

Filogenetska karakterizacija bakterijskih populacija jezera Pocibrava otpornih na teške metale

*Metode zasnovane na sposobnosti mikroorganizama za pasivizaciju toksičnih supstanci ili njihovo pretvaranje u manje toksične nazivaju se bioremedijacijom. Bioremedijacija voda zagađenih teškim metalima, vrši se pasivizacijom jona metala metabolitima bakterija, biosorpcijom ili bioakumulacijom metalnih jona u biomasi bakterija. U ovom radu su uspešno izolovane dve bakterijske populacije koje su pokazale rezistentnost ka cinku i dve bakterijske populacije koje su pokazale rezistentnost ka bakru, olovu i cinku. Korišćenjem kombinacije PCR i RFLP metoda pokazano je da su izolovane populacije međusobno različite. Sekvenciranjem delova gena za 16S rRNK kao i bioinformatičkom analizom dobijenih sekvenci, pokazano je da izolovane populacije pripadaju vrstama *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii*, *Lysinibacillus sphaericus* i *Lysinibacillus boronitolerans*. Konstrukcija filogenetskih stabala korišćenjem metoda Neighbor-joining, Maximum parsimony i Quartet puzzling potvrdila je poznate podatke o srodnosti ovih vrsta.*

Uvod

Teški metali spadaju u opasne zagađivače zbog njihove izražene toksičnosti na najrazličitije vrste organizama i hemijske stabilnosti tokom vremena (Christophe *et al.* 2011). Kontaminacija zemljišta teškim metalima je široko rasprostranjena (Giller 1998 *et al.*), a kontaminacija se sa zemljišta prenosi na vodotokove i jezera spiranjem usled atmosferskih padavina. Do kontaminacije uglavnom dolazi ljudskom aktivnošću, eksploatacijom ruda i izbacivanjem zgure, radom termocentrala i teške industrije, pri-

menom pesticida i đubriva koja u sebi sadrže teške metale, kao i direktnim ispuštanjem otpadnih voda u prirodne vodotokove (Gehong *et al.* 2008). Prisustvo jona teških metala u većoj koncentraciji ima veoma negativan uticaj na život mikroorganizama, izazivajući njihovu trenutnu smrt zaustavljanjem ili izmenom biohemijskih procesa unutar ćelije. Takođe, prisutnost jona teških metala smanjuje ukupnu reproduktivnu moć bakterija, usled čega dolazi do osiromašenja populacija. Tako dolazi do stvaranja evolutivnog pritiska, koji favorizuje opstanak onih bakterija koje već imaju razvijen izvestan stepen rezistencije (Giller *et al.* 1998). Bakterije rezistentne na jone teških metala, specijalizovanim mehanizmom aktivnog transporta izbacuju jone metala iz svoje citoplazme. Takve bakterije imaju sposobnost remedijacije, jer, iako jone teških metala samo izbacuju iz citoplazme nazad u okolinu, ne čineći jone manje reaktivnim i opasnim po ostale organizme, činjenica da preživljavaju u sredini zasićenoj teškim metalima čini ih posrednim bioremedijatorima. Naime, njihova aktivnost dovodi do povećanja pH okoline, dok njihovi izlučeni metaboliti imaju sposobnost taloženja jona teških metala, čineći ih bezopasnim po ostale organizme (Dietrich 2000).

Jezero Pocibrava (44.2498 SGŠ, 19.9252 IGD), nastalo je veštačkim pregrađivanjem vodotokova dva manja potoka. Iako se još uvek smatra nezagađenim, u vodi ovog jezera, usled ljudske aktivnosti, turističkih poseta i spiranja materijala sa okolnih obradivih površina, nalaze se supstance koje svojim negativnim delovanjem na životnu sredinu favorizuju rezistentnije oblike organizama. Filogenetske analize se zasnivaju na sekvenciranju i poređenju sekvenci dela gena

Božidar Radivojević (1992), Beograd, Maršala Birjuzova 50/5, student I godine osnovnih studija smera Računarstvo i informatika, Matematičkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

*MENTOR:
Aleksej Drino, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu*

za 16S rRNK. 16S rRNK se nalazi u svim bakterijskim oblicima i moguće ju je umnožiti u reakciji lančane polimerizacije (PCR) uz pomoć prajmera specifičnih za deo 16S rRNK gena. 16S rRNK sadrži kako visoko konzervisane regione, tako i hipervarijabilni regioni, na osnovu kojih je moguće klasifikovati i odrediti stepen srodstva bakterija (Marchesi *et al.* 1998).

Cilj ovog rada je izolacija bakterijskih sojeva rezistentnih na teške metale iz vode Petničkog jezera, testiranje izolovanih sojeva na rast u prisustvu jona teških metala, kao i filogenetska karakterizacija dobijenih sojeva.

Materijal i metode

Uzorkovanje populacija. Mulj je uzorkovan na tri mesta pri obali jezera Pocibrava (slika 1), za koje bi se moglo pretpostaviti da predstavljaju bakterijske populacije svojstvene svakom od tri vodotoka koji se ulivaju u jezero. Uzorci su uzeti sa dubine od oko 5 cm od dna jezera, prethodno sterilisanom špatulom, preneseni sterilno na ledu do laboratorije, gde su čuvani na temperaturi od 4°C.

Medijumi za rast bakterija. Za umnožavanje bakterija, kao i za ispitivanje njihovog rasta u prisustvu teških metala, korišćena je Metal toxicity pod-

loga (MT). Litar tečnog neselektivnog MT medijuma sadrži: 16.5 g natrijum piruvata, 2.13 g natrijum sulfata, 0.06 g kalcijum hlorida, 1 g amonijum hlorida, 0.5 g triptona, 0.05 g ekstrakta kvasca, 8.614 g HEPES-a (Rajesh *et al.* 2001).

Korekcije originalnog protokola su izvršene na sledeći način:

- umesto HEPES-a stavljen je PIPES u istom molarnom odnosu
- umesto natrijum laktata stavljen je natrijum piruvat u istom molarnom odnosu.

Selektivni MT medijum, pored navedenih komponenti, sadrži i rastvor jona metala u onoj koncentraciji čiji se uticaj želi ispitati. Za litar čvrstog MT medijuma, dodaje se još i 15 g agara.

Takođe je korišćena i LB podloga, za kontrolu rasta početnih uzoraka, pri čemu litar tečne LB podloge sadrži: 10 g triptona, 5 g ekstrakta kvasca, 10 g natrijum hlorida. U litar čvrste LB podloge dodaje se i 15 g agara. U petrijeve šolje sa čvrstim LB medijumom je utrljano po 200 µL rastvora nistatina, koncentracije 50 µg/mL, radi sprečavanja razvitka gljiva.

Svi pravljeni medijumi su sterilisani dvadesetominutnim autoklaviranjem na 120°C i pritisku od 2 bara.

Umnožavanje bakterija. Od svakog uzorka je u sterilnim uslovima odmereno po 1 g i rastvoreno u



Slika 1.
Lokacije uzorkovanja

Figure 1.
Bacterial sampling locations

50 mM K-fosfatnom puferu. Nakon inkubacije uzoraka u puferu, u trajanju od 20 minuta, napravljena su tri razblaženja uzoraka koncentracija 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Od svakog od 9 razblaženja (3 uzorka po 3 razblaženja), utrljano je po 200 μ L u petri šolju sa neselektivnom MT podlogom, kao i 200 μ L u petri šolju sa LB+nistatin podlogom koja je služila za kontrolu rasta. Uzorci su inkubirani na temperaturi od 30°C.

Nakon inkubacije, 25 kolonija koje su obeležene kao čiste, prenesene su u po 5 mL tečnog MT medijuma i ostavljene na inkubaciji na temperaturi 30°C.

Selekcija bakterija otpornih na prisustvo metalnih jona bakra, olova i cinka. Napravljeno je po 3 rastvora različitih koncentracija jona bakra, cinka i olova (tabela 1):

Tabela 1. Koncentracije rastvora jona bakra, cinka i olova

	Koncentracija [mM]		
	Rastvor 1	Rastvor 2	Rastvor 3
CuSO ₄	0.05	0.75	2
ZnCl ₂	0.01	0.3	1.5
Pb(NO ₃) ₂	0.3	1.5	2.5

Odabrano je 7 epruveta tečnih MT kultura bakterija koje će biti gajene na selektivnim medijumima. Odabrane su kulture, koje su nastale iz uzoraka uzetih od morfološki različitih bakterijskih kolonija koje su rasle na čvrstom neselektivnom MT medijumu. Suspenzija bakterijske kulture je sterilno utrljana na svaku od 9 selektivnih MT medijuma. Medijumi su ostavljeni na inkubaciji na 30°C.

Prečišćavanje bakterijskih kolonija. Nakon 48 časova od razmazivanja suspenzija, uzeti su uzorci sa čvrstih kultura i preneti u 5 mL tečnog neselektivnog MT medijuma. Tako dobijene prečišćene tečne kulture su ostavljene da inkubiraju na 30°C. Nakon 48 h, bakterije su oborene centrifugiranjem 1.5 mL tečne kulture (1 min, 13400 rpm) i odlivanjem supernatanta, sa ponavljanjem navedenog ciklusa 3 puta. Bakterije su resuspendovane 72 h kasnije u tečnoj neselektivnoj LB podlozi.

Izdvajanje genomske DNK. Od svake od bakterijskih kultura uzeto je po 1.5 mL suspenzije i prebačeno u mikrotubu, a zatim je sadržaj centrifugiran (1 min, 13400 rpm), uz odlivanjem supernatanta, sa po-

navljanjem koraka još dva puta. U svakoj od mikrotuba ostavljeno je približno 200 μ L supernatanta. Nakon toga je dodato 30 μ L 10% SDS i ostavljeno 10 min na 50°C. Sadržaj mikrotube je centrifugiran 10 min na 13400 rpm, a zatim je supernatant prebačen u novu mikrotubu. Dodato je 250 μ L rastvora fenola i hloroforma (napravljenog u odnosu 1/24) a zatim je sadržaj centrifugiran 10 min na 13400 rpm, izdvojeni supernatant je prebačen u novu mikrotubu, a onda je ceo korak ponovljen još jednom. Dodato je 50 μ L 3 M natrijum acetata, pH 5.2 i 85 μ L ohlađenog izopropanola. Mikrotube su ostavljene na 4°C, 10 min, nakon čega je odliven supernatant i preostali talog je ispran sa 1 mL 70% etanola. Talog je osušen i resuspendovan sa 20 μ L sterilne vode. Koncentracija dobijene DNK je izmerena aparatom NanoVue (GE Health Care).

PCR umnožavanje 16S rRNK gena. Geni su umnožavani korišćenjem univerzalnih bakterijskih prajmera

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

Očekivana dužina proizvoda bila je 1367 bp.

Pre dodavanja u reakconu smešu, uzorci bakterijske DNK su razblaživani sterilnom vodom, do koncentracije DNK od 100 ng/ μ L.

Reakciona smeša za PCR reakciju ukupne zapremine od 50 μ L je sadržala: 1 μ L tečne MT kulture čistih sojeva bakterija, 29.1 μ L dH₂O, 1.5 μ L DMSO, 5 μ L pufera specifičnog za polimerazu (Reaction Buffer B), 0.4 μ L FIRE polimeraze, 1 μ L 20F prajmera, 1 μ L 1387R prajmera, 5 μ L dNTP i 5 μ L $\times 10$ MgCl₂. Shema PCR reakcije za umnožavanje 16S rRNK gena je data u tabeli 2.

Tabela 2. Shema PCR reakcije za umnožavanje 16S rRNK gena

Temperatura [°C]	Vreme	Broj ciklusa
95	3 min	1
95	40 s	} 30
60	1 min	
72	2 min	
72	10 min	1

RFLP analiza. PCR produkti su podvrgnuti digestiji restrikcijom enzimom HhaI (Amersham BioLabs). U smešu posle PCR reakcije dodato je 3

μL 1X Tango pufera M, kao i 1 μL RsaI enzima (stok 10 U/ μL). Smeša je inkubirana 2 h na 37°C.

Proizvodi digestije su analizirani na 1.5% agaroznom gelu. Elektroforeza je vršena u 1XTAE 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 ukupno 18 uzoraka populacija, izdvojene su četiri populacije za dalji rad, od kojih je svaka pokazivala drugačiji restrikcioni profil (profili nazvani D, K, P, R).

PCR produkti umnoženog gena 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).

Sekvenciranje DNK se vršilo komercijalnim Big-Dye Terminator v3.1 Cycle sequencing.

Reakcija sekvenciranja je vršena u zapremini od 8 μL , koja je sadržala 2/ μL Ready Reaction Mix, 1/ μL 20F-forward oligonukleotida, 1/ μL 1492R-reverse oligonukleotida, 2/ μL PCR produkta, 3/ μL DH₂O

Tabela 3. Program na kojem je vršeno umnožavanje DNK

Temperatura (°C)	Trajanje	Broj ciklusa
96	1 min	1
96	10 s	} 25
50	5 s	
60	4 min	

Posle reakcije sekvenciranja, prečišćeni su produkti reakcije. Napravljen je rastvor 1.2 mL 3 M Na-acetata, 25 mL etanola i 5.8 mL H₂O, a zatim je u 8 μL reakcione smeše dodato 40 μL tog rastvora. Smeša je centrifugirana 10 minuta na 13000 rpm, supernatant je odliven, a talog ispran sa 200 μL 70% etanola, a zatim je ovaj korak ponovljen još jednom. Smeša je ponovo centrifugirana 10 minuta na 13000 RPM, odliven je supernatant i osušen je talog. Dodato je još 20-25 μL HiDi Formamide i sadržaj je vorteksovan.

Bioinformatička analiza dobijenih sekvenci. Identifikacija sojeva sekvenciranih bakterija, izvršena je poređenjem njihovih 16S rRNK gena sa bazom podataka poznatih 16S rRNK sekvenci, korišćenjem

servisa NCBI-BLASTN (link u prilogu 1). Provera dobijenih rezultata je izvršena korišćenjem online servisa Ribosomal database project (web 1).

Dobijene sekvence su poravnate korišćenjem ClustalW servera (web 2), a zatim je dobijeno poravnanje konvertovano u PHYLIP format. Na osnovu dobijenog poravnanja sekvenci četiri ispitivane bakterijske kulture, kreirana su tri ukorenjena filogenetska stabla, korišćenjem metoda Neighbor-joining, Maximum parsimony i Quartet puzzling. Dobijene 4 sekvence su zatim poravnate korišćenjem ClustalW servera i sa poznatim sekvencama gena za 16S rRNK, 5 različitih gram negativnih bakterija. Bakterije su odabrane tako da budu dovoljno srodne, da bi bilo moguće izvršiti kvalitetno poravnanje, a sa druge strane, dovoljno filogenetski odvojene, da bi mogle poslužiti kao referenti za određivanje međusobne srodnosti sekvenciranih sojeva. Sekvence bakterija *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *Neisseria sicca*, *Pseudomonas fluorescens* i *Vibrio cholerae*, preuzete su iz online baze podataka „NCBI Gene-Bank database” (link u prilogu 1). Poravnanje je konvertovano u PHYLIP format i na osnovu dobijenog poravnanja odabranih 9 sekvenci, kreirana su još tri ukorenjena filogenetska stabla, korišćenjem metoda Neighbor-joining, Maximum parsimony i Quartet puzzling.

Neighbor-joining filogenetsko stablo je kreirano korišćenjem Neighbor-joining metoda programa Neighbor iz phylip 3.67 paketa, a na osnovu distance matrice kreirane korišćenjem dnadist programa iz paketa phylip 3.67. Maximum parsimony filogenetsko stablo je kreirano korišćenjem Maximum parsimony metoda iz programa dnaps iz phylip 3.67 paketa. Quartet puzzling filogenetsko stablo je kreirano korišćenjem Quartet puzzling metoda programa puzzle iz Tree-Puzzle 5.2 paketa sa ugrađenim bootstratom. Bootstrap analiza za Neighbor-joining i Maximum parsimony stabla je urađena programom BioEdit.

Rezultati

Od 29 tečnih prečišćenih kultura bakterija, izdvojeno je 7 kultura, čiji su reprezentanti na čvrstim neselektivnim MT podlogama bile kolonije koje su se morfološki razlikovale, pod oznakama D, K, O, P, Q, R, V. Tih sedam tečnih kultura su izdvojene za dalju analizu i zasejavanje na selektivnom medijumu.

Nakon 20 h od zasejavanja na selektivne medijume, uočeno je sledeće (tabela 4):

Tabela 4. Pregled razvitka bakterijskih kolonija na čvrstim selektivnim podlogama

Metal	Koncentracija		
	blaga (konc. 1)	srednja (konc. 2)	letalna (konc. 3)
Cu	razvijene kolonije D, K, O, P, Q, R, V	razvijena kolonija D, pristuna kolonija K	nema razvijenih bakterijskih kolonija
Zn	razvijene kolonije D, K, O, P, Q, R, V	razvijene kolonije D, K, O, P, R, prisutna kolonija Q, slabo prisutna kolonija V	razvijena kolonija D, slabo prisutne kolonije K, O, P, Q
Pb	razvijena kolonija Q, Pristuna kolonije D, K	razvijena kolonija Q, slabo prisutne kolonije D, K	prisutna kolonija Q, slabo prisutne kolonije D, K

Od analiziranih sedam predstavnika bakterijskih kultura (D, K, O, P, Q, R, V), njih četiri je pokazalo različite restriktione profile gena za 16S rRNK (D, K, P, R). Da se radi o različitim bakterijskim populacijama, potvrdu je dalo sekvenciranje gena za 16S rRNK ovih populacija. Dobijeni rezultati sekvenciranja gena, bile su sekvence od 827 nukleotida, 867 nukleotida, 820 nukleotida, 835 nukleotida, za bakterije profila sečenja D, K, P, R, respektivno (sekvence su date u prilogu).

Nakon NCBI-BLASTN 2.2.25+ pretraživanja baze bakterijskih gena za 16s rRNK dobijeni su sledeći rezultati:

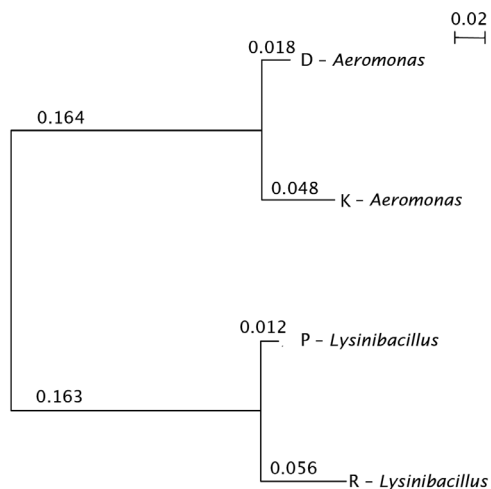
- sekvenca gena bakterijskih populacija sa profilima sečenja D i K se poklapa 99% sa rodom *Aeromonas*
- sekvenca gena bakterijskih populacija sa profilima sečenja P i R se poklapa 99% sa rodom *Lysinibacillus*

Takođe, NCBI-BLASTN pretragom je utvrđeno, iako sa manjom sigurnošću (budući da je očekivana dužina PCR produkata 1367 bp, a dužina čitljivog dela sekvenci između 820 bp i 867bp), da:

- sekvenca gena bakterijske populacije sa profilom sečenja D se poklapa 97% sa *Aeromonas caviae*
- sekvenca gena bakterijske populacije sa profilom sečenja K se poklapa 94% sa *Aeromonas veronii*
- sekvenca gena bakterijske populacije sa profilom sečenja P se poklapa 98% sa *Lysinibacillus sphaericus*
- sekvenca gena bakterijske populacije sa profilom sečenja R se poklapa 93% sa *Lysinibacillus boronitolerans*

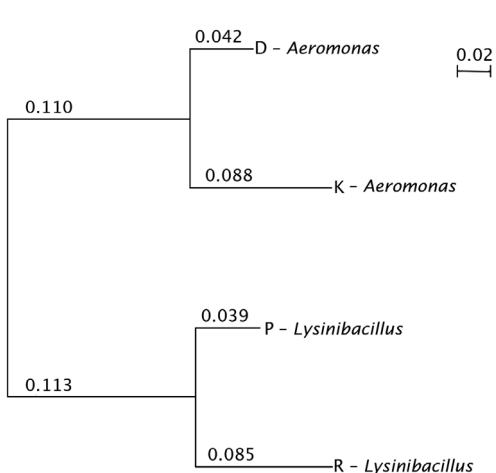
Nakon uspešnog poravnanja dobijene četiri sekvence korišćenjem ClustalW servera, dobijena su tri filogenetska stabla prikazana na slikama 2, 3 i 4.

Dobijene sekvence su zatim poravnate sa još pet poznatih sekvenci ClustalW servera, a zatim konstruisana 3 filogenetska stabla prikazana na slikama 5, 6 i 7.



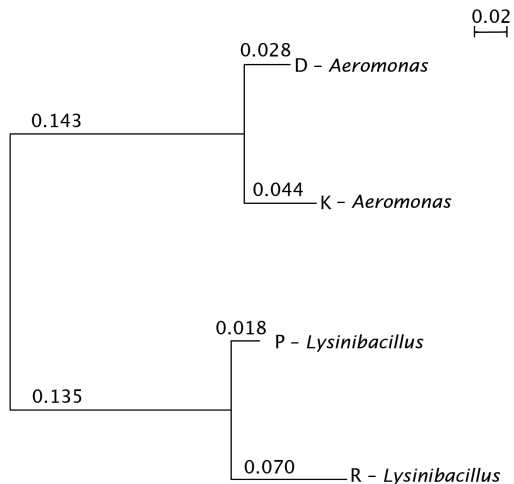
Slika 2. Neighbor joining filogenetsko stablo koje prikazuje stepen srodnosti između 4 sekvencirana soja bakterijskih kultura

Figure 2. Neighbor joining phylogenetic tree that shows the degree of similarity between the four sequenced strains of bacterial cultures



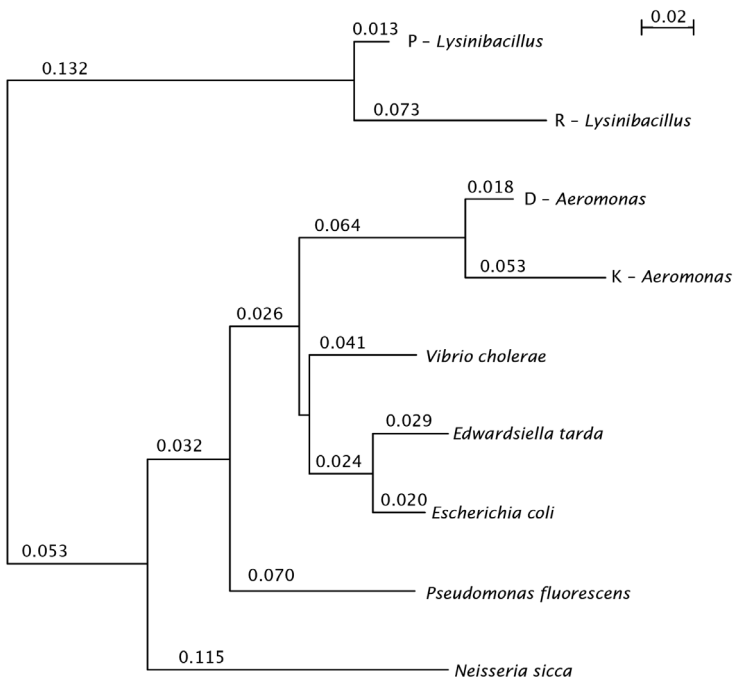
Slika 3. Maximum parsimony filogenetsko stablo koje prikazuje stepen srodnosti između 4 sekvencirana soja bakterijskih kultura

Figure 3. Maximum parsimony phylogenetic tree that shows the degree of similarity between the four sequenced strains of bacterial cultures



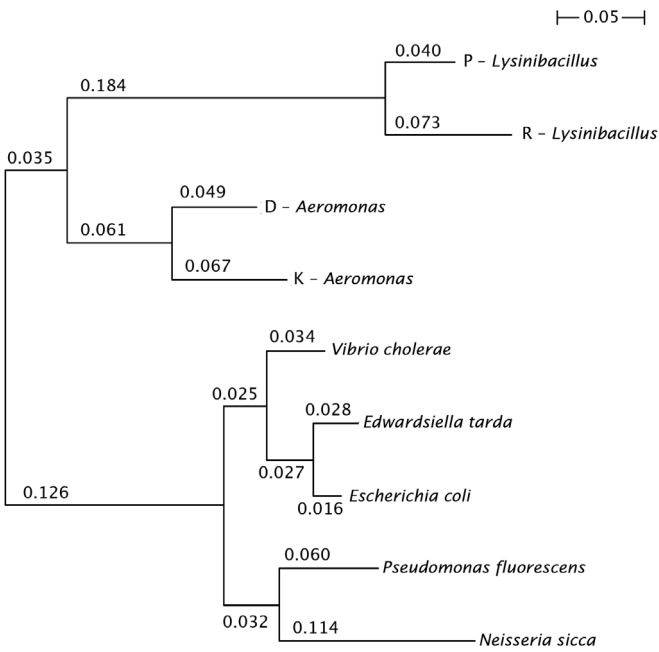
Slika 4. Quartet puzzling filogenetsko stablo koje prikazuje stepen srodnosti između četiri sekvencirana soja bakterijskih kultura

Figure 4. Quartet puzzling phylogenetic tree that shows the degree of similarity between the four sequenced strains of bacterial cultures



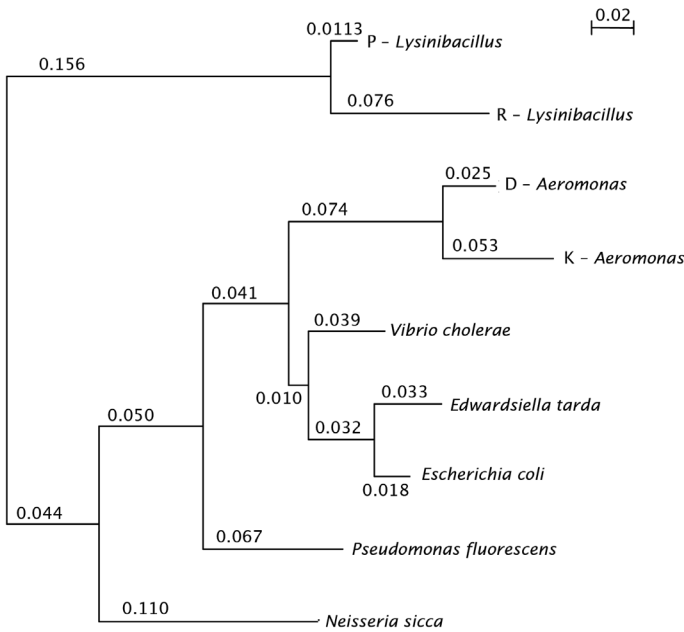
Slika 5. Neighbor joining filogenetsko stablo koje prikazuje stepen srodnosti između 9 sojeva bakterijskih kultura

Figure 5. Neighbor joining phylogenetic tree that shows degree of relatedness between 9 strains of bacterial cultures



Slika 6. Maximum parsimony filogenetsko stablo koje prikazuje stepen srodnosti između 9 sojeva bakterijskih kultura

Figure 6. Maximum parsimony phylogenetic tree that shows degree of relatedness between 9 strains of bacterial cultures



Slika 7. Quartet puzzling filogenetsko stablo koje prikazuje stepen srodnosti između 9 sojeva bakterijskih kultura

Figure 7. Quartet puzzling phylogenetic tree that shows degree of relatedness between 9 strains of bacterial cultures

Diskusija

U poslednje vreme, sve je više zagađivača životne sredine, te je stoga razvijen znatan broj fizičkih i hemijskih metoda za njihovo uklanjanje (tabela 5). Postoje tri osnovna načina na koji su bakterije sposobne da prečiste vode zasićene metalnim jonima:

- Biosorpcijom jona metala u biomasi mrtvih bakterijskih ćelija, inače sposobnih za deobu u surovom okruženju (adsorpcijom na ćeljskom omotaču, vezivanjem jona za proteinska mesta, mikrotaloženjem soli metala unutar mrtve ćelije).
- Bioakumulacijom jona metala, građenjem organskih kompleksa potrebnih za funkcionisanje bakterija, sintezu njihovih organometalnih zaštitnih omotača ili taloženjem nerastvornih soli metala unutar žive ćelije.
- Pasivizacijom jona metala, građenjem njihovih taložnih soli u reakciji sa proizvodima metabolizma živih bakterijskih ćelija (Zouboulis 2002).

Većina poznatih nebioloških metoda za remedijaciju ili dovodi do nastanka toksičnih intermedijera ili je njihova primena neefikasna i skupa (slika 4), dok bioremedijacija kao prirodan metod za uklanjanje zagađivača predstavlja ekonomičan, efikasan i ekološki prihvatljiv pristup. Stoga se sve više posvećuje pažnja automatizaciji i optimizaciji metoda za izolaciju autohtonih bakterija, već priviknutih na uslove sredine koje bi mogle biti upotrebljavane u nekom od metoda bioremedijacije (Drino 2010).

Vrsta *Aeromonas caviae* je jedan od standardnih stanovnika stajućih voda, kod koje je već ispitivana

primena u remedijaciji vode zasićene Cr(VI) jonima, putem adsorpcije jona u biomasi bakterija ovog tipa. Bakterije ove vrste su pokazale mogućnost razmnožavanja u vodi obogaćenoj hromom, dok je primećeno da mrtve bakterijske ćelije adsorbuju deo jona hroma iz vode, pasivizujući ih (Maria *et al.* 2004).

Vrsta *Aeromonas veronii* je kao i ostale bakterije njenog roda endosimbiont mnogih vodenih vrsta. (Joerg *et al.* 1999). Kao i *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii* ima sposobnost preživljavanja u okruženju nepogodnom za život većine bakterija. U ovom radu je pokazano da *Aeromonas veronii* preživljava i ima sposobnost deobe u okruženju zasićenom teškim metalima. Mehanizam preživljavanja *Aeromonas veronii* još nije poznat. Kako je pokazano da su *Aeromonas veronii* i *Aeromonas caviae* u bliskim filogenetskim odnosima, može se pretpostaviti da bi *Aeromonas veronii* mogao koristiti isti mehanizam kao *A. caviae*.

Vrsta *Lysinibacillus boronitolerans* kod koje je već ispitivana sposobnost da raste u sredinama zasićenim borom, ima izuzetno otporne spore, čije se primene još mogu ispitivati u bioremedijaciji voda zagađenih širokim spektrom zagađivača (Iftikhar *et al.* 2007).

Za vrstu *Lysinibacillus sphaericus* nije pronađeno da pokazuje sposobnost remedijacije voda zasićenih jonima teških metala. Međutim, kako je za *Lysinibacillus boronitolerans* ispitivana sposobnost remedijacije i preživljavanja u zagađenim sredinama, moguće je pretpostaviti da sposobnost remedijacije ima i *Lysinibacillus sphaericus*, a na osnovu pokazane filogenetske srodnosti i pokazane sposobnosti preživljavanja obe vrste bakterija u sredinama zasićenim cinkom.

Tabela 5. Prednosti i mane konvencionalnih metoda za prečišćavanje voda zasićenih teškim metalima

metoda	mane	prednosti
hemijsko taloženje	teško odvajanje taloga, talog može biti takođe toksičan, nije naročito efikasna	jednostavna i relativno jeftina
elektrohemijski tretman	primenljiv za visoke koncentracije metala, osetljiva metoda, ne može se koristiti u prirodnim sistemima	izdvojeni metal se reciklira
reverzna osmoza	primenjuje se visok pritisak, suviše je skupa	veoma čista tečna faza, metal se može reciklirati
jonoizmenjivači	osetljiva na prisustvo čestica, suviše je skupa	veoma efektivna, uz moguću reciklažu metala
adsorpcija	nema efekta na sve metale	koriste se konvencionalna sredstva

Zaključak

U ovom radu su izolovane populacije bakterija koje su sposobne da prežive u sredini sa koncentracijom jona bakra, cinka i olova, toksičnom za većinu mikroorganizama. Kombinacijom PCR i RFLP metode zaključeno je da su izolovane četiri različite populacije bakterija, obeležene kao D, K, P, R.

Sekvenciranjem gena za 16S rRNK ovih populacija, otkriveno je da, od sekvenciranih sojeva, D-soj pripada vrsti *Aeromonas caviae*, K-soj vrsti *Aeromonas veronii*, P-soj vrsti *Lysinibacillus sphaericus* i R-soj vrsti *Lysinibacillus boronitolerans*. Na osnovu već rađenih ispitivanja na *Aeromonas caviae* i bakterijama roda *Lysinibacillus* u njihovoj primeni u bioremedijaciji, kao i pokazane sposobnosti preživljavanja ovih bakterija u sredini zasićenoj teškim metalima, može se pretpostaviti da bi dalja istraživanja osobina ovih sojeva mogla imati značaj za ostvarenje njihove primene u remedijaciji voda kontaminiranih teškim metalima.

U budućnosti bi se mogla posvetiti pažnja ispitivanju primene pripadnika roda *Aeromonas* u biosorpciji jona bakra, cinka i hroma iz vodenih okruženja zasićenih jonima ovih metala kao i ispitivanju primene roda *Lysinibacillus* u bioakumulaciji ili bioapsorpciji cinka, iz vodenih sredina zasićenih ovim metalom i utvrđivanje tačnih mehanizama remedijacije koje bi ove bakterije bile sposobne da izvrše.

Takođe, s obzirom na pokazanu filogenetsku srodnost *Lysinibacillus boronitolerans* i *Lysinibacillus sphaericus*, kao i na srodnost *Aeromonas veronii* i *Aeromonas caviae*, u budućnosti bi se mogao istraživati bioremedijacioni potencijal drugih bakterija pripadnika rodova *Aeromonas* i *Lysinibacillus*, a na osnovu mehanizama koji bi bili pronađeni kod bakterija pripadnika vrsta ispitivanih u ovom radu.

Zahvalnost. Veliku zahvalnost dugujem Ivi Pruner, na svesrdnoj pomoći i savetima tokom pisanja ovog rada, Aleksandri Nikolić za pruženu pomoć tokom sekvenciranja izolovanih bakterijskih populacija, kao i Ivani Morić na pruženoj mogućnosti da prisustvujem njenim predavanjima iz bioinformatike namenjenim studentima doktorskih studija biologije. Takođe, veoma sam zahvalan Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu, na pruženoj prilici da iskoristim njegove resurse. Na kraju, zahvaljujem se i Filipu Iliću, na pruženoj logističkoj podršci tokom prve faze pisanja ovog rada, kao i pravovremenom obaveštavanju o rokovima za predaju finalne verzije.

Literatura

Brian P. M. 2009. The second green revolution? Production of plant-based biodegradable plastics: a review. *Biochem. J.*, **418**: 219.

Christophe K., Guedenon P., Kelome N., Eodor P., Adechina R. 2011. Evaluation of heavy metals pollution of Nokoue Lake. *African Journal of Environmental Science and Technology*, **5** (3): 255.

Dietrich H. N. 2000. Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34. *Extremophiles*, **4**: 77.

Drino A. 2010. Izolacija bakterijskih populacija iz zemljišta zagađenog aromatičnim ugljovodonicima, *Petničke sveske*, **68**: 272.

Felsenstein J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.67. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle

Giller K. E., Witter E., McGrath S. P. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial process in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.*, **30**: 1389.

Gehong W., Lianmei F., Wenfei Z., Yunyun F., Jianfu Y., Ming T. 2008. Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWR33-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China. *Journal of Hazardous Materials*, **162**: 50.

Heiko A. S., Korbinian S., Arndt von H. 1996. Quartet puzzling: A quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.*, **13**: 964.

Iftikhar A., Akira Y., Atsushi Y., Toru F. 2007. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**: 1117.

Joerg G. 1999a. Symbiosis of *Aeromonas veronii*, *Biovar sobria* and *Hirudo medicinalis*, the medicinal leech: a novel model for digestive tract associations. *Infection and immunity*, **67**: 1.

Joerg G. 1999b. Diverse restriction fragment length polymorphism patterns of the PCR-amplified 16S rRNA genes in *Aeromonas veronii* strains and possible misidentification of *Aeromonas* species. *Journal of clinical microbiology*, **37**: 3194.

Le-Ni S., Yan-Feng Z., Lin-Yan H., Zhao-Jin C., Qing-Ya W., Meng Q., Xia-Fang S., 2009., Genetic diversity and characterization of heavy

metal – resistant –endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. *Bioresource Technology*, **101**: 501.

Lucia C. L., Juan A. A., Jenny D. 2011. *Lysinibacillus sphaericus* S-layer protein toxicity against *Culex quinquefasciatus*. *Biotechnol. Lett.*, **33**: 2037.

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*, P: 795.

Maria X. L., Anastasios I. Z., Thodoris D. K., Kostas A. M. 2004. Equilibrium and kinetic modeling of chromium(VI) biosorption by *Aeromonas caviae*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **242**: 93.

Pertsemlidis A., Fondon III J. W. 2011. Tutorial: HavFing a BLAST with bioinformatics. *Genome Biology*, **2** (10): reviews 2002.1–2002.10.

Rajesh K. S., Gill G., Brent M. P. 2001. Assessment of lead toxicity to *Desulfoibrio sulfuricans* G20: influence of components of Lactate C medium. *Advances in Environmental Research*, **5**: 269.

Saavedra M. J., Figueras M. J., Martínez-Murcia A. J. 2006. Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**: 2481.

Badelt-Lichtblau H., Kainz B., Völlenkle V., Egelseer E-M., Sleytr U. B., Pum D., Ilk N. 2009. Genetic Engineering of the S-layer protein SbpA of *Lysinibacillus sphaericus* CCM 2177 for the generation of functionalized nanoarrays. *Bioconjugate Chemistry*, **20**: 895.

Shungang W., Guiying L., Taicheng A., Bin G., Lei S., Lei Z., Ailing R. 2010. Biodegradation of ethanethiol in aqueous medium by a new *Lysinibacillus sphaericus* strain RG-1 isolated from activated sludge. *Biodegradation*, **21**: 1057.

Zheng Z., Scott S., Lukas W., Webb M. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.*, **7**: 203

Zouboulis A. I., Loukidou M. X., Matis K. A. 2002. Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. *Process Biochemistry*, **39**: 909.

Zwart G., Crump B. C., Kamst-van Agterveld M. P., Hagen F, Han S-K. 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquatic Microbial Ecology*, **28**: 141.

Božidar Radivojević

Phylogenetic Characterization of Heavy Metal Resistant Bacterial Populations of Pocibrava Lake

The methods which exploit the capabilities of microorganisms to passivize toxic substances or to decrease their toxicity are named bioremediation. Bioremediation of heavy metal ions polluted water is done by passivization of metal ions with bacterial metabolites, by biosorption or bioaccumulation of metal ions in bacterial biomass. In this research two bacterial strains which have shown resistance to Zn²⁺ and two more bacterial strains which have shown resistance to Zn²⁺, Pb²⁺ and Cu²⁺ ions were successfully isolated. By using the combination of PCR and RFLP methods, it has been shown that isolated strains belong to different species.

Sequencing of the parts of the genes for 16S rRNA and bioinformatic analysis have shown that isolated strains belong to species *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii*, *Lysinibacillus sphaericus* and *Lysinibacillus boronitolerans*. Construction of phylogenetic trees, using Neighbor-joining, Maximum parsimony and Quartet puzzling methods confirmed already known data about similarity of examined strains. Further research could include examination of survival mechanisms of bacteria isolated in this research in environments polluted with different types of pollutants and also examination of usability of these bacterial strains in bioremediation of water polluted with copper zinc and lead. More attention should be given to the exploration of bioremediation potential of the other members of *Aeromonas* and *Lysinibacillus* families, on the basis of proven phylogenetic similarity of bacteria isolated and examined in this research.

Prilozi

Sekvence dobijenih bakterijskih profila

D – *Aeromonas caviae*:

CTTGGGGAGGGCTACCATGCAGTCGAGCG
GCAGCGGGAAGTAGCTTGCTACTTTTGCCGG
CGAGCGGCGGAGGGGTGAGTAATGCCTGGG
AATTTGCCAGTCGAGGGGGATAACTGCTGG
AAACGACTGCTAATACCGCATAACGCCCTACG
GGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGC
GATTGGATATCCCCAGGTGGGATTAGCTAGT
TGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGAT
CCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC
ACTGGAAGTACACACGGTCCACACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATG
GGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT
GTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTT
TCAGCGAGGAGGAAAGGTCGGTAGCTAATAT
CTGCTGGCTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAG
CACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATT
ACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGA
TAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACC
TGGGAATTGCATTTAAAAGTCCAGCTAGA
GTCTTGTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAAT
ACCGGTGGCGAACGCGGCCCTTGACAAAG
ACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGAG
CAAACAGATATTAGATACCCCTGGTAGTCCAC
GCCATAAACGATGTCTATTTGGGAGGCTGT
GTCCCTTGAGACGTGTCTTCCAGC

K – *Aeromonas veronii*:

AAACATTAGGTCTACCATGCAGTCGAGCG
GCGCGGGAAGTAGCTTGCTACTTTTGCCGGC
GAGGGGGAGAGGGAGAAATGCCTGGGGAT
CTGCCAGTCGAGGGGGATAACTACTGGAAA
CGGTAGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGG
GAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGAT
TGGATGAACCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGG
TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCC
TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACT
GGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGG
GAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTG
AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCA
GCGAGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTG

CCAGCTGTGACGTTGCTCGCACAAGAAGCAC
CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
GCGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGTAATTACT
GGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGCATAA
GTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGG
GCATTGCATTTGAATACTGTCCATCTAGAGTC
TTGTAGAGGGAGGGTAGAATTCCAGGTGTAG
CGGTGAAATGCTTAGAGATCTGGATGTATAC
CGAGTGGCGACGGCGGGCCCCCTGTACCAAG
ACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGAGGGAG
GCAATCAGGTATTAGATACCCCTGCAGCTCC
ACGCCGTAGACGATGACGATTAGGAGGGCTG
TGTTCTTTGGAGACGTGCGCTCCCTGGAAGCT
TAACGGCGTTAAATTCATACCGGCCCTTGCCG

P – *Lysinibacillus sphaericus*:

CGGTATACCGTTTATCCTGCAGTCGAGCG
GCAGAGGAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAG
CGGCGGAGGGAGAGGAACACGTGGGCAACC
TACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAAC
CGGGGCTAATACCGAATAATCTTTTGTCCCTC
ATGGGACAATACTGAAAGACGGTTTCGGCTG
TCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGC
TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAA
CGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCAC
AATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCG
CGTGAGTGAAGAAGGATTTCCGTTTCGTA
CTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAG
TAAGTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTA
AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGG
AATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGT
TTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTC
AACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGAC
TTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGGAAATCCAA
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAG
GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTATCTGGTC
TGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTC
CACCGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGGT
AGGGGGTCTTCGGCC

R – *Lysinibacillus boronitolerans*:

TGACCGTGCTCTGATCATGCTCTCGGCGA
CTCAAGGAGCTTGCTGTTTTGACGTTAGGGG
GAGGAGAGAAGCCGTGGGCAACGTAAACGA

TAGTTTGGGATAATGCCGGGAAACCGGGCT
AATACCGAATAATCTCTTTTGCTTCATGGTGA
AAGACTGAAAGACGGTTTCGGCTGCCGCTAT
AGGATGGGCCCCGCGCGCATTGGCTAGTTGG
TGAGGTAACGGTTCACCAAGGCGACGATGCG
TAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
GGGACTGATACACGGCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGC
GAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTG
AAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTG
TAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACTGGC
TGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCAGCGGCCGCGTAAT
ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATT
GGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTAA
GTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTACCCGCTG
GAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTG
CAGAAGAAGAAAGTGAATCCAAGTGTAGC
GGTGAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACC
AGCGGCTAAGGCGACTTTCTGTTCTGTAAGT
ACGCTGAGGCGGAACAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATGTATATACCCCGATAGTCCACGC
CGTAACACCATGAACTGCTTAAGAGTTAGGG
GGTCTTCCGCCCTTAGTGCTGCCCCCTA

Sekvence preuzete iz GeneBank baze
podataka

Escherichia coli:

ACGAGTGGCGACGGGTGAGTAATGTCT
GGGAAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTAC
TGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCG
CAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCT
TGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCT
AGTAGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGAC
GATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGC
CACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACA
ATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCG
TGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTA
CTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAA
TACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGACAGAAGA
AGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA
TTACTGGGCGTAAAGCGCACGACGGCGGTTT
GTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA
CCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTT
GAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGA

ATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGA
AGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGA
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGC
CCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGT
TAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAA
GGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCCG
ATGCAACGCGAAG

Neisseria sicca:

GCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACATAT
CGGAACGTACCGAGCAGTGGGGGATAACTAA
TCGAAAGATTAGCTAATACCGCATATTTCTTG
AGGAAGAAAGCAGGGGACCATTGGCCTTGC
GCTGTTTGAGCGGCCGATATCTGATTAGCTG
GTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACG
ATCAGTAGCGGTCTGAGAGGATGATCCGCC
ACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAA
TGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGT
GTCTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGGAC
TTTTGTCAGGGAAGAAAAGATAGGGTTAAT
ACCCCTGTCTGATGACGGTACCTGAAGAATA
AGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGTAGGGTGGCAGCGTTAATCGGAA
TTACTGGGCGTAAAGCGGGCGCAGACGGTTA
CTTAAGCAGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA
CCCCGGAAGTGCCTTCTGAACTGGGTGACTA
GAGTGTGTCAGAGGGAGGTAGAATTCCACGT
GTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGA
ATACCGATGGCGAAGGCAGCCTCCTGGGATA
GCACTGACGTTTCATGCCGAAAGCGTGGGTA
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCCTAAACGATGTCGATTAGCTGTTGGGCA
GCTTGACTGCTTAGTAGCGAAGCTAACGCGT
GAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAA
GATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC
GCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCCG
ATGCAACGCGAAG

Pseudomonas fluorescens:

GAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAAAGCCT
AGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTT
CGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCT
ACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTG
CGCTATCAGATGAGCCCAGGTTCGGATTAGCT
AGTTGGTGAGGTAGTGGCTACCAAGGCGAC

GATCCGTA ACTGGTCTGAGAGGATGATCAGT
CACACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA
ATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG
TGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCA
CTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAA
TACGTTAGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATA
AGCACC GGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA
TTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGTTT
GTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA
CCTGGGA ACTGCATTAAAACTGACTGACTA
GAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGA
ACACCAGTGGCGAAGGGCACCACCTGGACTA
ATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGA
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTA AACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAG
CCTTGAGCTCTTAGTGGCGAGCTAACGCATT
AAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GTTAAA ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
AGCAACGCGAAG

Vibrio cholerae:

GCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCT
GGGAAATTGCCCGGTAGAGGGGGATAACCAT
TGGA AACGATGGCTAATACCGCATAACCTCG
CAAGAGCAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTG
CGCTACCGGATATGCCAGGTGGGATTAGCT
AGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGGCAG
GATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC
CACACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACA
ATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCG
TGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTA
CTTTCAGTAGGGAGGAAGGTGTNCGTGTTAA
TAGCACGTACAATTGACGTTACCTACAGAAG
AAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTT
TGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTTA
ACCTGGGAACTGCATCCAAGACTGGCAAGCT
AGAGTCTCGTAGAGGGAGGTAGAATTCAGG
TG TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGG
AATACCGGTGGCGAAGGGCGCCTCCTGGACG
AAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTG
CCCTTGAGGCGTGGCTTCCGAAGCTAACGCG
TTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA
AGGTTAAA ACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
CGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC
GATGCAACGCGAAG

GAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGA
ATACCGGTGGCGAAGGGCGCCCCCTGGACAG
ATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGA
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTA AACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGC
CCTAGAGTCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGT
TAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAA
GATTA AAACTCAAATGAATTGACGGGGGNCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
ANCAACGCGAAG

Edwardsiella tarda:

ACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCT
GGGGATCTGCCTGATGGAGGGGGATAACTAC
TGGA AACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCG
CAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCA
TGCCATCAGATGAACCCAGATGGGATTAGCT
AGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGGCAG
GATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGC
CACACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACA
ATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCG
TGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTA
CTTTCAGTAGGGAGGAAGGTGTNCGTGTTAA
TAGCACGTACAATTGACGTTACCTACAGAAG
AAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTT
TGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTTA
ACCTGGGAACTGCATCCAAGACTGGCAAGCT
AGAGTCTCGTAGAGGGAGGTAGAATTCAGG
TG TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGG
AATACCGGTGGCGAAGGGCGCCTCCTGGACG
AAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTG
CCCTTGAGGCGTGGCTTCCGAAGCTAACGCG
TTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA
AGGTTAAA ACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
CGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC
GATGCAACGCGAAG

