

Izolacija bakterijskih populacija iz zemljišta zagađenog aromatičnim ugljovodonicima

Biodegradacija zagađenih zemljišta se vrši posredstvom specifičnih bakterijskih populacija koje dati zagađivač mogu da koriste kao jedini izvor ugljenika. Metode koje koriste mikroorganizme za degradaciju toksičnih supstanci do manje toksičnih se nazivaju bioremedijacijom. U ovom radu uspešno su izolovane 3 bakterijske populacije koje su pokazale rezistentnost ka fenolu i benzinu, kao i mogućnost korišćenja ovih jedinjenja kao izvora hrane. Korišćenjem kombinacije PCR i RFLP metode, dokazano je da su sve tri izolovane populacije bakterija međusobno različite. Sekvenciranje 16SrRNA gena dve od tri izolovane populacije sa različitim RFLP profilima sečenja je pokazalo da izolovane bakterije pripadaju rodovima Bacillus i Staphylococcus. Dalja istraživanja se mogu ticati identifikacije treće izolovane populacije, kao i optimizacije procesa bioremedijacije sa izolovanim bakterijama, kao i testiranje njihove sposobnosti da degraduju različite aromatične ugljovodonike. Moguća primena ovog rada je u budućoj potencijalnoj remedijaciji kontaminiranih urbanih zemljišta.

Uvod

Zemljišta su danas zagađena raznim organskim i neorganskim zagađivačima. U životnoj sredini je prisutan veliki broj zagađivača, što je posledica sve veće primene hemijskih proizvoda u poljoprivredi, usled čega dolazi do povećanog zagađenja zemljišta ksenobiotičima, koji imaju negativan i ireverzibilan efekat na kvalitet i zdravlje zemlje i organizama iz zemlje (Andreoni i Gianfreda 2007). Glavni ksenobiotici su

izomeri benzena, toluena, etilbenzena i ksilena (obično kolektivno označavani kao BTEX). Navedena jedinjenja su toksična i nastaju prosipanjem benzina, gasa, dizel goriva i ostalih petrohemijskih jedinjenja iz rezervoara u kojima se čuvaju, i kao nusprodukt sagorevanja ovih goriva.

Ekološka istraživanja su pokazala da organizmi različito reaguju na zagađivače. U hemijski kontaminiranom zemljištu toksična jedinjenja smanjuju diverzitet mikrobioloških zajednica (Juck *et al.* 2000; Roling *et al.* 2002), čime dolazi do proliferacije specifičnih populacija koje zagađivači mogu da koriste kao jedini izvor ugljenika (Atlas. 1984).

Poslednjih godina povećava se interesovanje za biološke metode koje mogu da pomognu pri otklanjanju rizika od organskog zagađenja u zemljištu, kao i da efektivno uspostave pređašnje stanje sistema. Ove metode se zbirno nazivaju bioremedijacijom, i podrazumevaju korišćenje mikroorganizama za uklanjanje ili degradaciju toksičnih supstanci do manje toksičnih ili netoksičnih. Pri ovom procesu, mikroorganizmi preko svojih enzima razgrađuju zagađivače, transformišući ih u netoksične proizvode, ugljen dioksid i vodu (Andreoni i Gianfreda 2007). Upotreba mikroorganizama u remedijaciji je sve češća, pre svega zbog ekonomske isplativosti (Margesin *et al.* 2003). Margesin i saradnici su dokazali pozitivnu korelaciju između nivoa kontaminacije i broja izolovanih genotipova bakterija sposobnih za degradaciju n-alkana i aromatičnih ugljovodonika (Margesin *et al.* 2003).

Filogenetske analize koje se koriste u katalogizaciji bakterija su zasnovane, između ostalog, na

Aleksej Drino (1991), Valjevo, Karađorđeva 65a, učenik 4. razreda Valjevske gimnazije

MENTOR: Iva Pruner, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd

sekvenciranju 16S rRNK. Bakterijska 16S rDNK je univerzalno prisutna, i može se umnožiti u reakciji lančane polimerizacije uz pomoć prajmera specifičnih za 16S rRNK gen. Pored visoko konzerviranih regiona u okviru gena za 16S rRNK postoje i hipervarijabilni regioni na osnovu čije sekvence se bakterije mogu klasifikovati (Marchesi *et al.* 1998).

Cilj ovog rada je izolacija bakterija iz zemljišta kontaminiranog aromatičnim ugljovodonicima i testiranje izolovanih sojeva na rast u prisustvu zagađivača kao jedinih izvora ugljenika, kao i kasnija filogenetska karakterizacija.

Materijal i metode

Uzorci zemljišta

Uzorci kontaminiranih zemljišta su uzeti kod dve benziske pumpe u centru Valjeva, sa dela koje nije bilo zaštićeno rastinjem. Kontrolno zemljište je uzeto duboko na šumskom terenu, daleko od izvora zagađenja. Uzorci su pokupljeni špatulom sterilisanom zagrevanjem na plamenu, sa dubine od oko 5 cm, i u sterilnim posudama na ledu preneti u laboratoriju, gde su čuvani na -20°C (temperatura zamrzivača).

Medijumi za rast bakterija

NE podloga je korišćena kao neselktivni medijum za gajenje svih kultura izolovanih iz kontaminirane zemlje. Litar podloge sadrži:

- 10 g glukoze
- 2 g ekstrakta kvasca
- 1 g mesnog ekstrakta
- 2 g kazein hidrolizata

Za čvrsti NE medijum je potrebno dodati 1.5% agra u finalnu koncentraciju. Sterilisati autoklaviranjem 20 minuta na 121°C.

BS podloga je korišćena za proveru rasta izolovanih bakterija na polutantima kao jedinim izvorima ugljenika.

Litar podloge sadrži:

- 6 g Na₂HPO₄
- 3 g KH₂PO₄
- 0.5 g NaCl
- 1 g NH₄Cl
- 0.04% fenol ili 0.01% benzin

Za čvrsti BS medijum je potrebno dodati 1.5% agra u finalnu koncentraciju. Sterilisati autoklaviranjem 20 minuta na 121°C.

Predtretman i izolacija fenol i benzin rezistentnih bakterija

Pre zasejavanja na podlogu svi uzorci su tretirani fenolom i benzinom. Svaki uzorak je podeljen na tri grupe:

– Netretirana grupa – 0.1 g zemlje je rastvoren u 100 µL 50 mM kalijum-fosfatnog pufera i inkubiran 120 minuta na sobnoj temperaturi. Suspenzije su dopunjene sa 900 µL dH₂O, i vorteksovane. 200 µL suspenzije razblaženja 10⁻⁴ su utrljane na NE podlogu.

– Fenol-rezistentne bakterije – 0.1 g zemlje je rastvoren u 100 µL 50 mM kalijum-fosfatnog pufera sa 1.5 % fenola i inkubiran 120 minuta na sobnoj temperaturi. Suspenzije su dopunjene sa 900 µL dH₂O, i vorteksovane. 200 µL suspenzije razblaženja 10⁻⁴ su utrljane na NE podlogu.

– Benzin-rezistentne bakterije – 0.1 g zemlje je rastvoren u 100 µL 50 mM kalijum-fosfatnog pufera sa 1.5% benzina i inkubirana 120 minuta na sobnoj temperaturi. Suspenzije su dopunjene sa 900 µL dH₂O, i vorteksovane. 200 µL suspenzije razblaženja 10⁻⁴ su utrljane na NE podlogu.

Nakon perioda inkubacije od 36 h izabrano je 11 pojedinačnih kolonija sa svih zasejanih NE podloga koje su prebačene u 5 mL tečne NE podloge, radi dobijanja čistih kultura. Kolonije dobijene nakon predtretmana fenolom i benzinom su označene fenol, odnosno benzin tolerantne, respektivno.

PCR umnožavanje 16srRNK gena

Geni za 16S rRNK sojeva koji razgrađuju aromatične ugljovodonike umnoženi su univerzalnim bakterijskim prajmerima:

20F 5'- GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'
1492R 5'- TAC CTT GTT ACG ACT T-3'

Reakcija lančane polimerizacije (PCR) sastoji se iz tri koraka koji se sukcesivno ponavljaju i omogućavaju sintezu DNK: denaturacija dvolančane matrice DNK, vezivanje prajmera za matricu na osnovu komplementarnosti baza i elongacija DNK polimerazom. Očekivana dužina je bila 1367 bp.

Reakciona smeša za PCR reakciju ukupne zapremine od 25 µL je sadržala: 5 µL tečne NE kulture čistih sojeva bakterija, 10.55 µL dH₂O, 3% DMSO, 2.5 µL pufera specifičnog za polimerazu, 0.5 µL 20F prajmera, 0.5 µL 1387R prajmera, 2.5 µL dNTP i 2.5 µL 10 × MgCl₂

Dodavanju polimeraze je prethodio „Hot start korak”, koji podrazumeva inkubaciju PCR smeše 15 minuta na 98°C, radi lize bakterijskih ćelija i oslobađanja DNK. Nakon ovog koraka dodaje se 0.2 μ L Fire polimeraze. Šema PCR reakcije za umnožavanje 16s rRNK gena data je u tabeli 1.

Tabela 1. Šema PCR reakcije za umnožavanje 16s rRNK gena

Faza reakcije	Temperatura [°C]	Trajanje	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	3'	1
Touch down PCR	95	40"	} 30
	60	1'	
	72	2	
PCR	95	40"	} 10
	45	1'	
	72	2'	
Finalna elongacija	72	10'	1

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analiza

PCR produkti podvrgnuti digestiji restrikcionim enzimom RsaI (Fermentas). U smešu posle PCR reakcije dodato je 3 μ L 1 \times Tango pufera, kao i 1 μ L RsaI enzima (stok 10U/ μ L) (RsaI enzim prepoznaje GTAC sekvencu, koja se često nalazi u DNK). Smeša je inkubirana 2 h na 37°C.

Proizvodi digestije su analizirani na 1.5% agaroznom gelu. Elektroforeza je vršena u 1 \times TAE puferu (40 mM Tris, 20 mM Na-acetat, 1 mM Na2EDTA). Vizuelizacija DNK omogućena je dodavanjem etidijum-bromida u gel i osvetljavanjem gela UV svetlošću talasne dužine 266 nm.

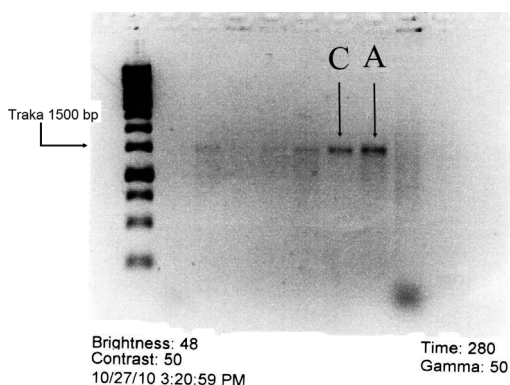
Sekvenciranje 16S rRNK gena

Od ukupnih 11 uzoraka populacija, izdvojene su dve populacije za dalji rad, od kojih je svaka pokazivala drugačiji profil sečenja RFLP analize (profil A i profil C). Zbog nemogućnosti ponovnog rasta bakterijske populacije sa profilom sečenja B u uslovima laboratorije Instituta za molekularnu genetiku i

genetski inženjering, sekvenciranje 16SrRNK gena ove vrste nije urađeno.

PCR produkti umnoženog gena (slika 1) su prečišćeni pre sekvenciranja kitom za prečišćavanje PCR produkata QIAquick PCR purification kit (QIAgeu), prema standardnom protokolu proizvođača (QIAquick PCR purification microcentrifuge and Vacuum Protocol). Koncentracija ovako prečišćene DNK je izmerena aparatom NanoVue (GE Health Care), i iznosila je 2.0 ng/ μ L i 3.7 ng/ μ L za profil A i profil C, respektivno.

Sekvenciranje DNK se vršilo komercijalnim



Slika 1. PCR produkt gena 16SrRNK bakterijskih populacija sa profilom sečenja C i A

Figure 1. PCR product of 16SrRNA gene of bacterial population with RFLP profile C and A

kitom BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing. Za reakciju sekvenciranja potrebno je pripremiti adekvatno prečišćenu DNK matricu, kao i odgovarajući oligonukleotid. Da bi reakcija sekvenciranja bila optimalna potrebno je precizno odmeriti količinu PCR produkta koji se sekvencira, pošto se broj pročitanih nukleotida smanjuje ako je količina matrice veća ili manja od optimalne.

Reakcija sekvenciranja je vršena u zapremini od 8 μ L, koja je sadžala:

- Ready Reaction Mix, 2/ μ L
- Oligonukleotidi
 - 20F-forward oligonukleotid, 1/ μ L
 - 1492R-reverse oligonukleotid, 1/ μ L
- DNK matrica, 2/ μ L PCR produkta
- DH₂O, 3/ μ L

Program na kom se vrši umnožavanje je sledeći (tabela 2):

Tabela 2. Šema PCR reakcije za sekvenciranje 16s rRNK gena

Temperatura [°C]	Trajanje	Broj ciklusa
96	1'	1
96	10"	}25
50	5"	
60	4'	

Posle reakcije sekvenciranja potrebno je prečistiti produkte reakcije na sledeći način:

- u 8 μ L reakcione smeše dodati 40 μ L rastvora A (rastvor A: 1.2 mL 3M Na-acetata, 25 mL etanola, 5.8 mL H₂O)
- smešu centrifugirati 10 minuta na 13000 rpm
- odtiti supernatant i talog isprati sa 20 μ L 70% etanola
- smešu centrifugirati 10 minuta na 13000 rpm
- odtiti supernatant i talog isprati sa 20 μ L 70% etanola
- smešu centrifugirati 10 minuta na 13000 rpm
- odtiti supernatant i osušiti talog
- dodati 20-25 μ L HiDi Formamide i vorteksovati

Dobijena sekvenca je propuštena kroz BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algoritam, koji omogućava poređenje dobijene sekvence sa bazom podataka već poznatih DNK sekvenci.

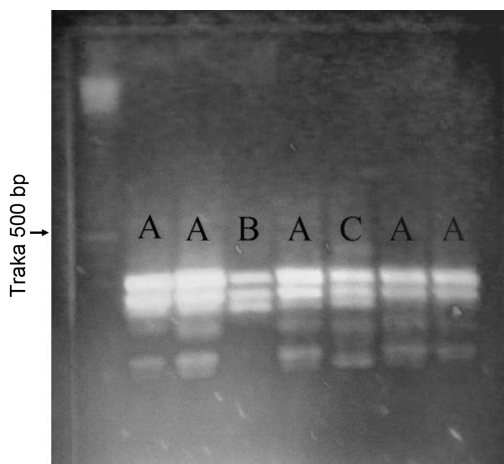
Rezultati i diskusija

Kolonije izrasle nakon predtretmana fenolom, odnosno benzinom označene su kao fenol tolerantne, odnosno benzin tolerantne, respektivno. RFLP analiza je dala profile sečenja, prikazane na slici 2.

U ovom radu su uspešno izolovane 3 populacije bakterija koje su pokazale rezistentnost prema benzinu i fenolu. Ove populacije se razlikuju po restrikcionim profilima 16s rRNK gena, na osnovu kojih se može zaključiti da su 3 izolovane bakterijske populacije međusobno različite.

Potvrdu RFLP analize može dati sekvenciranje 16SrRNK gena ovih populacija.

Radovi objavljuvani na ovu temu pokazuju visoku korelaciju između nivoa zagađenosti i broja izolovanih genotipova koji su različiti, kao i da se u zagađenim zemljištima u velikom procentu nalaze genotipovi



Slika 2. Rezultati RFLP analize.

Različite bakterijske populacije su obeležene razlicitim slovima (A, B, C)

Napomena: Profili sečenja ostalih uzoraka nisu prikazani, zato što im se profil poklapa sa profilom A

Figure 2. RFLP analysis results

Different bacterial population are marked with different letters (A, B, C)

Note: The profiles for other samples are not shown, as they are concurrent with profile A

već okarakterisanih bakterijskih populacija uključених u degradaciju n-alkana i cikličnih ugljovodonika (Margesin *et al.* 2003). Zbog ovih podataka je bitno filogenetski okarakterisati populacije izolovane u ovom radu.

Dobijeni rezultati sekvenciranja gena su bila sekvenca od 1270 nukleotida i 1331 nukleotid za bakterije profila sečenja C i A, respektivno (sekvenca bakterija su date u prilogu).

Posle BLAST pretraživanja baze podataka, dobijeni su sledeći rezultati (slika u prilogu):

- Sekvenca gena bakterijske populacije sa profilom sečenja A se poklapa 99% sa rodom *Bacillus*.
- Sekvenca gena bakterijske populacije sa profilom sečenja C se poklapa 99% sa rodom *Staphylococcus*.

Pošto je očekivana dužina PCR produkta 16SrRNK gena 1367 nukleotida, za oba uzorka (1270 i 1331 nukleotid) može se sa sigurnošću tvrditi da pripadaju navedenim rodovima.

Takođe, prema bazi podataka, možemo sa manjom dozom sigurnosti odrediti vrstu bakterije. Tako, za populaciju koja pripada rodu *Bacillus*, rezultati pretrage pokazuju da pripadaju vrsti *Bacillus altitudinis*.

Za populaciju koja pripada rodu *Staphylococcus*, rezultati pretrage pokazuju da pripadaju vrsti *Staphylococcus aureus*.

Posle ovih rezultata, možemo sigurno tvrditi da izolovane benzin i fenol tolerantne bakterije sa istim profilom sečenja pripadaju istim rodovima.

Poslednjih godina sve je veći broj zagađivača životne sredine, a razvijeno je i veliki broj fizičkih i hemijskih metoda za njihovo uklanjanje. Najčešće ove metode dovode do nastanka toksičnih intermedijera. Sa druge strane bioremedijacija kao biološki metod za uklanjanje zagađivača predstavlja efikasan, ekonomičan i ekološki bezbedan pristup, te se tako u poslednje vreme stavlja akcenat na automatizaciju i optimizaciju metoda za izolaciju autohtonih bakterija koje su već priviknute na date uslove sredine. Ovaj proces korišćenja autohtonih bakterija se naziva biostimulacija, dok u slučaju kad je neophodno uvesti, za datu sredinu, nerezidentni soj proces se označava kao bioaugmentacija (Andreoni i Gianfreda 2007). Korišćenje jeftinih metoda za uklanjanje BTEX jedinjenja ima veliku ekonomsku prednost, jer sam proces izolacije bakterija i optimizacije procesa degradacije manje košta od tretmana zagađenih područja hemijskim agensima.

Dobro je poznato da su bakterijama pored ugljovodonika kao izvora ugljenikovih atoma potrebni i mikronutritijenti. Iz ovoga proizilazi da stopa degradacije uglavnom zavisi od dostupne količine azota i fosfora u okolini. Fertilizacijom neorganskim azotom i fosforom se može umnogome povećati rast degradirajućih bakterija, a i optimizovati sam proces degradacije. Velika koncentracija može uzrokovati eutrofikaciju, dok premale koncentracije rezultuju suboptimalnim nivoom remedijacije. Dalje smernice istraživanja bi se mogle ticati empirijskog određivanja optimalne količine mikronutritijenata. Ovi podaci bi mogli biti korišćeni za razumevanje sistematskog efekta ovih neorganskih elemenata na remedijaciju, što bi dovelo do razvika racionalnijih strategija (Röling *et al.* 2002).

Zaključak

U ovom radu izolovane su populacije bakterija koje su sposobne za degradaciju aromatičnih ugljovodonika. Kombinacijom PCR i RFLP metode zaključeno je da je izolovano 3 različite populacije bakterija, obeležene kao A, B i C. Sekvenciranje 16SrRNA gena dve od tri populacije (A i C) je otkrilo da sekvencirani sojevi pripadaju rodovima *Bacillus* i *Staphylococcus*, respektivno.

Dalje ispitivanje ovih sojeva i testiranje njihove sposobnosti da degraduju različite aromatične ugljovodonike omogućila bi njihovu potencijalnu primenu u remedijaciji kontaminiranih urbanih zemljišta.

Literatura

- Andreoni V., Gianfreda L. 2007. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76**: 287.
- Atlas R. M. 1984. Diversity of microbial communities, U: *Advances in microbial ecology* (ur. M. C. Marshall). New York: Plenum Press, vol 7, str.. 1-47.
- Farhadian M., Vachelard C., Duchez D. 2008. In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: A review. *Larrocche C. Bioresource Technology*, 99: 5296.
- Juck D., Charles T., Whyte L. G., Greer C. W. 2000. Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS Microbiol Ecol*, **33**: 241.
- Margesin R., Labbé D., Schinner, F., Greer C. W., Whyte L. G. 2003. Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**: 3085.
- Marchesi J., Sato T., Weightman A., Martin T., Fry J., Hiom S., Wade W., 1998. Design And Evaluation Of Useful Bacterium-Specific Pcr Primers That Amplify Genes Coding For Bacterial 16s Rrna. *Applied And Environmental Microbiology*, 64: 795.
- Röling W. F., Milner M. G., Jones D. M., Lee K., Daniel F., Swannell R. J., Head I. M. 2002. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 5537.

Isolation and Characterization of Bacteria from Soil Polluted with Aromatic Hydrocarbons

The biodegradation of petroleum hydrocarbons polluted soil is a result of adapted microorganisms ability to degrade these contaminants. Over the last decades, there has been an increasing interest in biological methodologies, collectively indicated as bioremediation, that may help reduce the risk of organic pollutants in soil and effectively restore polluted sites. These methodologies, usually considered environment-friendly treatments, constitute of managed

or spontaneous processes mediated by mainly microorganisms, which degrade or transform contaminants to less toxic or nontoxic products.

In the present paper three petrol/phenol resistant bacterial populations have been isolated. With a combination of the PCR and the RFLP analysis methods, the difference between these three isolated genotypes was proven. 16S ribosomal RNA sequencing showed that the isolated bacteria belong to *Bacillus* and *Staphylococcus* genus. Further research may consider identification of the third isolated population, and attempt to optimize the process of bioremediation with isolated bacteria. The possible use of these findings in the future is the possibility of remediation in urban contaminated soils.

Prilog

Populacija sa profilom sečenja C:

AACCTACCTATAAGACTGGGATAAAGTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTTGAAC
CGCATGGTTCAAAAAGTGAAAGACGGTCTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCT
AGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC
ACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
GGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTT
ATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGG
CGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGG
TCATTGGAAGTGGAAAAGTGTAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAA
ATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACGCGTGA
TGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG
TGCTAAGTGTTAGGGGGTTCTGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
GAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCAT
GTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAATCTTGACATCCTTTGACAACTCTAGA
GATAGAGCCTTCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTG
GTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTG
GGCACTCTAAGTTGACTGCCGCTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG
CCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAATACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAG
GTCAAGCAAATCCCATAAAGTTGTTCTCAGTTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGC
TGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGT

Sekvenca sadrži 1270 nukleotida.

Populacija sa profilom sečenja A:

CTGCCTGTAAGACTGGGATAAAGTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGC
ATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTA
GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTT
GTTAGGGAAGAACAAGTGCAAGAGTAACTGCTTGACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG
CGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGG
TCATTGGAAGTGGGAAAGTGTAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTACCACGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTG
AGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG
AGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTG
GGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTA
GAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTG
GTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTACGTTG
GGCACTCTAAGGTGACTGCCGCTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT
GCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCTGCGAGACCGCAA
GGTTTAGCCAATCCCAAAATCTGTTCTCAGTTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAG
CTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCCTTGTACACA
CCGCCGCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCCGTGAGGTAACCTT

Sekvenca sadrži 1331 nukleotid.

