóbicos.

DESCRIPCIÓN DE LOS FIGURAS

Figura 1. Peso seco total (T) y peso seco bacteriano (C) (expresados en g/mL, según se muestra en el eje vertical de la gráfica) de los cultivos en medio RM (medio basado en resina) de las cepas ensayadas y evolución de la cantidad estimada de resina (R) en el medio. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo expresado en días.

Figura 2. Microscopía electrónica de cultivos con láminas de látex no inoculados (A) e inoculados (B, C y D) con la cepa CECT8327, obtenidas tras 15 días de crecimiento a 30°C.

Figura 3. Imágenes de medio de cultivo mínimo suplementado con diesel no inoculado (A) e inoculado (B) con la cepa de la invención CECT8327.

Figura 4. Diámetro de colonia (d, expresado en mm) de tres hongos aislados de la resina (*Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus* y *Penicillium decumbens*) en ensayos de confrontación con la cepa CECT8327, en medio rico (graficas B, D y F) y en medio mínimo con resina como

única fuente de carbono (graficas A, C y E). El eje horizontal representa el tiempo de cultivo medido en días. En cada grafica C corresponde al hongo confrontado con la cepa CECT8327; y A corresponde al hongo no confrontado con la cepa CECT8327. Las graficas A y B corresponden a ensayos llevados a cabo con *Aspergillus terreus*, mientras que las graficas C y D corresponden a *Aspergillus flavus* y las graficas E y F a *Penicillium decumbens*

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se basa en la cepa CECT8327, del género *Pseudomonas* sp., y cualquiera de sus mutantes, según se define a lo largo del presente documento, identificada a partir de muestras de resina de *P. sylvestris* y de agallas del lepidóptero *R. resinella*. Sorprendentemente, y tras la caracterización de la cepa de la invención a nivel de secuencia (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2) y a nivel fenotípico, se identificaron un conjunto de características metabólicas y ecológicas, mencionadas anteriormente, que convierten a la cepa CECT8327 en una cepa esencial en distintos procesos biotecnológicos que impliquen la degradación de terpenos cíclicos y acíclicos, y derivados terpénicos, así como la actividad antifúngica o la generación de surfactantes para el tratamiento posterior de compuestos hidrofóbicos.

La cepa CECT8327 tolera y degrada cantidades significativas de resina. La Figura 1 muestra que la cepa de la presente invención degrada 1,5 gramos de resina por litro de medio mínimo, con resina como única fuente de carbono, después de cuatro días de crecimiento exponencial en dicho medio. El protocolo usado para determinar el contenido de resina tuvo únicamente en cuenta la cantidad de resina convertida en biomasa, contribuyendo al incremento del peso seco de la bacteria. Por ello, la cantidad de resina degradada es una estimación a la baja, siendo la cantidad real de resina degradada muy superior.

En una realización preferida de la presente invención, la cepa CECT8327 y/o mutantes de la misma, degradan los terpenos cíclicos seleccionados del grupo que comprende diterpenos, monoterpenos y sesquiterpenos.

La cepa CECT8327 y/o los mutantes de la misma, son capaces de degradar los monoterpenos monocíclicos, limonoides, presentes en una amplia gama de alimentos funcionales y fitonutrientes naturales. En una realización preferida de la invención, la cepa CECT8327 degrada limoneno, presente, por ejemplo, en las peladuras de cítricos. Por ello, un aspecto de la invención es su uso en el tratamiento de biomásas ricas en limonenos como paso previo a su fermentación por parte de microorganismos sensibles a estos terpenos, como las levaduras. En concreto la degradación de limoneno de biomásas procedentes del procesamiento de cítricos para la mejora en la producción de etanol, mediante fermentación alcohólica de las biomásas pre-tratadas mediante levaduras, a partir de cascara de naranja.

El contenido génico de la cepa CECT8327 analizado a partir de las secuencias metagenómicas, detectó un grupo o clúster de genes correspondientes a la SEQ ID NO: 1. La presencia de este paquete génico indica el fuerte valor adaptativo de este grupo de genes en un ambiente rico en terpenos. Además, la cepa de la invención comprende la secuencia parcial 16S correspondiente a la SEQ ID NO: 2.

En una realización preferida de la presente invención, la cepa CECT8327 y/o los mutantes de la misma, comprenden la secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 1 en su material genómico. En una realización aún más preferida de la invención, la cepa CECT8327 y/o los mutantes de la misma, comprenden una secuencia con una similitud de al menos 70% respecto a la secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 1.

Por otro lado, la cepa CECT8327 y/o los mutantes de la misma, de la presente invención, ventajosa e inesperadamente, tienen capacidad para degradar terpenos totalmente distintos a los presentes en la resina, los terpenos acíclicos. En una realización preferida de la presente

invención, los terpenos acíclicos degradados son el látex, la goma vulcanizada o caucho y la gutapercha.

En este sentido, también es sorprendente la elevada velocidad de degradación mostrada por la cepa CECT8327 al ser capaz de degradar visiblemente látex en dos semanas, observándose al microscopio electrónico grietas en la estructura del mismo (ver Figura 2). Otro aspecto sorprendente de la cepa CECT8327 es la forma de degradar el látex. La cepa CECT8327 actúa de forma local mediante el contacto íntimo entre la misma y el sustrato, al cual se fija incluso bajo vigorosa agitación del medio, observándose una perfecta adhesión y produciéndose una excavación en forma de nicho u hornacina debido a la desintegración del látex en las inmediaciones de cada célula adherida al mismo (ver Figura 2). Así, la cepa CECT8327 puede usarse en el tratamiento de materiales acumulados a gran escala, tales como guantes u otros residuos sólidos, actuando directamente sobre su superficie, por lo que el tratamiento de estos materiales a escala industrial no requeriría de un pre-tratamiento para solubilizarlos en medio líquido.

Además, la cepa CECT8327 y/o los mutantes de la misma, sorprendentemente se caracterizan por mostrar un efecto combinado al ser capaces de degradar eficazmente terpenos cíclicos y acíclicos y derivados terpénicos, al mismo tiempo que son antifúngicos. Un aspecto preferido de la presente invención hace referencia a un método combinado para la degradación de terpenos cíclicos y acíclicos y derivados terpénicos y para la inhibición del crecimiento de hongos, que comprende la puesta en el medio de una cantidad efectiva de la cepa CECT8327 o de una composición que la comprenda.

En una realización preferida de la invención relativa a la acción antifúngica de la cepa CECT8327 y/o los mutantes de la misma, el uso de inhibir el crecimiento de hongos es sobre hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. En resumen, la cepa de la invención es también un agente de control biológico, especialmente para la industria agroalimentaria.

En una realización preferida de la presente invención, la cepa CECT8327 se usa como fungicida en tratamientos post-cosecha. En la presente invención, por tratamiento post-cosecha se entiende el proceso de almacenaje de las cosechas y los procesos necesarios para la transformación y la adecuada conservación de los alimentos al estado natural o fresco. En otra realización preferida de la presente invención, la cepa CECT8327 se usa en el control de hongos en la industria agroalimentaria, en concreto en los productos para la alimentación humana y/o animal procesados, y más particularmente en ensaladas de cuarta gama, mejorando la seguridad de los mismos.

La cepa de la presente invención es capaz de crecer en presencia de agentes antifúngicos. La Tabla 1 muestra la comparación del crecimiento mediante conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de la cepa CECT8327 en medio de cultivo sólido LB y medio de cultivo sólido LB suplementado con distintas concentraciones de un fungicida comúnmente usado en la industria agroalimentaria, el fungicida imazalil. En una realización preferente de la invención, la cepa CECT8327 se usa como fungicida en combinación con el imazalil, típico de la industria agroalimentaria.

A la vista de lo anterior, en una realización preferida, la presente invención hace referencia a una composición que comprende al menos la cepa CECT8327 y otro agente antifúngico. En una realización aún más preferida, el otro agente antifúngico es imazalil.

Tabla 1

Medio de cultivo	UFC/mL
LB	3.84E+07
LB+500ppm imazalil	8.80E+06
LB+1500ppm imazalil	5.60E+06

Como se ha mencionado anteriormente, la cepa CECT8327 es capaz de crecer en un medio con compuestos hidrofóbicos, En una realización preferida, la cepa CECT8327 y/o mutantes de la misma, son capaces de crecer en presencia de hidrocarburos, mediante la producción de agentes surfactantes que posibilitando el tratamiento posterior de dicho hidrocarburo. En una realización aún mas preferida de la invención, esta capacidad surfactante se aplicaría al tratamiento de medios líquidos que contengan diesel, (ver Figura 3) y/u otros compuestos hidrofóbicos, como, y sin carácter limitativo, aceites, parafinas y grasas.

10 DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS

De acuerdo con lo establecido en el Tratado de Budapest, la cepa de la invención del género *Pseudomonas* fue depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), situada en el Parc Científic de la Universitat de Valencia, calle Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna, Valencia, (España).

15 La fecha de depósito es 22 de abril de 2013 y el número de depósito correspondiente es CECT8327.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Colección de muestras.

20 Se recogieron muestras de resina ambiental asociada al pino albar (*Pinus sylvestris*) (obtenidas de secreciones naturales del pino) y de resina asociada a las agallas inducidas por *R. resinella* del bosque "Fuente del Tajo" (Mora de Rubielos, Teruel, España) en septiembre del 2011. Se extrajeron las larvas de las agallas. Tanto las agallas como la resina fueron molidas individualmente y suspendidas en tampón PBS estéril (NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, Na_2HPO_4 1.44 g/L, KH_2PO_4 0.24 g/L, pH ajustado a 7.4).

25 Ejemplo 2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

Se estableció un medio mínimo selectivo con resina de pino como la única fuente de carbono. Como factor de selección, se obtuvo una solución concentrada al 10% (peso/volumen) de resina mediante la disolución de las muestras de resina mencionadas en el apartado anterior en etanol. Se eliminaron los restos de plantas y otras partículas insolubles en suspensión mediante centrifugación (2,000xg, 5 min). El sobrenadante se filtró y esterilizó a través de un filtro de 0.2µm de diámetro de poro. Se preparó, un medio mínimo (2 g/L $NaNO_3$, 1 g/L K_2HPO_4 , 0.5 g/L $MgSO_4$, 0.5 g/L KCl, 0.2 g/L pectona bacteriológica; y 15 g/L de agar para el medio sólido). Una vez esterilizado con autoclave, este medio mínimo se mantuvo a 80°C y se mezcló con la solución resina:etanol 10% (peso/volumen), obteniendo un medio selectivo (RM) con concentraciones crecientes de resina (desde 0.5% a 8% v/v). Tanto las muestras de resina del pino, como las muestras de resina asociadas a las agallas, fueron sembradas en placas con RM e incubadas a 30°C durante 14 días.

Ejemplo 3. Extracción de ADN.

Las colonias de microorganismos observadas en las placas después de la incubación se lavaron con PBS estéril. Se aisló el ADN metagenómico de la suspensión microbiana usando el kit Power Soil DNA Isolation (MO BIO Laboratories).

5 Ejemplo 4. Secuenciación de ADN, ensamblado y análisis bioinformático.

El ADN metagenómico fue pirosecuenciado y las lecturas obtenidas fueron posteriormente ensambladas de novo con el programa informático NEWBLER (454 LifeSciences Roche). A partir del ensamblado, se realiza una predicción de genes con la herramienta MetaGeneAnnotator y se identificó el origen filogenético y la función de dichos genes mediante búsquedas BLASTX en la base de datos nr (no redundante) del NCBI. Para obtener una reconstrucción global del metabolismo a partir de los resultados del BLASTX, se utiliza la herramienta KAAS (KEGG Automatic Annotation System).

Ejemplo 5. Análisis de similitud de secuencia y sintenia del clúster de genes de degradación de diterpenos.

15 La secuencia del genoma de la cepa CECT8327 correspondiente al clúster de genes de degradación de diterpenos fue comparada con otras secuencias similares descritas para otras especies del mismo género. Para ello, se realizaron alineamientos múltiples con ClustalW y se comparó el orden génico dentro del clúster con el paquete GenoPlotR del software R.

20 Ejemplo 6. Caracterización de la capacidad de la cepa CECT8327 para degradar terpenos presentes en la resina.

La cepa CECT8327 encontrada en el análisis metagenómico fue aislada y crecida en un medio con resina de pino como única fuente de carbono. Para cuantificar la capacidad de degradar resina, se estime la masa de resina en el medio de cultivo a varios tiempos por diferencia entre la masa seca total y la masa seca correspondiente a las bacterias crecidas en dicho medio. Esta última masa se estimó a partir de un cultivo en medio rico LB, donde puede ser cuantificada de forma exacta por no existir componentes no solubles en el medio de cultivo. El contenido en resina durante la fase exponencial del cultivo en medio RM decreció de 5.4 g/L a 4.1 g/L después de 4 días, indicando una degradación cercana al 25% de la resina presente originalmente en el medio (ver Figura 1). El crecimiento de la cepa de la invención en medio RM se acompañó por la secreción de un sideróforo fluorescente, probablemente pioverdina, normalmente producida por diferentes especies de *Pseudomonas* bajo condiciones de ausencia de hierro.

Ejemplo 7. Caracterización de la capacidad de la cepa CECT8327 para degradar un material basado en terpenos lineales: el látex.

35 La cepa CECT8327 creció además en medio con látex como única fuente de carbono produciendo un sideróforo fluorescente. Se observe una unión celular al látex en los cultivos de la cepa CECT8327, y el crecimiento de esta cepa se correlacione con la aparición de fisuras en la superficie de muchas de las partículas de látex. Además, a partir de los 15 días, se observó una notable degradación del látex a nivel local, con la producción de hoyos u hornacinas asociadas a la interacción célula-látex (Figura 2).

Ejemplo 8. Ensayos de crecimiento en medio con compuestos hidrofóbicos, tipo hidrocarburos.

La cepa CECT8327 fue inoculada en medio mínimo (2 g/L NaNO_3 , 1 g/L K_2HPO_4 , 0.5 g/L MgSO_4 , 0.5 g/L KCl, 0.2 g/L pectona bacteriológica) suplementado con diesel, y se cultivo durante 7 días a 30°C en condiciones de agitación. Los cultivos se dejaron en reposo tras los 7 días y se observó el nivel de emulsionado de la capa superficial de diesel. El medio inoculado

con la mencionada cepa presentó un emulsionado mayor que el medio no inoculado (ver Figura 3), debido a la secreción de agentes surfactantes por parte de *Pseudomonas* CECT8327.

Ejemplo 9. Ensayos de tolerancia a biomásas ricas en terpenos y a fungicidas.

5 Para evaluar la tolerancia de la cepa a otros terpenos y a fungicidas, se suplementó un medio de cultivo estándar como el LB (Luria-Bertani) con peladuras de naranja y con distintas concentraciones de imazalil (un agente fungicida ampliamente utilizado en la industria alimentaria), respectivamente. En el caso del medio suplementado con imazalil, se cuantifica el crecimiento mediante conteo de unidades formadoras de colonias en placa (ver Tabla 1), y no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de la cepa de la invención en estos
10 medios con respecto al medio control, no suplementado con ningún compuesto terpénico ni fungicida, por lo que la cepa demostró ser totalmente tolerante a estos compuestos.

Ejemplo 10. Ensayos de inhibición del crecimiento de hongos.

Las propiedades antifúngicas de la cepa CECT8327 fueron testadas con distintos aislados fúngicos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* en medio mínimo con resina como única
15 fuente de carbono y en medio rico LB (medio Luria-Bertani) mediante ensayos de confrontación. Estos ensayos se basaron en co-cultivar diferentes aislados fúngicos en medios sólidos en presencia o en ausencia de la cepa de la invención. Las esporas fúngicas fueron inoculadas en puntos situados en el centro de las placas Petri, mientras que, en los casos correspondientes, la cepa de la invención fue inoculada en líneas horizontales paralelas
20 situadas a 2cm del hongo. El diámetro de las colonias fúngicas fue medido durante los 7 días siguientes. En todos los casos se observó una parada irreversible en el crecimiento fúngico entre el primer y el tercer día de crecimiento en presencia de *Pseudomonas* sp CECT8327, como se muestran en La Figura 4.

REIVINDICACIONES

1. Cepa aislada perteneciente a *Pseudomonas* sp. CEC18327 y mutantes de la misma donde las cepas mutantes son obtenidas a partir de la cepa CECT8327 como material de partida y mantienen o mejoran una o varias de las propiedades biológicas de la cepa CECT8327, que incluye al menos su capacidad para degradar terpenos cíclicos y acíclicos y/o derivados terpénicos cíclicos y acíclicos.
2. Cepa, según la reivindicación 1, caracterizada por comprender una secuencia con una similitud de al menos 70% respecto a la secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 1.
3. Cepa, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, caracterizada porque su genoma comprende al menos un gen, introducido artificialmente, donde el al menos gen codifica para una sustancia o compuesto para su producción a escala industrial.
4. Composición que comprende la cepa de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
5. Composición según la reivindicación 4 que comprende al menos un segundo agente antifúngico.
6. Composición según la reivindicación 5, donde el al menos segundo agente antifúngico es imazalil.
7. Uso de la cepa definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o de la composición definida en la reivindicación 4, para la degradación de terpenos cíclicos y/o acíclicos y/o derivados terpénicos cíclicos y/o acíclicos.
8. Uso según la reivindicación 7, caracterizado porque los terpenos cíclicos se seleccionan del grupo que comprende: diterpenos, monoterpenos y sesquiterpenos.
9. Uso según la reivindicación 8, donde el monoterpeno es un limonoide.
10. Uso según la reivindicación 9, donde el limonoide es limoneno.
11. Uso según la reivindicación 10 en el tratamiento de biomásas para la producción de etanol por fermentación alcohólica.
12. Uso según la reivindicación 7, para la degradación de terpenos acíclicos seleccionados del grupo que comprende: látex, goma vulcanizada, goma no vulcanizada o gutapercha.
13. Uso de la cepa definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o de la composición definida en cualquiera de las reivindicaciones 4-6, como antifúngico.
14. Uso según la reivindicación 13 en tratamientos post-cosecha.
15. Uso de la cepa definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o de la composición definida en la reivindicación 4, para la degradación de imazalil.
16. Uso de la cepa definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o de la composición de la reivindicación 4, como biofactoría en la producción de sustancias o compuestos industriales empleando la resina como fuente de carbono.
17. Uso de la cepa definida en una cualquiera de Las reivindicaciones 1-2 o de la composición de la reivindicación 4, como productor de agentes surfactantes en el tratamiento de un compuesto hidrofóbico.
18. Uso según la reivindicación 17, donde el compuesto hidrofóbico es un hidrocarburo.
19. Uso, según la reivindicación 18, donde el hidrocarburo es diesel.

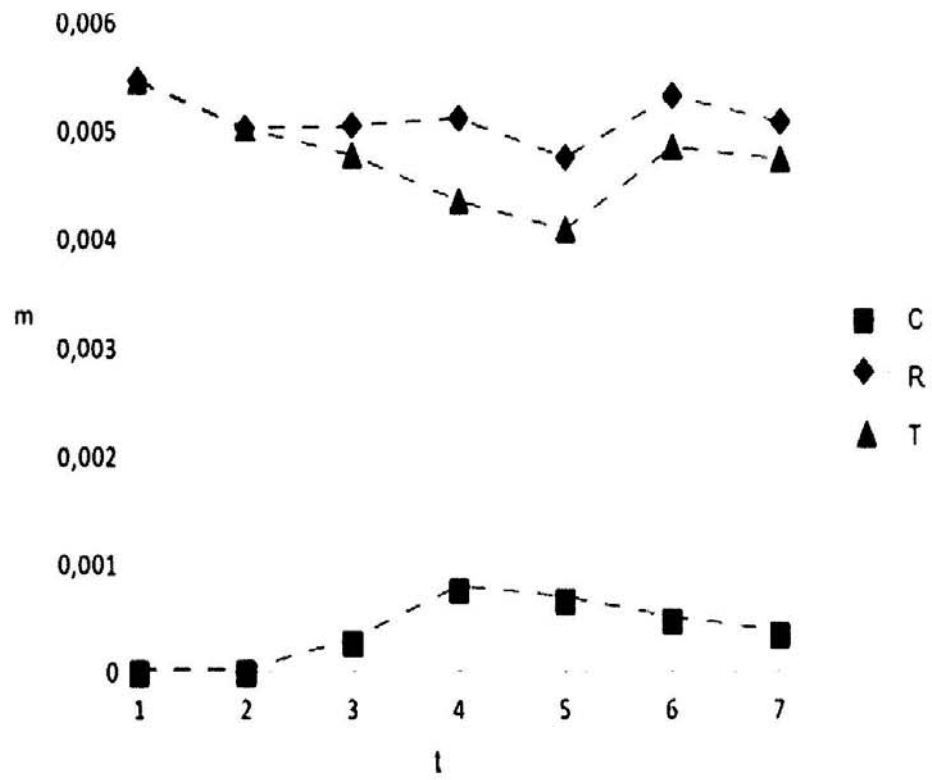


FIGURA 1

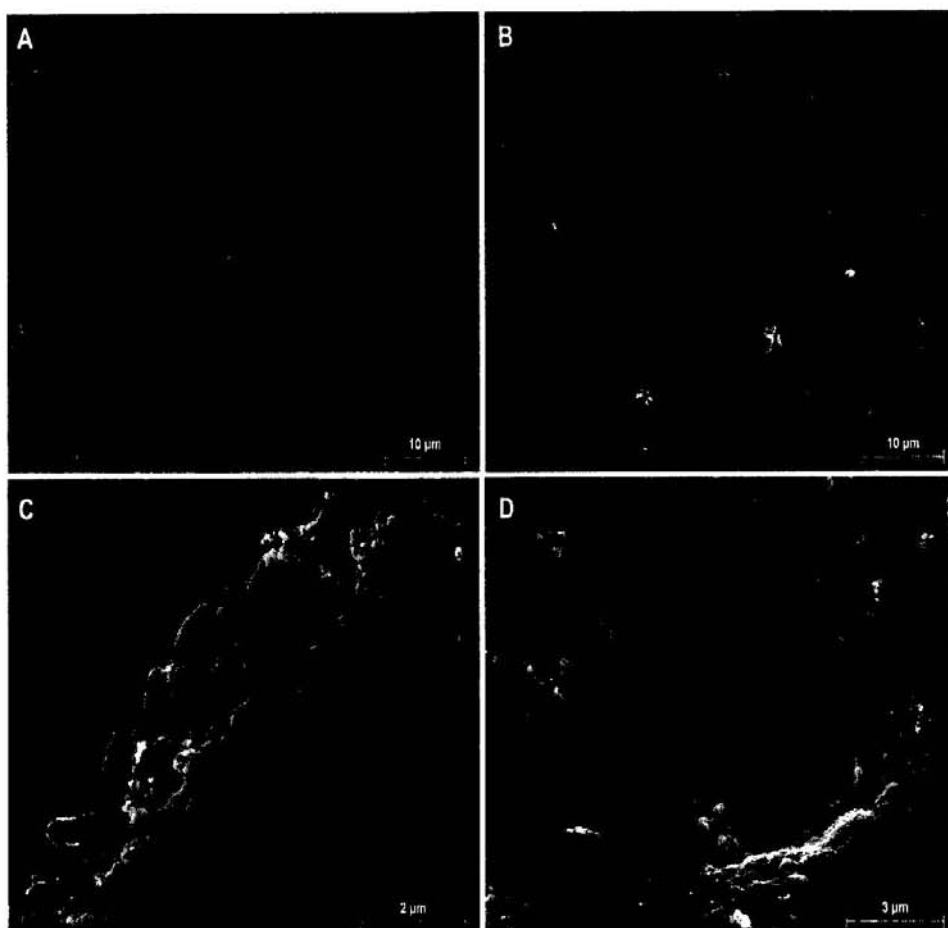


FIGURA 2

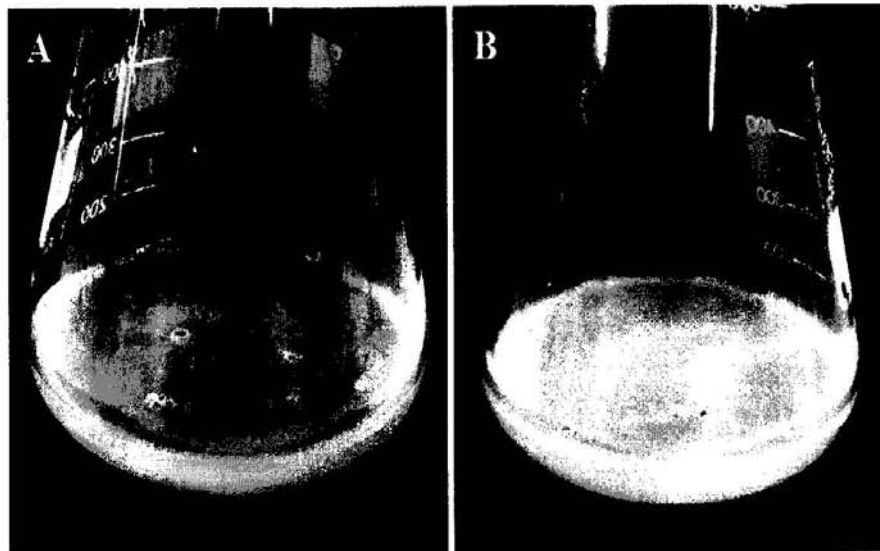
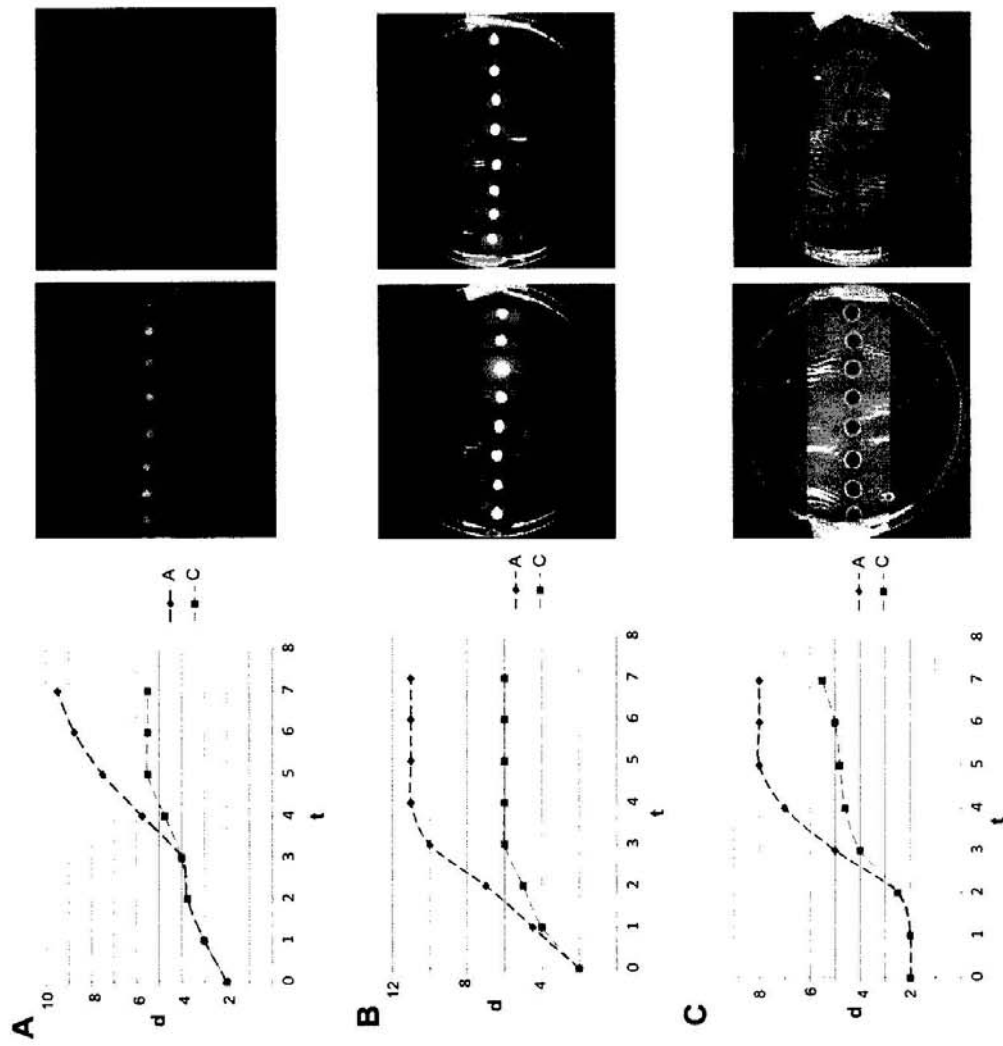


FIGURA 3



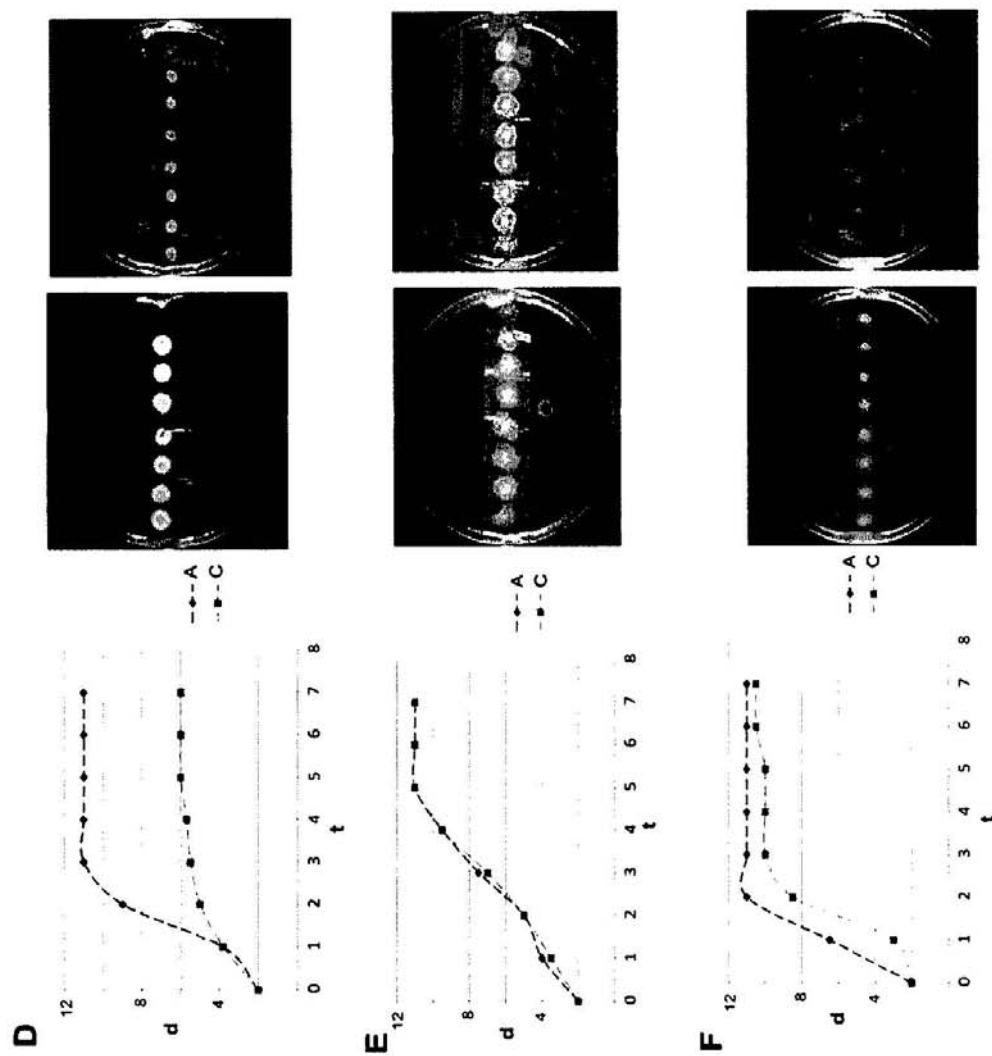


FIGURA 4 (continuación)

Lista de Secuencias

```

<110> Universitat de València
<120> CEPAS DE PSEUDOMONAS SP. Y USOS DE LAS MISMAS
<130> P-06339
<160> 2
<170> BiSSAP 1.2
<210> 1
<211> 36620
<212> DNA
<213> Pseudomonas
<220>
<221> source
<222> 1..36620
<223> /mol_type="unassigned DNA"
      /organism="Pseudomonas"

<400> 1
gcggtctgtc cgtagtgccg caaggcaccc aggatttgct cgtcggctctg cgcttcgaca      60
cccggggtca gtcagcgac gatgaaaggc ttgagcgag gctgcgccgc caatcgacgt      120
agccagcgca cgagtgaagc gccagccacg cgatcggttt cggcactcag gtaattggca      180
tcgatcagcg gcggaaccgc cggatccgtc gactggatac gtatttcgcc ctggctctgc      240
ggctgcagaa aataaccgcc gagggtcagg ccgggttcct tgcgatcat cacccggttg      300
ccatcaccga gcattgaata caggctgacg ccgatttgcg cgtcgggtcg gtccaggcct      360
gcgcgggttt tgacgaagcc cccggcctca tgagccgcat gggtcatcgg gcctttcttg      420
cggacaaagt agttgagcaa cgaccgaacc agtccgaagc cggcaaagca atggttaaag      480
cttcacgcg tcacccgata ttgcatggcg atatacaggt gctcgcgag attgcggccg      540
acattggccg aatcgctgac gacattgatg ccaagcctgg tgagcaattc ggcaggcccg      600
atgcctgaaa gctgcaagag cttcggtgtt tcgatggcac cggcgcacag tatcgcttcg      660
cacctgatgc ccatgctgtg caaccctgag gcatcgcgca cctgaacggc cactgcgcgg      720
tcaccttcga actcgatgag ctgcacggta ctggccgtcg tgaccgtcag gttgggtcgg      780
ctacgcacgg ggtcgagaaa tgccttggtt gcgctgaagc gttggccgcc ccagggtggtc      840
tgcggtggtt aaccaaattc gccatgacct actgcgtcca catcgttggt atcggccaca      900
cgcggtgtac cggcctgccc ggctgcagcg atgacggcgt cgcaacaattc atcgttggtg      960
gggtgaatgc tgactttcag cgggccgccc gtgccgcgcc acggtgcgct gcccagttga      1020
tggtcttcca gcgcgacgaa ctgccgccc atgtccttcc agccccagcc ctgcgagcct      1080
tgcgcctccc aggcacgta atcggccgga gcgcctcgta cgtagaccat gccgttaacc      1140
gaactggaac cgccaattgc cctgcccttg agccacagct catcggccat tccctacca      1200
cgcgaggcct gatagtccca aacatgcggg ttaccggctg cgagcaactt gccaatgcca      1260
cgcggcatcg agatcaacgg gctggagtgt tccggccac tctcgatcaa cagcaccgag      1320

```

acactcggat	cgtgggagag	ccggtttgcc	atgacgcagc	cagccgaacc	cgacccaca	1380
atgatgtagt	cataggtttt	gagcattttt	attattctgc	gttgcgacgt	gtgcggggac	1440
tgtagaactg	cactaccccg	tgcacaacgg	acagatgtgc	ggatctgttc	ggtgactggc	1500
gctggcaatt	tgttgcacag	ggtctagcca	ctcttcttgc	tcgacccaga	cgcttctgcc	1560
agtctggaac	ccgtgcgaaa	aagacattct	tcaagaatat	gtccaataac	tctaaaaatt	1620
aaccgcgcct	ctgacgtaga	gattccccca	tgaatcaata	cagccccccg	cagaaccaat	1680
ggcctgaatc	cttcgacccc	agcgctgacc	gacacagacg	gcgtgcccga	cgcacacggg	1740
atctgatgtt	gaccacgatg	taccagttgg	cactggaaaa	ggactatcgg	gaaattaccg	1800
tgcaagacct	gctggaccgc	tcgggtatcg	cgcggtcgac	gttctatgcc	cattttcggg	1860
acaaggagga	cctgctggtc	gcaggctatg	gcgtcatggg	cgacccggtc	gtcaagccgg	1920
gcacgggcag	cggtgggtcg	cgtgtggtgc	tggacgtgtg	cggtgggtta	ttcgttgcca	1980
cccgcacgca	tgacgcgtg	accacctcgt	tgatggggcg	cgctcgcgg	gagatcgttc	2040
ttgcccatct	cgaaaacctg	ctgatcattc	aggtcccgca	acacatgaag	cggtatgggg	2100
cctatggggg	cgatgagctg	cgcgccgaaa	tcgctgtgcg	cagcctggtc	ggagggtgct	2160
ttgccatgtg	gttatggtgg	gtgcgccagg	actactgcca	tagccccgcg	caaatcagcg	2220
agcgtttcaa	cgccctgatg	agcgacgggg	tctggcccga	aaatccggaa	agcgtactgg	2280
taaccggctg	agcgagcaga	tttacgagcg	ggtcggccat	gacgccgatg	ccaacgcttc	2340
agggctcatg	ctgggcgcaa	agtacaagct	cagcgacgca	gggatacgtg	gcctgtcggt	2400
cggccatgac	cggttcggcg	ttgagcggcg	tgccaatcag	gcaggcatcg	atgcacgatg	2460
tatcactcgt	aagtctgcga	tattcgccca	cgcccgaatt	ttagtcagtg	cgaccaggct	2520
cggcaatcgc	catgtcctac	gcatgttaat	gccccaaaaa	aggccctgaa	ctcaggttca	2580
gggcttgtt	ctcagtggca	actggacgcg	tgagcgaggc	tcaggccttc	agcgctcat	2640
cgatggcggc	tgtaaacgt	gcgtcatctg	cggccacgtc	cggcgcaaaa	cggccgatga	2700
ccttgccgct	gcgaccgacc	aaaaacttct	cgaaattcca	cagcacttcc	tcggggttgc	2760
cgtctcgtat	gccgtagccc	ttcaggcgct	cgcggaacgg	gccatcgcca	gtggcggaag	2820
gctgggcagc	agtcagttcg	ctgtacaggg	gatgcttgtc	agcgccagca	accgagattt	2880
tcgagaacag	cgggaagtgc	acgtcgtagg	tcgtggagca	gaacgactgg	atttcgctgt	2940
cgctgccagg	ctcctgctct	ttgaagtgt	tcgccggaaa	gccagcact	tccaggccct	3000
cgccatgctt	gctctggtaa	agctttctcca	gcccttcgta	ttgaggcgtc	aggccgcatt	3060
tggaggccac	attgaccagc	agcaggacct	tgcctttgta	ctgacccaga	ttgctggaag	3120
tgccgtcgat	ctgtttcagc	gggatgtcgt	acagcgaagt	gctcatgcct	gtctccttga	3180
atggtgggta	ctttgaccgg	tggtcatgcc	aggacacacc	ttaaagcgtc	cgaccgataa	3240
tttctttcat	aatttccgag	gtgccgccgt	aaattcgcg	aacgcgggca	tcgacccacg	3300
ccctgctgat	cttgatttcg	ctcatgaagc	cgtagccacc	gtgcagctgc	aaaaactcgt	3360

cgagcagctt gccttgcac tcggagccca ggagtttggc catggcggcg atgtccggcg	3420
tcaattcacc ccgcatgact ttgtccaggc aatcgctgac gaacacccgc agcatggtcg	3480
cctgagcctt ggcctcggcc agcttgaagc ggggtgttctg gaaatccagc accggccttg	3540
caaacacctt gcgctcacgg gtgtactcga tggtttcctc cagcagggtg tcgatcgact	3600
gcgcggcccg aatggcgatg atcaagcgct cccatgccaa ctgatgggtg aggtatttga	3660
aacccatgcc ctcttcgccc aggcgattgc cgacaggcac ccgcacctga tcgaaaaaca	3720
actctgaggt atcctggcct ttcagaccga tcttctccag caagcggccc ttggagaacc	3780
ccggacggtc ttcttcaacg cacaccaggg tcagtctcctt ggcgatggga tcgagcttgg	3840
tcgcggtaac caccagaccg gcgttgccac cgttggtgat gaaggctctt tgcccggtga	3900
cgatgtattc gtcgtcctcg cggcgcaacg aggtgcgcat cgaacgcagg tcgctgccga	3960
tgcccggttc gctcatggcg atcacgccga tcaactcacc gctgaccatg cgcggcagcc	4020
acttctgttt ctgctcctcg ctgccatagg caacgatgta cggcgtgacg atctcggagt	4080
gagtgggtgaa gcccacggcc gtggcattgg cccgggccag ttctctgac atcaccgccg	4140
aatgcccga gtcgcccc gagccgcat actcctcagg gacggtggaa cagagcaagc	4200
ccgtctcgcc ggccttgagc cacagctcct tgggcacgat gccgtttttt tcccactcat	4260
gcagggtcgg cagatttcc cgctcgacga aacggcgggc ctgatcacgg aacatgttgt	4320
gatcttcacg aaagacgcgg cgcatgacgg ttctccctt accttcttat tgttgtcag	4380
ttacttgtcc tggtagctgg gcgcgcgctt ctcgacgaag gcggccacgg cttcctcatg	4440
gtcggcgggt tgatgagcga tggactgata ggcggccgac agttcgagca gagaatccag	4500
gcgcatatgc tgacctcgc gcagcagccg ttgacacagg cgcaaggcgt ggcggggatt	4560
actggcaatg cgcctggcca gcgcctgggc ctcggactgc agggtttcat gggtcagac	4620
ctgttccacc agtccccagt ccagcgctt ggtcgcgtcg atggggtcgc cggtaaaagc	4680
catcaggctg gctttgggaa tgccgatgat gcgcggtaac agccaggcgc caccgtcacc	4740
ggggacgata cccaggcgca cgaaactctc ggcgaacacc gcggtgggag acgccaggcg	4800
gatgtcgac atgcaggcca ggtcaagtcc ggcgccgatg gccggcccgt tgacggcggc	4860
gatgatcggg atgtccagct cgtacagcgc cagcggaatg cgctggatgc cgtcgcgata	4920
gggtgcgcgc agttcataag gctgaccggc gaagatgcca ctgcgctcgc gcatgtcctt	4980
gacgttgccg ccggcgaga acgcgctgcc attgccggtc agcaccatca ctcgcgccgt	5040
gcggtcacgg cgaggttcg cgcacagttg cacgaattct tctatctgtt ccggcgaggt	5100
cagcgcgttg cgagtgtccg gatggttcat gcgcacggtc acgacagggc cttcacgctc	5160
gatgtgcaaa aacgcgggtc tgccgatact ccacagcttg agttgtcagt catcaatggc	5220
cagaaacctt cggcacctgc cgcgcagacc tgggtgccta tcatctggct ccagtgcgtg	5280
accgagccga attcaccacg ccaggccac aatctacggg tgtacaactg caaggcatat	5340
tcctgggttaa aaccgatggc gccgtggacg gcgtgggcaa tattcgcgcc ctgggtggcg	5400

gcctcggccg tggtagacctt ggccacggca accgaaaacc agttcaatgc ccggtcggat	5460
tcggcaaacg ccgcttctgc ggcgctgttg gcagccgcag cctgctcggc gaacaccgcc	5520
agttgctgct ggatcgccctg aaacgctccg atgggtttgc caaactgatt gcgttgaccg	5580
gcgtactccc ccgtcatgtc aagcaacgtg ctcaaggcgc ctgcaatctg tgcgtgcgc	5640
atcagtgcgc cgcgggtttg cagcacttcg ctgttcagac cgctgggcag cggcgcgcgg	5700
tccagcaccg tggcttcgct gaaaaacagt gcatcccggg gttctccggc aatgttcaag	5760
ctttgttcga tacgctgagc ctgcccgcgt gccaacacca ccagcatggg cccgccagca	5820
tcgctgtcgg caatggcgac aaccgattcg acatgccgcc cccaggggac atcaggcagc	5880
accccgctca cccgctcgtc attgagcaaa agcctagggt tggcgagat gctcaagctc	5940
cccgcttcgc gctcaagccc gcagcagccc aacaaccagt tggctaacag cgcctcggtc	6000
aacggcacgg gaacggcaaa tcgccccgcc gctcgcgcga tcacgtaaag gtcggcccag	6060
ccagcgtcgg cccacccag ggattcaggc gcggcgccca gggtaaagcc agagtcttcg	6120
acgggttccc ataacgccgc aggccatacg ccgccttcgc tggcggtgac cgtttcactg	6180
tccacgccgt cgctgagcag gcgttcgatg gtggattcaa ataattcgcg catgattatc	6240
gcaaccccag gccacgggag atgatccgc gaagaatttc gcgagtgcg ccgcgcaatg	6300
aaaaagaagg cgccatctgc gtcagatacg ccagaacctg tgcgtgatcg cttccaccgc	6360
gctgcggagg ttgatgtcc agcaatcgtc gcgcaagctc agggatgtcc tgcctaaagg	6420
tgttaccag atccttcacg caagaagcgg cccacgccgg gtgttcaccg ttggccagtt	6480
gcgcccgaac cgccagtgc atgttgcgca gtgtcgcgag cctcgccgtg aggcgaccga	6540
cttcagacgc ctgcagcgc tcgggttggc taccgatggc atcgatcatg gttttgatca	6600
acgccatgga actgagaaaa cgttcggggc cgctgcgctc gaacgccagc tcggccgtga	6660
cctgtccca gcccttgcc tctgttcgga tcagcgcac atcggccagc actacgtcgt	6720
cgaaaaagac ctggttgaat tgctcgcgc ccgccagatc gcgaatcgga cgcacggtga	6780
tgccgggcaa tcgcaggtcg acgatgaatt gcgacatgcc ttcatgccgc ccgttctgct	6840
tatcgccggt gcgcagcaac gcgatcatgt agtgggagt gtgagcgtt gtggtccata	6900
ctttctgacc gttgacccgc cagccctcag cgtcgcgaac tgcggtgag cgaatggagg	6960
ccagggtcga accggagccg ggctcgtca tgccgatgca aaaatagctc tcgccgcgac	7020
agatcgccgg caagtagcgg tctcgtgtg cggggtgccc gaatttgtt atcagcgccc	7080
cgctttgcc atcggcgatc cagtgtgcc acaccggtgc gccggccgc agcagctctt	7140
cgctgacgac gtagcgcgca aagaaaccgg cctgattgcc tccgtattcc ttgggcagcg	7200
ccatgccgag ccagcctttg gcgcccagcg ccttgcgtga gctggcgtc aagcccatcc	7260
aggattgtgc tcgctgtgc ggccgataat cggccagcgt atcagcgaga aagcggcgca	7320
cctcggcgcg caacgcttct gcctcagcag gaatccggct gtaggtaaat tcattgatgg	7380
ccatgaatgc tctcgaatac tgggcatgca aaacgcggaa aagacatccg caggacgtgc	7440

gtgaccgttt cgttcattcc cgacctgtgc gtggcagggtc gggaaatgaac gcgcggtatt	7500
tacagcgcggt tttgcgcgtc ggcttttttcg aacatcgcat tgatgtcgcc ggaggtcacc	7560
ggcttgccgt cttcacgacc atgatcggcg ccgccaaggc ccagggcccg ctcgactttg	7620
acgtgagtgg cttgcgcgcg cagggcgcca acggtgcagt tctcgcgtcc caggatggag	7680
aacggatcgt acgagaactc gcgcatggca ttgaggtggg tcagcttggtc gatggtctgg	7740
tcgggaagat gcttgaggcc tttccatgcg gtttcggcg actccggcca ggtgcagtcg	7800
gaatgcgggt aatcgctctc ccaagtgacc atgtcttcgt tcatgaagct caggttctgc	7860
aggccgaact tgtcttcaat gaagcagggt atgatgtgct tgtggaagat atcgctgggc	7920
atctgcccgc cgaagttaga attggtccaa gccttatgat ggcatgggt gaagtcggca	7980
cgttcgagca ggtatggcac ccaaccgatg ctgccttcg agagcgccat gcgcaggtcg	8040
gggaatttct tccacatcgg cggccagatc cagtcggctg cggagttggc gatggagatc	8100
ggcatggaag tgatccacgc gtcgatgggc gacaggtccg aagcgtgatt ggccttgacg	8160
ccggtgcccga tatggcagca gatcaccacc ttgtgttcg aacaggcttt ccacagcggg	8220
tcccagtagt cgctgtggat cgatgggtaa ccgtggatgg ccgggttatc ggacagcgac	8280
agtgcgtgta cggcctgcct tgccatgcgg gtcacttcg cggcggcggc ctgcatgtcc	8340
caccacggca ccagcatcaa ggggatgaaa cggcccggcg cggcattgca ccagtcatgt	8400
aagtgccaat cgttgtaggc ctggatcgca gcgaacgaca catcccggtc ggcatggacc	8460
tggaagcgct gcccggcaaa gccagggaag gtcgggaagc acagtgagcc caacacaccg	8520
ttggcgctca tgcatccac gcgatccttg atgttccagg tgccacgacg catctggtcg	8580
taaccagggt gtcctatgcc atattcttct ttcggacggc ccaccaccga gttcaggccc	8640
atgtagccgg tagcctgttc ctggaagacc cagacatccc ggtcaccggt tttcactacg	8700
tgccgctcgc gacctttgaa gcgtgcgggc atgtgacggg cgaacgcatac tggcggttcg	8760
atggcggtgt cgtcgacgct gacgagaatc agatcatcaa ttttcattgt tcttcccttc	8820
tcaacgggtt gtttgttgtt gtgcctgaat catagatcac cattggttta aattaaacac	8880
tttatttgat tgtgttcata taaattcgga tgaacgcggg agctgcagcc gcgcataaaa	8940
aaccgcgccc ttgatgggcg cgggttcggc ggatcgacag cggttgggcg gtggatcagt	9000
cccagatcac gtgaacctcg tgagggtccc gcagttgcgc gccgacgatc tgtggcgcg	9060
gtttatcagg gtccaggcg atattcgga tcaggtcaag aattgcgttg agcgcgcagt	9120
tgatctcggc cttggcgacg aactggccaa tgcacatgtg cgggcccagg ccaaaccga	9180
atgaaggccg cggcttgca tcgatatcga atcggtcagc gttctcgaac gcatcttcgt	9240
cgcggttggc cgacgacag atgcactgca ccacgcccc tttggggatc ttcacaccac	9300
ggatttcagt gtcctgcgcg gtctgacgta ctttgaaggc cgccacgggc tcgaaacgca	9360
cggcctcgtc gatggccttg ttcaccaggc tgcgatcggt gcgcacccgt tccagggtct	9420
gcgggttctg cagcagcaag gtaatcaatg taccaaaggc gcgcgtcgtg gtttcgctgg	9480

ccgctggcag caaggaccgg acaaaggctg cgatttcatg gtcattccaga gaacggccct	9540
gatattcggc gctgatcaaa cgactgatca ggtcgtcacc gtccgctcct cgcgcgcggc	9600
gctcggccac caccactttg accacgtcat acagcgcctg ggcggcatgc atggcggcac	9660
cgcgtgcggc ggcagccttt tctgggtcga cttgcggccc ggcaaggatg gccagcggcc	9720
aagcggcgta ctgctcgatt tcttcgggct tgtcttcagg aaaaccgatc agggcataga	9780
tcacccggtat cgggaaatac agagcgaagt ccatgaggtc cgccgacttg gctgccacta	9840
gcggttgat gtattcgtcg cgaatcaccg ggtcgtatctt ggtttccttc cagcggttga	9900
ccgtctcttg catgaacacc ggctgcagca gattgcggat attcttgctg gcatcgccgt	9960
ccatcgccgt gagaatcaag ccgtcgaaga aagcccccaa ccttcggcg atgaaccgcg	10020
tggtgaagtt tttcgcgtcg cgcattcaccg ccatcacgtc gtcataattg aacagcgtga	10080
aggtcggctg attcgggtcc aggcggcaa tcgatggcac gccaggctg gccatgaagt	10140
tgccttcgag aattggcggtg gtcctgcgca tctcggcgta gaccgcttg aagtcaacat	10200
cgtgccacg gtaattactg gcgacgttg cgaactccct gttcagattg ctttgcgcct	10260
gaacggacat gatcatctcc tctcttggtg tttattatgg gtcgatacgc ccggtggcaa	10320
gaccaggttc agccaatata ggcgaaatgc tgaacgtaat ggcggaatct gactcaataa	10380
tcccttgata aggcgaatc agtcccagcc aggtgttcaa tccagccgct cgatgatggg	10440
cgcggtgccc atgcgcgccg cgcagcagat ggcttcgagg ccatagcggg cgcctcgtcg	10500
ctcagactca tgcagcaagg tggcatcag gcgcgcgcgc ctggcaccga ggggatgacc	10560
cagcgaatg gcgccaccat tgacgttgag gcggtcatgc gccacaccgg tttcccgcat	10620
ccataccagc ggcaccgggg caaacgcctc gttgacttcg aacagatcga tgtcgttgat	10680
gtacagcccg gctttcttca gcactttggc tgtggcagcg atgggcccgg tcagcatcag	10740
cgtgggttca gcccctacgg tgggaacgc gatgatccg gcccgagggt tcagcccctg	10800
gcgccgagcc gcttcagcgt ccattagcaa caaggccgcg gcgccgtcgg atatctgcga	10860
cgagttgcca gcggtgacct tgccgttgtc cgggcggaag ctggttttga gggtgacag	10920
tttttcgctg gaggtgtcgc ggcgtatggg ttcgtccgac agcaagcccg cagtcacctg	10980
cgcacgtttt ttttcgctga acgcgtgcac cgggacgggc accagctgac tgtcgaata	11040
gccagcgtcg ctggcctcg cagcgcgtcg atggctgggt atggcgtaat cgtccagatc	11100
gtcgcgactg aggttcagc ggtcagcaat gcgctcggcc gcctcgccct gactggtcag	11160
ctcgtaacgc tcgctggcca tccagccgaa cgctcgcgcg tgcaggctgc ggttgctgcc	11220
catgggcacg cgactcatgt tttccgcccc ccccgccacg ataatgtcgg ccatcccggc	11280
ggcaatgaag cctgcgccga catgcaccgc cgcttcgcca gagccacact tgcggtccag	11340
ggtcaggccc ggcacgctct ctggccagcc ggcaccgagc aacgccgtgc gcgcgatgtt	11400
ggccgactgc tcgccgatct gggtgacgca accgaagatc acgtcatcca ccgtccccgg	11460
cgaagatca ttacgtcga ccagcgcatt gatcaatagc gaccccggt ggtcggcgcg	11520

cacgctggcg aggcctgccgc ggaaccggcc cacgggctgt cgcaaggcgt cgatgatcac	11580
gacctctttc ataacacgct ccctttcagg ccaactgccag gcaactgcctt attgtcttca	11640
tagcgataga cgccgtgccc ggtcttgcca cccagacgcc ccgccgcgac catcttgata	11700
atcaacgggc atggtcgaaa cttctctccc agggctctgtt gcagataacg cagcaccgac	11760
aatcgctgtt cccaaccggt caggctgccc agttccagcg gcccctatggg gtgggttaaaa	11820
cccatgcgca gcgcagtgtc gatgtcctcg gccgtggcaa taccttctctg cagcatgtac	11880
atcgcttctg tgccgagcat cgccgacatg cggctgggtg tcagccccgg cgactcgttg	11940
acgatgatcg atgtcttgcc catggcatcg cacaatccc gcgtgcgagc cacgggttca	12000
tcgctggtgg ccaagccgcg caccagctcg accagtttca tcttggtgcac cgggttgaaa	12060
aagtgcattg cgataaacg gtctgcatg tctatcgacg ccgcgatctc ggtaacgctc	12120
aatgccgaag tgttggtcgc gatgatcgca tcgggcgcca gcaacggcgc tgcttgggcg	12180
acgatggcct ttttgattgc cagttgctcg gaaaccgtct ccaccagcca gtttgacca	12240
ctggccgcct cgctcaggtc gctggctgtg cttagcctgg ccagcgcagc cttcgttgt	12300
gcggtactga ttttgcccaa ggacacgcca ctggtgagaa tcgcttcgat ggcaccgcgg	12360
gccttggtca atgactgggc attggtgtcc accagaaccg tttgcagccc tgcgtgaca	12420
aagccgtggg cgatcccgtt gcccatcagc cctgctccga cgacgaccac tttgttattt	12480
ttatcgatgc tcatgccgag acctttgatt ggaccagtga cttttcacc acgacattgc	12540
gcaagggtacc gatccccca acgctggctt cgaccacatc gcccggttg aggaagatgc	12600
cgggtcccat gccgaccccg gctggggagc cgggtgaagag cacgtcgcca caggcgaaac	12660
tcgagcgtgt ttgaacgaaa gcgatcagct caccacatc ccaggctcatg tcggccgtgt	12720
tgccgtcctg gcggatctgc ccattgacct tcaagagcag gcgtaacctg ggcgaaccgg	12780
cgggaagtgc gtcttggtc agaattcacg gcccagccc ggtggtcttg tcctggcttt	12840
tggccgcgaa cagatccatg ccgatgccct tgggaccact gcgtgaagg tcgccccgc	12900
tgacgtcgtt gccacggtg tagcccaata cgcaggccag tggatcgtcg aggtcgaccg	12960
tatcgggtgc gatcaccgcc accagttcca cttcatggtc gagttcggcg gtcagcggcg	13020
gaaagcggat cgggtcgtgg gcgccaatca gcgccccgta tgccttaaga aacgccaccg	13080
gctgtgacgg tgacgccagg ccgaactcga ccagatgctt ggcgtaattg gcacctgcca	13140
ccacgacgcg attggtgggc tcgaccggtg gtaacagcgt aaccgggat aaaggcagtg	13200
gagggccgga aaaacgcagc gcgctgatac cggcaccctg cgcaaccttc ggcgccact	13260
cgcgaaaatc acccgcaatc ggcgtcacca tgtcctgctg cgcatcgacc accgccaga	13320
acacgccgct ctcgaaatag gaacagcggg ccagtttcat cagactgctt ccttggcagg	13380
ggtgacctga cccacacgag ccggatccag atgcagcaac ttgcacgcat tctgccaacg	13440
gattttctgc aggtcggatc cgctgagttt caggccttcg gtgaggtcgt gacgcaccgc	13500
atcgctgcc aaggaattac tgccatagac catctggtcg gcaccgatca cttcaatcag	13560

cgcttgccgc atcggcagtt catgcagttc gacgtcaaaa tagaagttct tcatgtaatc	13620
gagcacaggg cgtttgttgt gcaccacgtc caggttcttg ttggtctgcg ccaggcggcc	13680
caactggtac gggacatagc cgccaccgtg agtgatgtac accttaaggt ccgggaagcg	13740
atcgagcacg ccgccacaga tcaggttcca gaagcagcgg gtttcgtcgt actgcatgcc	13800
gacgatcgcg gtggtttcat aacggtcttc gttggcgcga tcacccaggg tcaccgactg	13860
gttataaccg tggatgaaca tcggcaggtc gagatcacag agggctcttc agaccacgtc	13920
aagttctggc gagtcgaatt caagcccgcc gaagttggcg ccgccggcag aaagcccctt	13980
ggcgcccagc tcggtgcagg cacggcgcaa ttccacggcg gcggcctcag gcgcgttcag	14040
cgggtgcatgc gcccagaaca tcagacggtc cggagcggcc gagcaatatt cggcgaaggt	14100
gtcattcact gtgcgggctg acggaacggc gtattcggct tcggtccagt acatgtagca	14160
gtgggacgga accgagacca ctgacaggtt ctgacccgca gcatccatgc ccgccaggcg	14220
aacttttgga tcggccactt tggccatgta ttctctgagc ttgagcccct tgccagcacg	14280
cacggcggcc ttgcgtctg gcgagcccag ggtcaattgc catttaccga cgcgcaggcg	14340
gatatcgccg tcatcgactt gttcgaaaaa cggaccccaa tgtgggtgct ggttgtaata	14400
gccagggagc ggcgcgtggg cgtgaagatc aataagcata atccgggacc tctacgtgga	14460
aaccttctgg tttttgtgat tgttctgggt gttgcacttc ccaaagcacg gcgcctggag	14520
ccctcgacgg gcggcccgcc aagtcagctc aatcggcttc ggtctgctcg aagcataaaa	14580
ttaatttggc cataaatcaa aatagtgttc agattaattt caaaatttgg cgttgaggac	14640
cggaccagag cgctccttgc cttcgcctcc ctgctggttt tgcgcgaaca tcacaggaaa	14700
aactgcacat atcgcaattt gaagacgaaa aaaaaccgac ctctgtgacg ccagggggccg	14760
gtttgctttt ttatgaaagt gtctaaataa gcacttcagc gccgagtacg tgaagtcgac	14820
cccatggtca tggcggcggc cagcttcttg acccgtagcg gcaacaagcg gcgactggca	14880
ctttccggta ccaggatttc actcaagaca tagcggatga tcatttcaca caacagctct	14940
cgggtccagac gcacgccgag tttctcatcc caatcgtcaa agacgatgtt cagcacgtcc	15000
tgaaaacgca cgatcgaatc atgaaaaata cgctgaaga agcccagcgc ataatccggc	15060
gcgaccacga gcaaacggcg tgcccggctc tgctccaggt agttgtccag gtacacgaac	15120
aacgcgttga gccgcgcctc ggggtcttct atctgcccga gcgccgcggg cagcgagacg	15180
tggaagctgt cgcgcttggt ccgggaaaac gtatcgagca ggtcttcctg agaagagaaa	15240
taacgataga acgtgccacg cgaaacgcct gcgaccttgc acacgtcgag aatcgagatg	15300
cggtcggcac ccgactgcag caccacctct tcggtggcaa ccagaatatt ggcaatggtt	15360
tcttccgacc ggcgattggg ttgaccttg accggccctg cagcaccttt actgccagcg	15420
cttttcgagg ccggggcttt ggtggctgta cgagcggctt ttgcaggagc aggaggggtc	15480
tttttcgagg cgctgacggc ctttggcccg acgggttttg cctgttgttt tggaggtctt	15540
ggcatggata agcagactcg tggacatttc gatgggccac ggtagcatat gaattaagca	15600

tttcgcgag aatttggtca acttcgggct agagactttt ccaaaatctt tccatagaat	15660
ccagttctct catcaaaaaca agattcgggc gccctcttca ttgcgcgcct cacaaaagga	15720
gaatattcat gagtggcacc gggaaccccg aagcctggac ggtaggtgaa cgagacacgg	15780
tcattttctgc gctggagcga gcggtagcga gggctccaga taagggttcta ctggatttca	15840
gcgcaacctt gtacacatac cgggaagtgt atcagctttc caacaggatg gcgcatgccc	15900
tggccgatct gggggctctgc gccggtgcca cgggtctgac catgcttgac aacaacatcg	15960
acgcggtcat cacctggctg gccatcaaca agctctgctc cgtgagcgtg ccgatcaata	16020
cggcgctaaa gggtaggttc ctgcgccacc agattgctga caccggtaca cacctggtga	16080
tctgcgaagc cgactatctg ccacgcgtgg ttgccatcgc cgaccaactc actgatgtga	16140
agcgcgtact gttccgcacc gcacctggtc agcagagcag tgagtggcct gtctgcccct	16200
tccccatcga acctctggat tcccatcgtg gcatggatga ctcggcattc gagcgcaagc	16260
cccagccatc ggacctcgtt tgcttgatct acacctcggg caccaccggc ccgtccaagg	16320
gctgcatgat cagctataac ttcatgtgca acctcgcccc actgcaattg cgcgccggcc	16380
ctgcgagcga gaacgacgtc acgatcacc ccctgcccgt gtttcacatg aacgcccttt	16440
gcgtgagcat catcgccagc attctggtcg gtgcccgcgc ggcgattctg ccgcgctttt	16500
ccgtgtccaa cttctggccg gaagtcgagc gctccggcgc gaccatcgcc tcgatcctcg	16560
gcggcatggg tggcctgctc gcgcaagccc ccgacaacga cgccatgctg cgtgcccgcg	16620
ggcagatcca taccgcacgc ggcaaccctt acaccgaaga gaccaagaaa atctggcggg	16680
aacgcttcgg cagcaagctg gtggggcgga acgggtacgg gctgaccgag gcctgctgtg	16740
tgacttcgct ggcggcgggc gaatacgagc cgccgggttc gtcgggcaag cgcattgccg	16800
atcttcgagc gcggtatcgt gacgaacagg acaacgaagt acccgccggc acaccgggcg	16860
agatcgtggt caggccgcag cgcccgga caatgtttcca gggttactgg cgccgccccg	16920
aggacaccca caagttgatg cgcaacatgt gggtccacac cggcgacgtc ggcaagtctg	16980
atgatgacgg cttctttctac ttctgtcgacc gcaagaagga ttacctgca cgccgcggcg	17040
aaaacatctc cagtttcgag atggaagcag cgtttgccac ccacccggcg ctgtcagaag	17100
tggcgggtgca cgcagtgctt tcggacaagg gcgaggatga cgtcaagggt accgcagtgt	17160
tgcatgagca taccagctg gcgccggaag cactgtttcca ctggggccgc gacaccgtgc	17220
cgtactacgc gctgcctcgc tacatcgaat ttcgcaccag cctgccgaaa aacccccagg	17280
gtcgggtgct caagtacctg ctgcgcgatg aaggcaagac cgccaccacc tgggaccttg	17340
acgacaccga catcaaggta gccaaacgct gaaaggccat gcggcgtgcc tggcacgccg	17400
catcccttcc cgccgactca gtattcgcgc gcggggatgt gtgcgggtcg cgagttgtag	17460
cctggcaagt gcaaaccacc gtccacgtgc aggggtttccc cggtagcgaa gcgagacatc	17520
tcggaggcca gaaacacaac caccgggccc atgtctgtct ccgatcgcc acaacgcccc	17580
agagggcgca aaccggcgga catttcagca aacccgggat tctctttcgc cagtttgtga	17640

aaggtcgccc ccattcgcggt cggcgctatc gcattgacct ggatattgaa gcgtcccat	17700
tccgaagcag cgctgcgcgt cagccccacc actgaggact tggcgggtgt gtagtcgccc	17760
tgcagccatg cggcgacttc ggtatcgatg gagtaaaagt tgatgatctt gccgccaccg	17820
cgcgcctgca tgggcgcaaa cgcagctttc atcgaccacc aggcgcgcca taccgtggag	17880
ttcagcgtgc gctcaagcat gtcgtcggtc ttttcttcga gaagcacgtt gggggtgggc	17940
gcaaaggcgt tgttgaccag gatgtccagg ccaccgaagt gtcgaccgc agcgtccacg	18000
gcggcctgaa tgtccgcctt gcaactgacg tcggctcttg tgaacaaagc ttgtgcacct	18060
aacgccttga gttcctcgac caccgctgcg ccgctgacct cgtcgagttc tgccactacc	18120
acggcagcac cctgcctggc gaagctcaat gccacacct gcccgatacc cccgcggcg	18180
ccggtgatca gcgccacttg ttcctgcagc aggcctatag ccgctccttt ttgtgtgtgt	18240
tggaaaggca tttcatcact gtatatgtga acattatccg atatagtgtc caaataaaac	18300
cgataaaaat gcacactcag ccagataaga aggataagcc ggatgagtac gtttcgccgt	18360
cgcgtcgaga tcgtttccag tggccagaca gacggcgggc aagttcgcg cgcctggaa	18420
gacgatttcc atcacttccg cgtcagcctg ctccatcggc acggtgtgct gacgcacatc	18480
accggtcaag ccgtgaggtg cccctacacc gcctgtcccg aagccatcga acccttgac	18540
gcgctggtgg gcatggcgct gtcgcccatc gcccatctcg tgacacgtca gactgacgcc	18600
cggcatcaat gcacgcactt gctggatctc gccggcctgg cactggcggc gacgctgcga	18660
cccgcgcaat ccagacgcta cgatatccag gtaccgctgc gcgtggaggg ccgaacacgg	18720
cccatccttg agctgaacgg cgagcccctg ctggaatggc aggtccaggg cgcaatcatc	18780
gagggccccg caccgttcac cgcggtgaac attcggaag gcatggcgcg ctgggcactc	18840
actaccctcg acccgagct tgcagaagca gcgctgctat tgcggcgctg caccatgatc	18900
tcaatcgga agacccatca tctggatgag cagattcacg cctccagcac tgatcgctgc	18960
tacagccagc agtcggtccg cgcgccgag gcgtggcgta tgaagggatc gacctgggat	19020
atcgccagca atgaagcgt gtgtgccact gaccaggctt ggctgaaaga gcgcagccac	19080
gcatccccgt aactctctta accaatacct tgctggaaaa cgcgcaaaaa aacgcccgt	19140
gaccaaggtc agcgggcca aaagtgcgaca caatgaacgt tttcagcaac ctggacgttt	19200
agaggaacac cgccagggtc ggggtgccc ataccgcctg atcgaggatg acctcgctc	19260
gggcaagttt gaaactgtca ccctctgcgc gcagcagatc acggcgttcg cactgatga	19320
tgtcgacgtg gtgatccttg aagcggctgc gggtcagcag caggtaactg gtgacaatga	19380
actcatcggc cttggcggtt ttctcgacga acacattggt caccagccgc cgagtccgtg	19440
acggcggtatc ttcagcccag gcgctcttgc ccgagagcc caagatacgg cccatgatcg	19500
agcggtagtc atcgtggtaa tgctgaacgc tgcgcacgat ggtggtggac agctctgcgg	19560
cggtcgaggt gtggcgacg ggcacggtat agatgaggtc ggtcgccagg cgagaagccc	19620
attctctcag gcggatctga tccagcagcg tggcctcttc ataaagggaag gtgacgacct	19680

gattgtagac cggcgagccg accggcacac gctctatacc cagcggtgaa ccgggctgca	19740
cgtgctcggg gccgcgctgc tggacgtcga ccgacggtcg ctgcgccaat tgagtgtcag	19800
acatggatgt atccccgaat cttattgttg ttgagtaccg gtgcgcttac tgcggttcat	19860
ccactggcgc ggtcatcaat tcatgccagt acagccacca atgccactgg gtgtcgtcct	19920
tggatgaagcc ctctgtgaca atgcccggcc caggccagcc ttgaggcgca ccggtttcga	19980
acacggcctg gtacttgagt gtactcttgc gacccatcgc acccttggcg gcgagtgtca	20040
tgtgcggcca ggtgtcggag tcgtcctgct cgaccatgcc ggaagtaccg aacaactgaa	20100
tggctcgcct gagcattttt tcccgcaatt cgggcggcgc gtctttttcg gcaaagatcc	20160
agttcacgaa ctccagcttg tccgggtcct gcggcacata agcgtgcagg gtcatggagc	20220
cgaccacggg accgtctggc tgcgggatat aaacaaagcc aaagaggatg ttgggaaaca	20280
tcccccgac ttgcggaggc atgctggtca ggaccttgag ctggtcctca ctgagattgc	20340
gcgccagctg ttcgaccatt tcggcgggtca tccccgccgg cggcagcgcc tgaagcttct	20400
gctcgaccgt gagcgattcc ggatccagcc cggtcaggcg tttgatcttg cgtgccaggt	20460
cgatgcaacg cagtgcgtgg ccatgaggcg aactgatctc gacaccgtac atttcaggac	20520
tcaggtcggc gctctggccg ttctcgtcct tcttggcata gttaccacc tcgcccagcc	20580
agcgggtcag cgtcagggtg ttggaagccat cggcggcaga ttgctcgccg gcgggtcttcc	20640
agttggcgtt gacgatgaaa cgctgcggcg ggccaagcac ctccatgcct ttgtcggagc	20700
gcaggaacag catgtcgtaa taccacttggt catcgccgag gaattcgtcg aaagacggtc	20760
cgtcgacgtt ccagggtgga aacaccagcc cgccgtacag cgtgaccctg gcttttttca	20820
ggcccaactg ctcttgggc agcatcttgc cgtgcatgca ctgcgatcg actggcgagc	20880
cgatgaagtc accgttggga cggaacgccc agccgtgata gatgcacttg tgaatctgcg	20940
tgttgccgca atcggcagtg ctgatgcgca tgccgcgggt agggcagacg ttgagggtta	21000
catgaacctc gccttccttg tcgcgggcga taatgaccga gtcggagccc aggtcacgga	21060
ccatgaaatc gccggaattc ggaatctcgg attcatgccc cagcaggacc cagatcttgc	21120
cgaagatctt ttccatctcg atttcgtaga tttcacggtc cgacagcacg cgcatctgca	21180
cttcgcgtgt ggagggataa atcagggtcg cgaccttggg tccatcagac agtacggggc	21240
ttgttcttgt tagcatattg gcctccagtt cagggtgtca cggctactat gagccggttg	21300
aatataagac agaataaaaa agaattgtata ggaagtcgtt tgtcttgccg gcaaatggtt	21360
cagcgtccgg cagcatgctt actgcccgtt tcccacctga gtgcgcaata caccgatgcc	21420
ctcgacttcc agctctacca gatcgccggg tttcaggtaa cgcaactgct ccaggccgca	21480
gccgttacct accgtccctg agccgagaaa ctgcccggga tacagggttt cagagcgaga	21540
cacgtgggca atgacatctt cgaagcgcca acgcatgtcc tgggtgttgc cccggcccca	21600
ctcttcgccc ttgaccttg cgacctgtt caggatag ggatcgccca gtcgtctg	21660
agttaccagg cacggcccca tgatgttggc cgtgtcgaag tccttgcttt tggccggggc	21720

gagcatgccg ggcattctcg cagcctgggc gtcgcgggcg ctcatgtcgt tgaagatggt	21780
gaaccaacg atgtgctcgc gggcagcgtc tttggagatg tccttgcctt tcctgccgat	21840
gtagcagccg aactccagct cgaaatccag cgccttgctg aaggaaggcc agagaaattc	21900
gtcgtcggcg ccgatcactg cgaatcggtt gcactttag tagatgggct ggcggttgaa	21960
ggctctgatg acccggtcgt cggcgcgagt gttcattgcc ttcaaggctg cttccggatc	22020
gtcggtgccg agtccccg cagctcgtgc tgcagcgaac gcctgacgca ggtgcaactc	22080
gaaacacgaa cagtcgcgca tctgtggcgg cggttgaatc ggcgcacgga gcctgacctc	22140
gttgccgga atgacactgt cggcgggcga tctgccaagc agcgtgcgcg ccagccccag	22200
ggcttgctcg ccaccttcca ccagtttcaa cacgtgctc agcgcggcgc tttcaccacc	22260
ctggacatgg cggtagctg cctgcaggtc gaggaccagt tgatcgttat cgaacaaggc	22320
gccggcgcgc tcgacgccat cggcgtgggt aaaggttaacc aatctcatac gcgaccactc	22380
accggcagac aggcgcgggt taccgcgcag gcctcatcgg acagcagaaa ggcgatgacc	22440
gaagcaagct gcgtggggct taccagcgg ctgaaatcgg cgtcaggcat gtcgtgcgg	22500
ttggtcgggtg tgcgatgat gtcggcaag accgcgttga ccgtgatgtt gcggctcctg	22560
acctcctcgg ccagcgttc ggtcaagcgt gcaacgccag cettggaagc ggcgtatgcg	22620
cccataccct gccctgcctt gaggtctgcc tgggactga cattgacgat gcgtccgcgc	22680
tgcgcggcgg acagatgcgc aaggactgcc tgcgaagcca ccacggcggg gcgcagggttc	22740
atctgataga gacgggtcca ggtcgcaagg ctgccggctt cgagggtttc ccaagcaaag	22800
ccaccagcga cattgaccag accatcgata cgcgagaaat gtcgggcaac ctgtgcgaag	22860
gccgcgtg cgcactcgac cgaggtcagg tcgacgccac ccagtacag cacatccccg	22920
ctgtcgtcga cggttgcctg agtcgactcg gcccggtcca gcagcgcaac cttggcgcgg	22980
cgggaacgca ggtgctgacc aagtgcggcg ccaaggacac cgaagccgcc ggtaacgacg	23040
atcacttttg cgtgtaacgg cgcgtcttca cgcactgcgg cctgaccaga actggacatc	23100
gctgattcct cttattgttg ttggcgctgc cctctgcggg gaagcgaggc gtggcgataa	23160
tataagacac ttttttaaaa tatgtacaga tgatactgtg ccctcgttga ctggaatcaa	23220
taaaaacat ccgatctcg acgctaagc ccagaaaact gcctgccctg accgccgaca	23280
accgtgcctt ctggcagggt ggtgagcacg gtcagttgct cattcatcat tgcgacgcct	23340
gcgcgcgttt ctttcacccg ccctcgccca tctgcccgtg ctgcgccagt ttcgacgtca	23400
ggcctaaagc cgtatccggc aaaggcttgg tgaccagctt cacggtgaat tatcagcaat	23460
ggacaccg cctcgacatc cttttcgtcg tggcgatcat cgagctaccg gaacagaccg	23520
gcctgcgctt tctcagcaat gtcattggct gcgaccggtt gtcggtcagc atcggcatgc	23580
gtgtgcaagt ggcattcgaa aacatcgagg atgtctggct tcccctgttc gagaaggatc	23640
aatgatgttt gatcatcgt atgagagaaa cgtcgccatt accgggtag gtcaatccga	23700
ggtgggccgc ctttcagca aatcgccat gcgcctgacg ctggacgcat gccttgaagc	23760

tatcgccgac	gcggggttga	cccgcgaaga	catcgacggc	gtggcgtgct	ggccggggga	23820
caacaacaat	ggcgacccgt	tttctccggt	tggcccgaagc	gctttgaaaa	gcgtcctcgg	23880
gctgaacgtc	aactgggttcg	gcgccggcta	cgaaggcccc	ggaccactgg	ccggggtgat	23940
caacggtgcg	atggccattg	cggcgggcct	gtgcaggcat	gtgctggtgt	tccgcaccat	24000
caccgaggcc	tcggccaggg	tgcacaacaa	acaggccggg	gccttgagtg	ccaagacgca	24060
gggccgcgac	acaagccatg	cctggcagtg	gttcacgccc	ttcaatgtgc	actcgggtat	24120
caacctgatg	gcgttgtagc	ctaagcgcca	tttccatgag	tacggcaccc	gccccgaaca	24180
gctggcgag	atgccatga	cctgtcgcgc	caatgcgcag	cgcaatccca	aggccatcta	24240
tcgctcgccc	atgaccctgg	acgactacat	ggcctcaagg	atgatttcct	caccgctgcg	24300
catgttcgat	tgtgatgtgc	actgtgacgc	atccaccgcc	attgtgctgt	ctcgccgcga	24360
tgtcgccaaa	gacacgcggc	agcaaccgat	tcgcatcgaa	gcgatggggg	cgccctgga	24420
ccagccctgg	tcgtgggacc	agatttcact	gacgcagatg	gccgcgttcg	atgtcgcccc	24480
aatgatgtgg	gcgcgcaccg	actacacgcc	gtccgatgtc	ggctcggcac	agctgtatga	24540
cggcttttcg	attctgacca	tgatctggat	ggaggcgctc	ggcctgtgcc	cggagggcgc	24600
aagcggcgca	ttcgttgaag	gcggccagcg	cattgcgctg	accgggcagc	taccgctcaa	24660
taccaatggc	gggcaattgt	ccggcggtcg	cacgcacggt	ttaggctacg	tgcataaagc	24720
ctgcctgcag	ttatggggcc	gcgctgaagg	tcgtcagacc	cgaccgcacg	cggctctctgc	24780
tgtcgcgccc	ggaggcggtc	cgctgggcgg	cagcctgttg	ctcgtcaaag	actgacgccc	24840
gtttcgtctc	gggcccggca	gcgtacttaa	aacaacacct	tgctcagctc	ggcgcagaac	24900
gctaccagcg	cagcgccgac	ttcctcgatc	ccttcctcat	cgcgctggcc	tctgaacaac	24960
acggcggaca	cggtgaaatc	gatgttgccg	gacagcgagt	aaaccggcgc	agcgattgcc	25020
agaatgcccc	ccgagaaata	accgtcatcc	accgcccac	cgcgttcgac	agccagcgcc	25080
acttcatccc	gatagacctc	gaacggcaac	ggccgagccc	agcgaatggt	ctcgaaatcc	25140
tccctgacct	gagcgtcctg	catgtccagt	tgagtggcga	acagccgccc	gctggcacc	25200
atcaatatgg	gcagacgctg	cccttcagcc	atgtcgatgc	gcacgtcggg	gggactggcc	25260
gcagaactga	cgatcacgat	gcggtctgca	cccattgcgc	gccacaaggt	cacggtgacc	25320
cgcaagcgcg	cggccagatc	ctgcaacagc	ggcttgggca	aggccacgcg	ctggccctgg	25380
gtcaccatt	gctcgaccag	cctggccagg	ccaagacctg	ccgaatagcg	cttggaacgc	25440
gggttgaaat	cgacgacatc	ctccatgacc	agcgtgcgca	ggatattgaa	acaggtgctg	25500
gggttgatcc	ccagaatgcg	cgccaggtcc	acggaacgct	cgggggttcc	ggcctgactg	25560
aggtggcgaa	ggatgcggat	ggcgtttgaa	accggtttga	cactgaccgc	gcccttctgg	25620
ttatcaggcg	tatcaggaga	ctgtgaacct	gtgtgtgctg	tcttggtgcg	aggcatcgga	25680
aataccggtt	gggcgagcga	tgcggcattc	taacctgaga	acggcaacct	gtttaaagtt	25740
taataccgaa	accgaaggtt	tgttttatgt	cgattcagcg	cggctgcagt	atgtagcgtc	25800

gctggggccg cgctccgcaa cgaaagtggg tcaggctggc ttccagcgca tgggccgctt	25860
gcgtgatgcg cgactcctga cgcaaataat ccagccagga ctcgacgatg aaacgctcga	25920
cgaagtgatc gttttcgtcc agatcgtgat agagccgcca gttcttcgcc ccgtttcgac	25980
gccgggactg gccgaccgcg taggccatct cgatgaaatg tgcccgatca gccggggcga	26040
cccgatacgc cagttcaatg gaaacggggc cggtccggg ggtcgactct tccggcagca	26100
acagccggtc agtcggctgg atcgccatgg cgtagtcggc ctcttgcccc agcgccagct	26160
tgccgttgcg ggtcaacagc agcccagca ccaacgtcat tgccgccagc aacaagctgt	26220
gctgcaagcc aaggtactgc gccagagcgc ccagatggc gccgccaatg gccattgcac	26280
ccataagcat cagcaggtag atcgaagcga cccgcgccc taccagttc gccgcacagg	26340
tctgcaccac tgtcgaaatg gttgcattga ctgccatcca ggacattccc gcgatcatca	26400
acatggcgca caccgccacc cggctttggg aaagtgcgcg ggtcagggtc gccagggcga	26460
aaccagcgt gcctgcatg atcagcacc gaagggtgaa gcgccgatag agtttagtaa	26520
ggttgaatgc gccgatcacc gcgcctgcgc ccagaaacc catcagcagg ccgtaccgc	26580
cagcgtccat gccagttca tgcctggcca ccaaggcat gagtgcacc agcgcgctgg	26640
caccagggg aaagacgaag acttccttca aggcgctgac cagcaccgcg gaatggcgga	26700
tatagcgac gccgctgcgc aggcggcgag cgaagtctc cgagggcagc ccattgcgcta	26760
tgtgcgtg cgtagaatc gcaaccagca cgatgaccag gccagggctg atggtgatga	26820
tcataaacac cgaggcgga ttccagtagg cgatcagccc accggcaatg gcaggcccca	26880
gggcccgcgc ggcgttggtg gaaataaccgt tgagggaac ggctgccgc acctgatgc	26940
gggacagcac cgacacgatg gttaccatcc aggcgcgat gctcagtgca ctgccggtgc	27000
ccaataaaaa ggtgaataac agcagcgacc aatcggtcag caggttgga taagacaac	27060
cgctcagga cagggcgcg atcagcataa tgccctgagt cagcatcagc cacttgccg	27120
ggtcaaccag gtcagcaatg accccaccg gcaaaccgaa caggaaggcg ggtaacgaga	27180
tcgccgtttg caccagcgag accatcaacg gcgaggtcga cagcagcgtc atgatccagg	27240
ccgcaccac cgtctgcatc cagatggcca gattgaccat cgcaccggca caccacagcc	27300
agcgaaagct gcggttgccc agcggcgacc aggcagaggt cggctgagca ttgacagccg	27360
ctgcctgac gtggggcttg tcggaaacct cgctcatggg agcacgggcc agcccagcct	27420
gccgccagat cgggcagtcg gcagaatgcg cggctggctg acgcggttgc tcagtcgacc	27480
gatgccttca atacacgcct ggacctgatc gcccgggttc agaaagcgcc cgtcttcag	27540
gcctacgcca tgggtggacc cgtgaacag caggtcacc ggctgaagga taattctggc	27600
gtcgatgaag tcgagcaact cgtcaaccg aaagagcatc tgccgggtgt tgtcgaaactg	27660
gcgccgctc tcgttgacct tcagctcgat gtccagctgc ggttgctccg tagcgaattc	27720
atcgccggtg acaatccag ggcccaccg cgtggtgcg tccatggcct tctgggtcag	27780
cagatccaga cgggcaatac gcttgccggc atcccgtgc ctgatgtcat tgccacaggt	27840

gtagccgagc aggcaggcac tggcgtgggg ctcctcgccc aacgctctgg cgacgacggc	27900
gaccagctcg acttcatagt ccagctgcgc ggtagcgcg ggatactgga tgtcatcggt	27960
ggcaccacc agcgccgagg caggcttgat gtaaccagc gggtagctcg gcgcaacgct	28020
gcccaggcgc tgcagatgac tgaggtagtt gagccctacg ccgaagaccc gcgcgccggg	28080
ttcaaggggc ggaggatgc ggcattgctc caggataatg ccaactttgt ccaggctcag	28140
tgcgtcaacg ccctgggtcg ccaaagctgg cgcccacagc gcgaacggcg cacgaatgcg	28200
ctgcaggcag gtcgtctcca ggtcgagcaa accccagaag ctttcgttgc ggtactcgac	28260
ccggatcagc cgcatctcag cgcttgctcg ccagggtattc cgggtccagc acctcttcag	28320
gcgtcttgac gctcgggccc agaatcggcc cgaccatctc atgccccac aggtctcaggc	28380
actcgggatt gaggtcgaac ggatcgccct gccacggctc gatctcggca atgggttcga	28440
tggcgaagcc ggacggcgtg aagtgataga acgacagggt cgggtcctgt gtgtgctggc	28500
ccagggtcat catcatcggc agttgacgtt ttttcacgat gtcgtaggtt tcgccaacgt	28560
cgcaatgct cttcacgaac aggccaacgt gctgcacgcc catgcgcccg gcaccgtgac	28620
cgtaggcaat gtcatggctg gtgtgggtgat tgagcttgga gcggaaaaag ccggtacgcc	28680
ccttcccggc gccggcacca taccagtggg agcccatgat ccgggtcagg aagtcttcca	28740
gttcatcggt gtattcaggg gtgatgacca ccacgtggcc ggctccgct tcgtcggcat	28800
gaaaccacc gtgagggcgc ccgggcagga atgaacggcg ggtccatttc tggccgtaaa	28860
acaactcgtg ctgatagccc accgggtcgc ggaaacgaat cagttcgcgc acgccgcgtt	28920
gctcgagag cgccgcatca ccgcggttaa cctccacgtt gttggcttca aaggctctga	28980
tcgcggtcgc gaatgcctgc cggcccaggc cctcccagcc gatatagacc aagcgggtcaa	29040
cctggccggg gtgaaaggcg aagcgatggc ggcggtcgtc tatcttgaaa tacagcgact	29100
ggctgtcgtt ggccggtgac ggcgcaatgc caaagcccat gacctgcggg ccgtattcgc	29160
gccaggcgtc gaggctaggg gtttcgaaac ccaggtaacc gataccgatg atgtccatgt	29220
gagtgacact attgttcttg ttggatgggc gttgctcaga ctgctagcag gccgccgtcg	29280
ataacgatgt cggaaccggt gatgaaggag gcctcggcgg aggcgacgaa taacgccatg	29340
gccacgacct cctccggctc tcccgggtcg tccatcagca cgccgtcgag cagcgtcgcg	29400
cgcaccttgg gattttccat gaacgctgca gtgcctggcg ttgcatgaa accggggctg	29460
atgctgactg cgcgaatgcc caccggcgcg ccttcacagg ccagttgccg ggtaaaggca	29520
atgactgcgc ccttggcggc ggcgtgggcg ctgatgcctg cgactttgga gcctcccag	29580
ccagccgtag aggagatatt gatgatcacc ccgcgtgtt cggccagggtg atcccaggcg	29640
tacttggtgg tatagaacag cagatcgatt tcattgcgca tggatgaactg ccagtcctcg	29700
atggacagcg tattcaccgg cccgaatttt gccgccgagg cgttggttga cagcacgtcg	29760
atacggccat gctgggcccac ggcggcgtct atccaggcct tggcctgggc gggatcgccc	29820
agatcgacgg gagcggatcc cgacaactgc aagccttcac tggtcagcaa agcggctgtt	29880

tcttcgtggg	cgctggcggt	agtgtcgag	cccacgacga	tggcgccctc	acgggcaaat	29940
cgagtgccg	cgacacgccc	ctgcccgcc	ccggtgccg	tgatcagcac	cactttgttc	30000
tgaaacgac	ctgtcatcct	gtgattctcc	cgaaatgtgc	gcacacgttt	atgaaattgc	30060
cgtcgccagt	ggcgacgtca	ggcaagggtt	caggcagcgt	tttcgggggt	atccaggggc	30120
tccagccaga	tcgttcggc	aggacaggcg	gcggcgccct	cgcgcgctc	ctcttcaagc	30180
tcgggtggca	cccgatcatc	gtccagatag	accagaccat	cgatcatcaag	cttgtaaagg	30240
ctggggcaca	cggttcgca	caggccatag	ccgcaacaac	gtgaacggtc	ggcgaccact	30300
ttgaattgcg	gtttttctga	actcatttct	tgtctccctt	gtaggttcag	ttcggccaat	30360
aatgaacact	ttacattcat	gtgtaaata	ttcatcgag	gcgttcggtc	cttaccctaa	30420
aggcacctgc	aaagcaagag	cttgccgata	tacaccgggt	tttcgtggt	gcaccctgtt	30480
tctgcggatg	ccttcctga	tgactttatc	cgccatattt	atgaacatat	attcgattta	30540
tgtctattat	ttcgttgata	gcactgccc	ggcggtgga	catgcccctt	cgaactgcc	30600
tattctcgac	tgctgacctg	attcttgtct	gagaacgctt	acagacgttc	catgagatga	30660
caccgctaca	cggtttggt	caacaaaacc	tataaggaag	ccaattaatg	accccttcga	30720
aaaacgaagc	ggcgatcgat	ttcaccgaat	ttcgaagcgc	ctggaaaatc	cttatcctgt	30780
cccttgccg	tgtagccgtc	agcatcaacg	ctgcgttgc	gtatggcttc	ggcacactgg	30840
tggtgccgtt	gaatcaggca	tttggtgga	ccaaaccgga	attgcaggcg	tgcatcacct	30900
ttctgttcgg	cgcgcgagt	atttcctgc	aactggtcg	ctggttcaac	ctgcgctatg	30960
gcataacg	cgtagccgtg	gtctcgctgc	tggtgctggt	gctcggttat	ctggcgacca	31020
cccagttaac	cccgtcgatc	tggtcgatgt	acctggcggt	cggttggtg	cccatcgctg	31080
gtatgggac	cctggcagt	acctggacgc	agttgttaag	cctttggtac	gagcgcaatc	31140
gtggccttgc	gctggccatc	ggcctgtcgg	gcaccgggct	gactgcggcg	atcatccccc	31200
gcctgatgac	ctggggcatc	gaacagtggg	actggcgcg	ggcgttcatc	attctcgcca	31260
tcctcaatct	ggtggtactg	ctgccgctga	ccctgctgtg	gttccggctg	cccgaagtgc	31320
ccggcaacag	caacactgcg	accgcagcg	accacaccgg	ggatgacctg	ctgctcgccc	31380
tgcccgcat	gagttttcgc	cagggcagtc	gctcgggcaa	attctggatc	tgcaacctgg	31440
cgctgtctct	ggtggtgtcg	tcggtggtcg	gcattggtcac	cagcaccatc	ccgttgctgc	31500
agtccaaagg	cctcagcgcg	gccgatgccg	ggttgatctt	cagtgggttc	ggcatctcgc	31560
tgatcggttg	ccggatgctg	atcggttacc	tgctcgaccg	cctctggcca	cccgcctgg	31620
ccgccgccag	cctgatgatg	cccgcggtgg	gctgcatgat	ttacttgggt	ggtaccagcg	31680
atttcagat	gctgctgatg	gccgcgatgc	tggtgggctt	cgccgggggt	gccgagttcg	31740
acatcgcggc	gttcctgggtg	gcgcgctatt	tcggtctgcg	tgaatacggc	cgactgtttg	31800
gcgtgcatca	gggccttaat	accgtggcgt	cggccctggc	cccattgctc	ttcgccctca	31860
tgctcagtcg	cagcggcgat	tattcggcga	tgctggtgta	ttgcatggtc	tgctgcctga	31920

tcggccctct gtcctgctc atgctgggtc gcgcaccgcg cttccacggc gcggccatgg	31980
cggcccccac ctgacggcct gccgcgtcct acccgcgctg atgccttgcc cacaacaaaa	32040
acaagaggaa actcctatgc cagttctgac cctgatcgag ttcaacggca ccgaacaccg	32100
cgtcaaagca gatgtcggcc aatcgggtgat gcaggctgcc aatttcgcca gcgttcccgg	32160
ccttcaggct gattgcggtg gcgcctgcag ttgcccacc tgccatgcat tcgtcgacga	32220
tgcttggtg gcacgcgtgc cagccgccga ggacgccgaa tcggacatgc tcgaatacgc	32280
ctgtggcgcg agcgacaaca gccgcctgac ctgccagttg atcgtcagcg acgcgctgga	32340
cggctcgggtc ctgcgtttgc cggaaatcca gtactgagcc tgggtgctcat ggactcagtc	32400
gaaggagtgt tcatgtcact gtcttcaatc gtgatcgctg gcgcagggtca ggcgggttat	32460
caggctcgccg cgtcgtcgcg ccaggaaggc cataccgggc gtatcgctgt gatcggcgac	32520
gagcccggtc tgccctacca gcgcccgcg ttgtccaagg cctacctgct cggaagatc	32580
gccgaaaccg ctttgctgtt ccgcccggct gattttttcg ctactcagaa catcgagtgt	32640
ttgatgacc aggcgaccgc catcgacagg ctcaaccgac ggggtgctgtt ggcctccggc	32700
gacgtcgtga actacgacca tctggtgctg gccaccggcg cgcataaccg tccgctggcg	32760
gtgcccggcg cgcaactgga aggcgtgttc ggcatacaga ccaagctgca cgccgatacc	32820
ctcgcgcctc tgggtgcatca ggcgcgcaac gtcgtgggtg tcggtgccgg gtccattggc	32880
ctggagttagc ccggggtagc gcgcgcctc ggggccaatg tgcatgtgct tgaactgggc	32940
gatcgtccga tggcgcgtgc ggtgtcccgg gaaatgtccg aggtatttcg caaggcccat	33000
gaaggctggg gcgtgcattt cgatttccgc caggggctgg ccgccatcga aggcgataac	33060
ggcaggggtc gcgcgtgac caccagcgat ggtcggcggc tgccggcgga ttggtcgtg	33120
ttcggcatcg gcgtgatcg caacgtgcaa atcgctaccg aggcggggct ggacatcga	33180
aacggtatca aggtggacgc ccacctgctg accagtgacc cgagatttc cgccctgggc	33240
gacgtggcct gcttcccgtg cctgcataac gaccagcagc cgattaggct ggagtcggtg	33300
cagaatgcca tcgatcaggc gcgctgcac gccgcgcggc tcatgggcaa accggctgcg	33360
tatgaggccc tgccgtggtt ctggaccgat cagggcccgc tcaagttaca aatcgccggg	33420
ctgtcgaccg gctatgacag cagcgttatc gttggctcgc cagataacct gcagctgtcg	33480
gtactgtgtt tccgcgagga tcaactgac gccgtggagt cctgcaatcg gccgggcgac	33540
cacatggcgg cgcgcaagat cctggctcgt gcaccccaac tgacggcagc gcaagcggca	33600
gaaccgggtt tcgagctcaa ggcattggga gcggccaacc gacctgaat aaagtctgga	33660
tgataaccgg ggcttcaagg ggattaggcg gcacatcgc tcaggcgcg ttgtcggcg	33720
gtgatcgggt tgtggtcacc gcgcgcaacc tgcgtgccct ggacgcgctg ttaccgacg	33780
acgcagaccg ggtgctcaaa caagcgtgg acgttacga tcaggcccag gccagtgcgg	33840
tgggtggacg gccctgacc cgtttcgggg cgattgacgt gctggtcaac aacgctggct	33900
acggccaact cggcccctc gaaaccaaca cgcaggccga tgtcgaacga cagtttcaga	33960

ccaacgtctt	tgcggtgttc	aacctgtgcc	gggcggtgct	cccgtcatg	cgacccagc	34020
gccggggcca	tgtgttcaac	ctgtcctcgg	tgggtggact	gatcggcatg	ggcggcgctt	34080
cgttatacag	cgctcgaag	ttcgcggttg	aaggtttcag	tgaagcgctg	gctcaggaag	34140
tcgccagtta	tggtatccac	gtcacgctgg	tggagcccgg	ggttttccgc	actgattttc	34200
tcgaccgcag	ctcgtggcg	ttcggcaatg	tgcaggttgc	cgactatgca	gcgctggtag	34260
acaaactgca	ggcctcctgc	gctgcgggga	atcaccagca	agcgggagac	ccggcgaaac	34320
tggggcacgc	cctggtgtcg	ctggccaact	gcgatacacc	cccgttgcg	tttctggg	34380
gcagcgagc	ctacactcag	gtcagcgcca	agctggcacg	catgagcagc	gaaatcgaac	34440
gctgggaggc	gctgtcctgc	tcaaccgacg	gtgcttgggc	cgccggcagc	gagaactgag	34500
tccggtcaaa	gcgatcaacg	ctggcgcatc	atcgcggtcg	ccagcgcccc	ccccccgcca	34560
atgccagaag	ggccaggtaa	agccaatagg	tggcggcgcc	gaagggtgaac	atggccacac	34620
tggcgacgcc	aaagtgtgag	cgtcgcaaca	gtcgcagggt	ggttaaggca	cgcgagccct	34680
acaccactg	gccgtgcctg	taatccaccc	ccagagcttc	cttgaactgt	gcatccctcg	34740
agcaaccacc	acgtagtgcc	cagcagtcta	acgacgcaa	agtggcagca	ctggtccaaa	34800
agccaccctg	aaaacggacg	tttagccgta	aaccctgaa	agcatcgcg	aaccttcaac	34860
ccgctttcga	cactgccccg	gaccggctcg	aacggcctca	tcggtcgtgc	cccacaggcc	34920
gctcggcaca	cagtcgctca	accggcaatg	aaataccgca	ctgataacaa	gccgtcctcg	34980
aaacggtaga	cctcgatggt	ttcgataccg	ccctcggcac	cgatgaatgc	attgcggtga	35040
tgacacgcgg	cttctgcgcc	gttgattacg	gtcagcttca	cttcgatgcg	gacccgcgat	35100
tgctgttgcg	cccacatccc	ctccagcaca	tgccaggcgt	cccgttcggg	ctgaccgacg	35160
tattcgatgc	tcaagccctt	gctggcgacc	cggcggtaat	ggccaaagaa	gccttccttg	35220
tcgccggcgt	tccagcacgc	cacctgccca	tgcaggaaat	gctcgatgct	tggttgatcg	35280
ggaacactca	tgattaacct	cgataaatac	tcagaccgaa	accttgcgat	acagcgggtgc	35340
ggacccgagg	gtcagcatca	ccagcgggtg	aacgacggca	cagcccaggc	aataaaacag	35400
caccgggttg	tagttgccaa	acagggtaaa	cagggtcccc	aacagcgccg	gtgccagacc	35460
ggaaatgact	gtgaccagcc	ccagggtcag	gccgaaaatc	cgcgcgtagt	cccgtagccc	35520
gaaatagcgg	gcgatgagaa	aggctgcgat	gtcgaactcc	gccccggcac	tgaacccgat	35580
gcacaccgtc	gccagcacca	acacccagct	agcctgcgcc	ccggtgaaca	tgaacagcag	35640
acagcccagt	gccggaacac	aaaggctggc	cgccgcaatc	agatgcgctg	ggaaacgatc	35700
cagcaggtag	cccaccagca	agcgcccgcg	gatgatcgaa	atgccaaagc	tgctgaagat	35760
ctgactggcg	gtcaggctcg	gcacgcccct	gtcctgcaga	tacggcacga	tggtgggttac	35820
catgccgacg	atcagcgata	ccgacaggat	cagcgccagg	ttgcagcccc	agaacacccg	35880
tgtgcgcacc	gcagtggcga	accgcacacc	ttcgaccacc	ggctcagtcg	tggaggactc	35940
tgcggcggtc	aaccgttgtg	ccggaaactt	cagccaggcc	acggccatgg	gcaagggtcag	36000

```

caatagcggc atggccgcca gcagcaggaa agcccagcgc cagcctccat gctggatgga 36060
ccaggccagc agcggcgcca tgaccatcgc ggccaggccc gagccgctga ggatgatcgc 36120
caaggccaca ccccggttac gctcaaacca caagctcacc agttgcgtcc aggtgatggc 36180
gatagtgccg acggccagca gcggcatgag gaagaacgcc aggtacagcc agtagatact 36240
gccgcgaagc agggtcagcg acgcataaca cagcacctgc aatacaaggc tgaccagggc 36300
caccggcgcc aagccgtaac gggcatacag cccgccaac agttgcgagc ctatggcaac 36360
gccggcgaac agaaaggtga tcgaggtctg cagttcgcca cggttccagc cgaaagcgtc 36420
ctgcaagggg atcaccagag tgccgaagcc atacagcaat gccgcgctgg tgctggtcaa 36480
tacgcccgcc agggccagta cgacgatgcg ccagccccga tgaaactcgc ccctggccat 36540
ttggcccgcc aatgaatcct gtaaacggtt catgttcgtg ctccggcgtc agacttcaac 36600
cgcttgccga cgcctagaaa 36620

```

```

<210> 2
<211> 800
<212> DNA
<213> Pseudomonas

```

```

<220>
<221> source
<222> 1..800
<223> /mol_type="unassigned DNA"
      /organism="Pseudomonas"

```

```

<400> 2
attgaacgct ggcggcaggc ctaacacatg caagtcgagc ggatgaaggg agcttgcttc 60
ctgattcagc ggcggacggg tgagtaatgc ctaggaaatct gcctggtagt gggggacaac 120
gtctcgaaag ggacgctaata accgcatacg tcctacggga gaaagtgggg gatcttcgga 180
cctcacccaa caaagaacc caaggccgaa taaccaagtg ggggaaggaaa ggcaccaaca 240
agccaacaac ccgaaacggg ccgaaaagaa gaacaagcaa aacggaaacg aaaaaacggc 300
caaaacccca acggaagcaa caagggggaa tattggacaa tgggcgaaa cctgatccag 360
ccatgccgcg tgtgtgaaga aggtcttcgg attgtaaagc actttaagtt gggaggaagg 420
gcagtaaatt aatactttgc tgttttgacg ttaccgacag aataagcacc ggctaactct 480
gtgccagcag ccgcggtaat acagaggggtg caagcggtta tcggaattac tgggcgtaaa 540
gcgcgcgtag gtggtttgtt aagttggatg tgaaatcccc gggctcaacc tgggaactgc 600
atccaaaact ggcaagctag agtagggcag agggtggttg aatttcctgt gtagcgtgta 660
aatgcgtaga tataggaagg aacaccagtg gcgaaggcga ccacctgggc tcatactgac 720
actgaggtgc gaaagcgtgg ggagcaaca ggattagata ccctggtagt ccacgccgta 780
aacgatgtca actagccgtt 800

```



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201300612

②② Fecha de presentación de la solicitud: 21.06.2013

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N1/20** (2006.01)
C12R1/38 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MOLINA GUSTAVO et al. <i>Pseudomonas</i> : a promising biocatalyst for the bioconversion of terpenes. <i>Applied Microbiology and Biotechnology</i> . 29.01.2013 VOL: 97 No: 5 Págs: 1851-1864 ISSN 0175-7598(print) ISSN 1432-0614(electronic) Doi: doi:10.1007/s00253-013-4701-8.	1-19
A	AGUILAR J A et al. The <i>atu</i> and <i>liu</i> clusters are involved in the catabolic pathways for acyclic monoterpenes and leucine in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . <i>Applied and Environmental Microbiology</i> MARZO 2006 VOL: 72 No: 3 Págs: 2070-2079 ISSN 0099-2240.	1-19
A	FOERSTER-FROMME KARIN et al. Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine/isovalerate in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . <i>Applied and Environmental Microbiology</i> JULIO 2006 VOL: 72 No: 7 Págs: 4819-4828 ISSN 0099-2240.	1-19
A	US 5128253 A (LABUDA IVICA M et al.) 07.07.1992	1-19
A	US 4495284 A (RHODES PETER M et al.) 22.01.1985	1-19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
18.09.2013

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

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

C12N, C12R

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.09.2013

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-19
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 1-19
Reivindicaciones

SI
NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MOLINA GUSTAVO et al. <i>Pseudomonas</i> : a promising biocatalyst for the bioconversion of terpenes. <i>Applied Microbiology and Biotechnology</i> . VOL: 97 No: 5 Págs: 1851-1864 ISSN 0175-7598(print) ISSN 1432-0614(electronic) Doi: doi:10.1007/s00253-013-4701-8.	29.01.2013
D02	AGUILAR J A et al. The <i>atu</i> and <i>liu</i> clusters are involved in the catabolic pathways for acyclic monoterpenes and leucine in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . <i>Applied and Environmental Microbiology</i> VOL: 72 No: 3 Págs: 2070-2079 ISSN 0099-2240.	03.2006
D03	FOERSTER-FROMME KARIN et al. Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine/isovalerate in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . <i>Applied and Environmental Microbiology</i> VOL: 72 No: 7 Págs: 4819-4828 ISSN 0099-2240.	07.2006
D04	US 5128253 A (LABUDA IVICA M et al.)	07.07.1992
D05	US 4495284 A (RHODES PETER M et al.)	22.01.1985

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

En las reivindicaciones 1-3, de la solicitud de patente, se reivindica una cepa aislada de *Pseudomonas sp.* y mutantes de la misma que incluyen al menos su capacidad para degradar terpenos cíclicos y acíclicos y/o derivados terpénicos cíclicos y acíclicos. En las reivindicaciones 4-6 se reivindica una composición que comprende la cepa objeto de la invención. Las reivindicaciones 7-19 reivindican el uso de la cepa objeto de la invención.

Existen numerosos documentos que reflejan como *Pseudomonas sp.* es capaz de degradar una amplia gama de terpenos, como por ejemplo se muestra en los documentos D01, D02, D03, D04 y D05. Se pueden encontrar en el estado de la técnica diferentes *Pseudomonas sp.* que presentan diversas rutas catabólicas para la degradación de terpenos cíclicos o acíclicos. Pero no se ha encontrado ningún documento que refleje que una misma cepa de *Pseudomonas sp.* sea capaz de degradar terpenos cíclicos y acíclicos.

Por tanto, las reivindicaciones 1-19 presentan novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.