

Перечень

информации о генно-инженерных организмах, относящихся к прочим организмам, отличным от высших растений, а также о мерах по предупреждению возможных вредных воздействий генно-инженерного организма на здоровье человека и окружающую среду

Заявитель:

Закрытое акционерное общество «Белорусская национальная биотехнологическая корпорация» (ЗАО «БНБК»)
222860, Минская область, Пуховичский район, Дукорский с/с, 27
тел./факс: 8(017) 555-40-61 (51)
E-mail: info@bnbc.by

Генно-инженерный организм: штамм-продуцент триптофана *Escherichia coli* JUTR1801

Производитель штамма: Цзяннаньский университет (Jiangnan University), г. Уси, Китайская Народная Республика

1. Биологические особенности донорного и реципиентного организмов:

1.1. полное название:

Реципиентный организм (родительский штамм)

Домен: Бактерии (*Bacteria*)

Отдел: *Proteobacteria*

Класс: *Gammaproteobacteria*

Порядок: *Enterobacteriales*

Семейство: *Enterobacteriaceae*

Род: *Escherichia*

Вид: *Escherichia coli*

Штамм: *Escherichia coli* W3110 (производный от типового штамма *Escherichia coli* K-12). Штамм является непатогенным и широко используется для получения генно-инженерных штаммов – продуцентов биологически активных соединений. Геном реципиентного штамма депонирован в ГенБанке (номер доступа AP009048.1)

Донорный организм

Вид: *Escherichia coli*

Штамм: *Escherichia coli* W3110

1.2. степень родства между донорным и реципиентным организмами, информация о возможности обмена генетического материала между ними естественным путем:

донорный и реципиентный организмы являются одним и тем же организмом. Перестройки генома бактерий *Escherichia coli* являются частым явлением и зафиксированы в многочисленных вариантах (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/prokaryotes/167/>).

1.3. методы идентификации донорного и реципиентного организмов (фенотипические и генетические маркеры):

Идентификация бактерий *Escherichia coli* возможна с помощью физиолого-биохимических или молекулярно-биологических методов и детально изложена в руководстве Берджи по систематике архей и бактерий:

Scheutz, F. and Strockbine, N.A. (2015). *Escherichia*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (eds M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman). <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01147>

1.4. методики, применяемые в лаборатории или природной среде для обнаружения, мониторинга, оценки количества донорного и реципиентного организмов, чувствительность, надежность и специфичность методики обнаружения и идентификации донорного и реципиентного организмов:

обнаружение, мониторинг и оценка количества бактерий *Escherichia coli* возможны только в лаборатории; для этого используют те же методы, что и при идентификации микроорганизмов. В Республике Беларусь действует ряд стандартов, которые регламентируют процедуру анализа кишечной палочки в различных биотопах:

- СТБ ISO 9308-1-2016. Качество воды. Подсчет количества кишечных палочек *Escherichia coli* и колиформных бактерий;

- ГОСТ 30726-2001. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Escherichia coli*;

и др.

([\)](https://tnpa.by/#!/SimpleSearch/search_value=Escherichia/tab=/page=/status=/state=/num_of_records=)

1.5. описание географического распространения и естественных мест обитания донорного и реципиентного организмов, включая информацию о естественных хищниках, жертвах, паразитах, конкурентах, симбионтах и хозяевах:

Бактерии *Escherichia coli* обитают в нижнем отделе кишечника теплокровных животных и являются частью нормальной микробиоты. *E. coli* попадают в окружающую среду с фекалиями и могут быть найдены в пищевых продуктах, предметах окружающей среды или воде при фекальном загрязнении. Бактерии *E. coli* легко выращиваются в лабораторных условиях и легко поддаются генетическим манипуляциям, что делает их одним из наиболее используемых модельных прокариотических организмов.

Паразитами бактерий *Escherichia coli* являются бактериофаги (колифаги), большинство из которых хорошо изучены. В настоящее время по данным Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) описано более 270 видов фагов, первоначально выделенных из *Escherichia* sp.

1.6. потенциальная возможность переноса и обмена генетической информацией с другими организмами:

Существует на уровне естественных процессов генетического обмена между микроорганизмами.

1.7. генетическая стабильность донорного и реципиентного организмов и факторы, влияющие на нее:

Перестройки генома и мутации, связанные с активностью транспозонов, очень распространены у бактерий *E. coli* K-12.

1. Kitamura K, Torii Y, Matsuoka C, Yamamoto K. DNA sequence changes in mutations in the tonB gene on the chromosome of *Escherichia coli* K12: insertion elements dominate the spontaneous spectra. *Jpn J Genet.* 1995 Feb;70(1):35-46. doi: 10.1266/jjg.70.35.

2. Gaffé J, McKenzie C, Maharjan RP, Coursange E, Ferenci T, Schneider D. Insertion sequence-driven evolution of *Escherichia coli* in chemostats. *J Mol Evol.* 2011 Apr;72(4):398-412. doi: 10.1007/s00239-011-9439-2.

Факторами, влияющими на генетическую стабильность бактерий, являются физические воздействия (радиоактивное, ионизирующее, УФ-излучения, ультразвук, экстремальная температура) или химические вещества (мутагены), а также некоторые биологические объекты (мобильные генетические элементы, вирусы).

1.8. патогенные, экологические и физиологические особенности донорного и реципиентного организмов:

Escherichia coli – это грамотрицательные палочковидные бактерии размером несколько микрон в длину и 0,5 мкм в ширину. Данные бактерии являются факультативными анаэробами, что обусловлено их основной экологической нишей обитания – кишечником теплокровных животных. Температурные диапазоны роста обычно находятся между 21°C и 37°C. *E. coli* нейтрофильны и растут в диапазоне pH от 5,0 до 9,0.

Клетки штамма *E. coli* K-12 являются ослабленными, в норме данные бактерии не способны колонизировать кишечник человека. Также было показано, что они плохо выживают в окружающей среде, и не оказывают вредного воздействия на другие микроорганизмы или растения. Поскольку *E. coli* K-12 широко используются в качестве модельного организма в исследованиях в области генетики и физиологии бактерий, а также в промышленных целях, они являются одним из наиболее широко изученных микроорганизмов с подтвержденной безопасностью (<https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-09/documents/fra004.pdf>).

период генерации в естественных экосистемах, половой и бесполой репродуктивный цикл:

Бактерии размножаются посредством бинарного деления – формы бесполого размножения. В идеальных лабораторных условиях клетки штамма *E. coli* K-12 способны делиться каждые 20 минут. В природных условиях на это уходит около 15 часов (Gibson B, Wilson DJ, Feil E, Eyre-

Walker A. The distribution of bacterial doubling times in the wild. Proc Biol Sci. 2018;285(1880):20180789. doi:10.1098/rspb.2018.0789).

информация о выживаемости в окружающей среде, включая сезонность и способность образовывать структуры, необходимые для выживания (споры, склероции и другое):

В окружающей среде (вне стерильных лабораторных условий) клетки *E. coli* K-12 выживают не дольше 30 дней, т.к. не способны конкурировать с местной микробиотой.

(van Elsas JD, Semenov AV, Costa R, Trevors JT. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects [published correction appears in ISME J. 2011 Feb;5(2):367]. ISME J. 2011;5(2):173-183. doi:10.1038/ismej.2010.80)

(Søren Johannes Sørensen, Survival of *Escherichia coli* K12 in seawater, FEMS Microbiology Letters, Volume 85, Issue 2, April 1991, Pages 161–167, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04708.x-i1>)

(Bogosian G, Sammons LE, Morris PJ, O'Neil JP, Heitkamp MA, Weber DB. Death of the *Escherichia coli* K-12 strain W3110 in soil and water. Appl Environ Microbiol. 1996;62(11):4114-4120. doi:10.1128/aem.62.11.4114-4120.1996)

Бактерии *E. coli* не образуют споры, однако могут переходить в жизнеспособное, но некультивируемое состояние (VBNC). Такие изменённые клетки способны дольше персистировать в окружающей среде (Na, S.H., Miyanaga, K., Unno, H. et al. The survival response of *Escherichia coli* K12 in a natural environment. Appl Microbiol Biotechnol 72, 386–392 (2006). <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0268-3>).

патогенность (инфекционная способность, токсиногенность, вирулентность, аллергенность, наличие векторов для переноса патогенов, возможные вектора, круг хозяев, возможная активация латентных вирусов (провирусов), способность колонизировать другие организмы):

Реципиентный штамм является непатогенным. Бактерии *E. coli* K-12 относятся к 1 группе риска (патогенности) по классификации Всемирной организации здравоохранения, т.к. не они не обладают полным комплексом липополисахаридов (т.е. не содержат О-антигена), не содержат активных факторов вирулентности (например, токсинов) или факторов колонизации и генов, кодирующих эти факторы.

устойчивость к антибиотикам, возможное использование этих антибиотиков для профилактики и терапии у людей и домашних животных:

Информация о подавляющих рост бактерий *Escherichia coli* W3110 минимальных концентрациях антибиотиков приведена в таблице.

антибиотик или противобактериальное лекарственное средство	минимальная ингибирующая концентрация (мкг/мл)
ампициллин	12,5

хлорамфеникол	6,25
флорфеникол	6,25
клотримазол	>32
пурамицин	100
эритромицин	50
метотрексат	>640
новобиоцин	100
ципрофлоксацин	0,01
норфлоксацин	0,004
налидиксовая кислота	3,125
рифампицин	5
фузидиевая кислота	400
стрептомицин	1,95
сульфацетамид	2000
тетрациклин	1,25

(По данным Sulavik MC, Houseweart C, Cramer C, et al. Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(4):1126-1136. doi:10.1128/AAC.45.4.1126-1136.2001)

природа врожденных векторов (структура, частота мобилизации, специфичность, наличие генов устойчивости):
отсутствуют.

2. Биологические особенности вектора:

2.1. природа и происхождение вектора, естественная среда обитания и соответствующие характеристики безопасности:

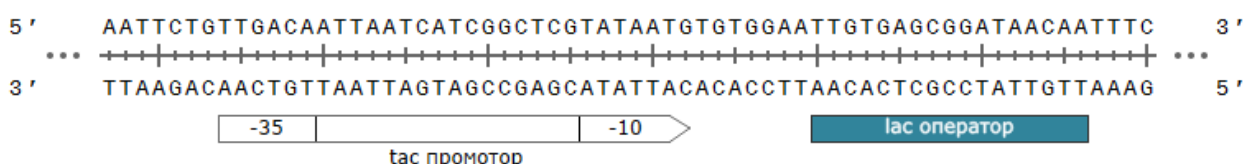
плазмида pBR322 создана в 1977 г. с помощью методов генной инженерии на основе природного репликона плазмиды ColE1. pBR322 состоит из 4361 пары нуклеотидов и имеет два гена устойчивости к антибиотикам – ген *bla*, кодирующий β-лактамазу, и ген *tetA*, кодирующий металл-тетрациклин / H⁺ антипортер. Ни один из этих генов не входит в состав транспозона и не может быть перенесен *in vivo* в другую плазмиду. pBR322 имеет уникальные сайты рестрикции для более чем сорока рестрикционных ферментов. Плазмида pBR322 на протяжении 1980-1990х годов являлась стандартным вектором и использовалась в подавляющем большинстве генно-инженерных работ. С тех пор было сконструировано большое количество других плазмид на основе pBR322, специально разработанных для самых разных целей. Аннотированная последовательность нуклеотидов pBR322 доступна по адресу <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/208958>.

2.2. структура транспозонов, промоторов и других некодирующих генетических сегментов, использованных для создания генетической конструкции, необходимых для ее переноса и функционирования в реципиентном организме:

Для увеличения экспрессии перенесённых генов использовался «сильный» *tac* промотор *E. coli*; гибрид между промоторами *trp* и *lac UV5*

(de Boer HA, Comstock LJ, Vasser M. The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(1):21-25. doi:10.1073/pnas.80.1.21). Векторы, несущие *tac*-промотор, при использовании изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид в качестве индуктора обеспечивают уровни экспрессии целевого белка, превышающие 10 мг/л культуры. В качестве оператора использовалась нативная последовательность из лактозного оперона *E. coli*.

Структура итоговой регуляторной кассеты:



2.3. частота мобилизации (способность приобретения мобильности) встроенного вектора или переноса в другие организмы:

плазмида pBR322 не является мобилизуемым вектором. Но из-за наличия *bom*-последовательности (основы мобильности) в её составе, частота передачи может составлять от 8×10^{-1} до $1,6 \times 10^{-4}$ при наличии дополнительной конъюгативной плазмиды (Finnegan, J., Sherratt, D. Plasmid ColE1 conjugal mobility: The nature of bom, a region required in cis for transfer. *Molec. Gen. Genet.* 185, 344–351 (1982). <https://doi.org/10.1007/BF00330810>).

2.4. факторы, которые могут влиять на способность вектора адаптироваться в других организмах-хозяевах:

Распространение плазмид на основе ColE1 репликона ограничено бактериями семейства *Enterobacteriaceae*. Но при встраивании мобильных генетических элементов или гомологичной рекомбинации плазмиды могут расширить круг хозяев из-за приобретения дополнительных генетических детерминант (Kok M, Rekik M, Witholt B, Harayama S. Conversion of pBR322-based plasmids into broad-host-range vectors by using the Tn3 transposition mechanism. *J Bacteriol.* 1994;176(21):6566-6571. doi:10.1128/jb.176.21.6566-6571.1994).

3. Характеристика генно-инженерного организма:

3.1. информация, относящаяся к генно-инженерной модификации:

методы, использованные при создании, переносе трансгенной конструкции и отборе трансгенных организмов:

Для создания генно-инженерного вектора на основе плазмиды pBR322, были использованы методы амплификации целевых фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции и рестриктазно-лигазные методы создания рекомбинантных молекул ДНК.

Для внесения генетической информации в реципиентный микроорганизм использовался метод трансформации родительского штамма генно-инженерной плазмидой. Отбор трансгенных бактерий на первом этапе

осуществлялся на основании способности расти на питательных средах с тетрациклином, затем наличие целевой плазмиды подтверждали с помощью метода секвенирования ДНК.

описание встроенного в геном реципиентного организма фрагмента ДНК, включая регуляторные и другие элементы, влияющие на функционирование трансгенов:

С помощью генно-инженерной плазмиды увеличено количество копий ряда генов прародительского штамма:

- *trpE* (кодирует компонент I антранилатсинтазы);
- *trpD* (кодирует антранилатфосфорибозилтрансферазу);
- *trpCF* (кодирует фосфорибозилантранилат-изомеразу);
- *trpB* (кодирует бета-субъединицу триптофансинтазы);
- *trpA* (кодирует альфа-субъединицу триптофансинтазы)

(перечисленные гены организованы в оперон *trpEDCFBA* под контролем тас-промотора);

- *aroG* (кодирует 3-дезоксид-7-фосфогептулонатсинтазу);
- *serA* (кодирует фосфоглицератдегидрогеназу)

(перечисленные гены организованы в оперон *aroG-serA* под контролем тас-промотора);

- *lacI* (кодирует репрессор лактозного оперона под контролем *lac*-промотора).

Добавлен ген из плазмиды pSC101, продукт которого сообщает трансгенному микроорганизму способность расти на средах с добавлением антибиотика тетрациклина:

- *tetA* (кодирует металл-тетрациклин / H⁺ антипортер под контролем *tet*-промотора).

структура (сиквенс) и функциональное соответствие встроенного фрагмента ДНК, присутствие в нем известных потенциально опасных последовательностей:

потенциально опасные последовательности отсутствуют.

Последовательность нуклеотидов встроенного фрагмента ДНК:

```
1 CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAACT CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT STTCACSTAG
81 ATCCTTTTCC GGAATTAATT CGAGCTCGGT ACCCCATTТА CGTTGACACC ATCGAATGGC GCAAAAACCTT TCGCGGTATG
161 GCATGATAGC GCCCGGAAGA GAGTCAATTC AGGGTGGTGA ATGTGAAACC AGTAACGTTA TACGATGTCG CAGAGTATGC
241 CGGTGTCTCT TATCAGACCG TTTCCCGCGT GGTGAACCAG GCCAGCCACG TTTCTGCGAA AACGCGGGAA AAAGTGGAAAG
321 CGGCGATGGC GGAGCTGAAT TACATTCCCA ACCGCGTGGC ACAACAAC TGCGGGCAAA AGTCGTTGCT GATTGGCGTT
401 GCCACSTCCA GTCTGGCCCT GCACGCGCCG TCGCAAAATG TCGCGGGCAT TAAATCTCGC GCCGATCAAC TGGGTGCCAG
481 CGTGGTGGTG TCGATGGTAG AACGAAGCGG CGTCGAAGCC TGTAAGCGG CGGTGCACAA TCTTCTCGCG SAACGCGTCA
561 GTGGGCTGAT CATTAACSTAT CCGCTGGATG ACCAGGATGC CATTGCTGTG GAAGCTGCCT GCACTAATGT TCCGGCGTTA
641 TTTCTTGATG TCTCTGACCA GACACCCATC AACAGTATTA TTTCTCCCA TGAAGACGGT ACGCGACTGG CCGTGGAGCA
721 TCTGGTCGCA TTGGGTCACC AGCAAATCGC GCTGTAGCG GGCCCATTA GTTCTGTCTC GCGCGCTGTG CGTCTGGCTG
801 GCTGGCATAA ATATCTCACT CGCAATCAAA TTCAGCCGAT AGCGGAACGG GAAGGCGACT GGAGTGCCAT GTCCGGTTTT
881 CAACAACCCA TGCAAAATGCT GAATGAGGGC ATCGTTCCCA CTGCGATGCT GGTTGCCAAC GATCAGATGG CGCTGGGCGC
961 AATGCGCGCC ATTACCGAGT CCGGGCTGCG CGTTGGTGGC GATATCTCGG TAGTGGGATA CGACGATACC GAAGACAGCT
1041 CATTTATATAT CCCGCCGTTA ACCACCATCA AACAGGATTT TCGCCTGTG ATATACGCGG GGGCAAAACA GCGTGGACCG CTTGCTGCAA
1121 CTCTCTCAGG GCCAGGCGGT GAAGGGCAAT CAGCTGTTGC CCGTCTCACT GGTGAAAAGA AAAACCAACC TGGCGATAAG
1201 CTCTAAGAAA CCATTATTAT CATGACATTA ACCTATAAAA ATAGGCGTAT CACGAGGCCC TTTCGTCTTC AAGAATTCTG
1281 TTGACAATTA ATCATCGGCT CGTATAATGT GTGGAATTGT GAGCGGATAA CAAATTTACA CAGGAACACG STATGACCAT
1361 GATTACGGAT TCACSTGGAAT TCCTTGTTGA TCGCGCTTTG ATATACGCGG AGATCATGAA CAAAAATAGA GAATAACAAT
1441 GCAAACACAA AAACCGACTC TCGAACTACT AACCTGCGAA GCGGCTTATC GCGACAACCC GACCGCGCTT TTTCACCACT
1521 TGTGTGGGGA TCGTCCGGCA ACGCTGCTGC TGGAAATCCG AGATATCGAC AGCAAAAGAT ATTTAAAAAG CCTGCTACTG
1601 GTAGACAGTG CGCTGCGCAT TACAGCATTA GGTGACACTG TCACAATTA GGCCTTATCC GGCAATGGTG AAGCCCTGCT
1681 GGCACSTACT GATAACGCCC TGCTGCGGGG TGTGGAAAAA GAACAATCAC CAAACTGCCC TGTGCTGCGC TTCCCCCCTG
```

1761	TCAGTCCACT	GCTGGATGAA	GACGCTCGCT	TATGCTCCCT	TTCCGTTTTT	GACGCTTTCC	GTTTATTGCA	GAATCTGTTG
1841	AATGTACCGA	AGGAAGAACG	AGAAGCCATG	TTCTTCGGGG	GCCTGTTCTC	TTATGACCTT	GTGGCGGGAT	TTGAAGATTT
1921	ACCGCAACTG	TCAGCGGAAA	ATAACTGCCC	TGATTTCTGT	TTTTATCTCG	CTGAAACGCT	GATGGTGATT	GACCATCAGA
2001	AAAAAAGCAC	CCGTATTTCAG	GCCAGCCTGT	TTGCTCCGAA	TGAAGAAGAA	AAACAACGTC	TCAGTGTCTG	CCTGAACGAA
2081	CTACGTGAGC	AACTGACCAG	AGCCGCGCCG	CCGCTGCCAG	TGGTTTCCGT	GCCGCATATG	CGTTGTGAAT	GTAATCAGAG
2161	CGATGAAGAG	TTCCGTGGCG	TAGTGCCTTT	TTGCAAAAAA	TAGATTCCGC	CTGGAGAAAT	TTTCCAGGTG	GTGCCATCTC
2241	GCCGTTTCTC	TCTGCCCTGC	CCGTACCCGC	TGGCGGCCTA	TTACGTGCTG	AAAAAGAGTA	ATCCCAGCCC	GTACATGTTT
2321	TTTATGCAAG	ATAATGATTT	CACCTATTTT	GGCGCGTCGC	CGGAAAGCTC	GCTCAAGTAT	GATGCCACCA	GCCGCCAGAT
2401	TGAGATCTAC	CCGATTGCCG	GAACACGCCC	ACGCGGTCTG	CGCGCCGATG	GTTCACTGGA	CAGAGATCTC	GACAGCCGTA
2481	TTGAACCTGA	AATGCGTACC	GATCATAAAG	AGTGTCTCGA	ACATCTGATG	CTGGTTGATC	TCGCCCGTAA	TGATCTGGCA
2561	CGCATTTGCA	CCCCCGGCAG	CCGTACGTC	GCCGATCTCA	CCAAAGTTGA	CCGTTATTCC	TATGTGATGC	ACCTCGTCTC
2641	TCGCGTAGTC	GGCGAACTGC	GTCACGATCT	TGACGCCCTG	CACGCTTATC	GCGCCTGTAT	GAATATGGGG	ACGTTAAGCG
2721	GTGCGCCGAA	AGTACGCGCT	ATGCAGTTAA	TTCGCCGAGG	GGAAGGTCGT	CGCCGCGGCA	GCTACGCGCG	CGCGGTAGGT
2801	TTGTAACCGA	CCCATGGCGA	TCTCGACACT	TACGTTGTA	TCGCTTCGGC	GCTGGTGAA	AACGGTATCG	GTCACCTGCA
2881	AGCGGGTGCT	GGTGTAGTCC	TTGATTCTGT	TCCGCACTCG	GAAGCCGACG	AAACCCGTAA	CAAAGCCCGC	GCTGTACTGC
2961	GCGCTATTGC	CACCGCGCAT	CATGCACAGG	AGACTTTCTG	ATGGCTGACA	TTCTGCTGCT	CGATAATATC	GACTCTTTTA
3041	CGTACAACCT	GGCAGATCAG	TTGCGCAGCA	ATGGGCATAA	CGTGGTGATT	TACCGCAACC	ATATTCCGGC	CGAAACCTTA
3121	ATTGAACGGA	TGGCGACCAT	GAGCAATCCG	GTGCTCATCC	TTTCTCCTGG	CCCGCGGTG	CCGAGCGAAG	GCGGCTGTAT
3201	GCCGGAATCT	CTCACCCGCT	TGCGTGGA	GCTGCCCAT	ATTGGCATT	GCCTCGGACA	TCAGGCGATT	GTCGAAGCTT
3281	ACGGGGGCTA	TGTCGGTCAG	GCGGGCGAAA	TTCTCCACGG	TAAAGCCTCC	AGCATTGAAC	ATGACGTTCA	GGCGATGTTT
3361	GCCGGATTAA	CAAAACCCGCT	GCCGGTGCGG	CGTTATCACT	CGTGGTTGG	CAGTAACATT	CCGGCCGGTT	TAACCATCAA
3441	CGCCCATTTT	AATGGCATGG	TGATGGCAGT	GATGTCAGAT	CCGATTCGCG	TTTGTGGATT	CCAGTTCCAT	CCGGAATCCA
3521	TTCTCACCAC	CCAGGGCGCT	CGCCTGCTGG	AACAAACGCT	GGCCTGGGCG	CAGCAGAAAC	TAGAGCCAGC	CAACACGCTG
3601	CAACCGATTG	TGGAAAAACT	GTATCAGGCG	CAGACGCTTA	GCCAACAAGA	AAGCCACCAG	CTGTTTTTCA	CGGTGGTGCG
3681	TGGCGAGCTG	AAGCCGGAAC	AACTGGCGGC	GGCGCTGGTG	AGCATGAAAA	TTGCGCGTGA	GCACCCGAAC	GAGATCGCCG
3761	GGGAGCAAC	CGCGCTACTG	GAACACGCG	CGCCCTTCCC	GCGCCCGGAT	TATCTGTTTG	CTGATATCGT	GGTACTGGC
3841	GGTGACGGCA	GCAACAGTAT	CAATATTTCT	ACCCGCTAGC	CGTTTGTGCG	CGCGGCTGTG	GAGATGAAAG	TGGCGAAACA
3921	CGGCAACCGT	AGCGTCTCCA	GTAAATCTGG	TTCTGTCGAT	CTGCTGGCGG	CGTTCGGTAT	TAATCTTGAT	ATGAACGCCG
4001	ATAAATCGCG	CCAGGCGCTG	GATGAGTTAG	GTGTATGTTT	CCTCTTTGCG	CCGAAGTATC	ACACCGGATT	CCGCCACGCG
4081	ATGCCGGTTC	GCCAGCAACT	GAACACCCGC	ACCCTGTTCA	ATGTGCTGGG	GCCATTGATT	AACCCGCGCG	ATCCGCCGCT
4161	GGCGTTAATT	GGTGTTTATA	TGCGGAAC	GGTGTGCGG	TTCTGCGGAA	CCTTGCCTGT	CTGCGGATAT	CAACGCGCGG
4241	CGGTGGTGCA	CAGCGGCGGG	ATGGATGAAG	TTTCAATTACA	CGCGCCGACA	ATCGTTGCGG	AACTGCATGA	CGGCGAAATT
4321	AAAAGCTATC	AGCTCACC	AGAAGACTTT	GGCTGACAC	CCTACCACCA	GGAGCAACTG	GCAGGCGGAA	CACCGGAAGA
4401	AAACCGTGAC	ATTTTAACAC	GTTTGTTACA	AGGTAAAGGC	GACGCGCGCC	ATGAAGCAGC	CGTCTGCTGC	AAGCTCGCCA
4481	TTGTTAATCG	CCTGATGGC	CTGCAAGATC	TGCAAGCCAA	TGCGCAAAAC	GTCTTTGAGG	TTCTGCGCAG	TAGGTTCCGCT
4561	TACGACAGAG	TCACCGCACT	GGCGGCACGA	GGGTAAATGA	TGCAAAACCGT	TTTAGCGAAA	ATCGTCGCG	ACAAGGCGAT
4641	TTGGGTAGAA	GCCCGCAAAAC	AGCAGCAACC	GCTGGCCAGT	TTTCAGAAATG	AGGTTACAGC	GAGCACGCGA	CATTTTTATG
4721	ATGCGCTACA	GGGTGCGCGC	ACGGCGTTTA	TTCTGGAGTG	CAAGAAGCG	TCGCGGTCAA	AAGGCGTGAT	CCGTGATGAT
4801	TTTCGATTCAG	CACGCAATTC	CGCATTTTAT	CTTCTGATAC	CTTCGGCAAT	TTGCGGTGCTG	TTGCGGTGCTG	AATATTTTCA
4881	GGGAGCTTTT	AATTTCTCTC	CCATCGTCAG	CCAAATCGCC	CCGCAGCCGA	TTTTATGTAA	AGACTTCATT	ATCGACCCCT
4961	ACCAGATCTA	TCTGGCGCGC	TATTACCAGG	CCGATGCCTG	CCTTATTAATG	CCTTCAGTAC	TGGATGACGA	CCAATATCGC
5041	CAGCTTGCCG	CCGTGCTCA	CAGTCTGGAG	ATGGGCGTGC	TGACCGAAGT	CAGTAATGAA	GAGGAACAGG	AGCGGCCCAT
5121	TGCAATGGGA	CCAAAGGTCG	TTGGCATCAA	ATCCGCGCAT	CTCGGTGATT	TGTCGATTGA	TCTCAACCGT	ACCCGCGAGC
5201	TTGCGCCGAA	ACTGGGGCAC	AACGTGACGG	TAATCAGCGA	ATCCGCGATC	AATACTTACG	CTCAGGTGCG	CGAGTTAAGC
5281	CACTTCGCTA	ACGGTTTTCT	GATTGGTTCC	GCGTTGATGG	CCCATGACGA	TTTGCACGCC	GCCGTGCGCC	GGGTGTTGCT
5361	GGGTGAGAA	AAAGTATGTG	GCCTGACGCG	TGGGCAAGAT	GCTAAAGCAG	CCTATGACGC	GGGCGCGATT	TACGGTGGGT
5441	TGATTTTGTG	TGCGACATCA	CCGCGTTGCG	TGCGCTTTGA	ACAGGCGCAG	GAAGTGATGG	GTCGCGCACC	GTGCGGATG
5521	GTTGGCGTGT	TCCGCAATCA	CGATATTGCC	GATGTGGTGG	ACAAAGCTAA	GGTGTTATCG	CTGGCGCGAG	TGCAACTGCA
5601	TGGTAAATGAA	GAACAGCTGT	ATATCGATAC	GCTGCGTGAA	GCTCTGCCAG	CACATGTTGC	CATCTGGAAA	GCATTAAAGC
5681	TCGGTGAAC	CCTGCCCGCC	CGCGAGTTTC	AGCAGCTTGA	TAAATATGTT	TTAGACAACG	GCCAGGGTGG	AAGCGGGCAA
5761	CGTTTTGACT	GGTCACTATT	AAATGGTCAA	TCCGTTGTTA	AGCTTCTGCT	GCGGGGGGc	TTAGGCGCAG	ATAAGTCGCT
5841	GGAAGCGGCA	CAAACCGGCT	GCGCCGACT	TGATTTTAA	TCTGCTGTAG	AGTCGCAACC	GGGCATCAA	GACGCACGTC
5921	TTTTTGCCCTC	GGTTTTCCAG	ACGTGCGCG	CATATTAAGG	AAAGGAACAA	TGCAACATT	ACTTAACCCC	TATTTTGGTG
6001	AGTTTGGCGG	CATGTACGTG	CCACAAATCC	TGATGCCTGC	TCTGCGCCAG	CTGGAAGAAG	CTTTTGTCA	TGCGCAAAAA
6081	GATCTTGAAT	TTCAAGCTCA	TTTCAACGAC	CTGCTGAAAA	ACTATGCCCG	GCGTCCAAAC	GCGCTGACCA	AATGCCAGAA
6161	CATTACAGCC	GGGACGAACA	CCACGCTGTA	TCTCAAGCGT	GAAGATTGTC	TGCACGGCGG	CGCGCATAAA	ACTAACCAGG
6241	TGCTGGGGCA	GGCGTTGCTG	GCGAAGCGGA	TGGGTAAAC	CGAAATCATC	GCCGAAACCG	GTGCCGTC	GCATGGCGTG
6321	GCGTCGGCCC	TTGCCAGCGC	CCTGCTCGCG	TGAAATGTC	GTATTTATAT	GGGTGCCAAA	GACGTTGAAC	GCCAGTCGCC
6401	TAACCTTTTT	CGTATGCGCT	TAATGGGTGC	GGAAGTGATC	CCGGTGCTAT	GCGGTTCCCG	GACGCTGAAA	GATGCGTGTA
6481	ACGAGGCGCT	GCGCGACTGG	TCCGGTAGTT	ACGAAACCGC	GCACTATATG	CTGGGCACCG	CAGCTGGCCC	GCATCCTTAT
6561	CCGACCATTT	TGCGTGAGTT	TCAGCGGATG	ATTGGCGAAG	AAACCAAGC	GCAGATTCTG	GAAAGAGAAG	GTCGCCTGCC
6641	GGATGCCGTT	ATCGCCTGTG	TTGGCGGCGG	TTCAATGCC	ATCGGCATGT	TTGCTGATT	CATCAATGAA	ACCAACGTCT
6721	GCTGTATTGG	TGTGGAGCCA	GGTGGTCAAG	GATCTGAAAC	TGGCGAGCAC	GGCGCACCGC	TAAAACATGG	TGCGGTGGGT
6801	ATCTATTTTC	GTATGAAAGC	GCCGATGATG	CAAACCGAAG	ACGGGCAGAT	TGAAGAATCT	TACTCCATCT	CCGCCGGACT
6881	GGATTPTCCC	TCTGTGCGCC	CACAACACGC	GTATCTTAA	AGCACTGGAC	GCGCTGATTA	CGTGTCTATT	ACCGATGATG
6961	AAGCCCTTGA	AGCCTTCAAA	ACGCTGTGCC	TGCACGAAGG	GATCATCCCG	GCGCTGGAAT	CCTCCACGCG	CCTGGCCCAT
7041	GCGTTGAAAA	TGATGCGCGA	AAACCCGGAT	AAAGAGCAGC	TACTGGTGGT	TAACCTTTCC	GTCGCGCGCG	GATGCAACAT
7121	CTTACCGGTT	CACGATATTT	TGAAAGCACG	AGGGGAAATC	TGATGGAACG	CTACGAATCT	CTGTTTGCCC	AGTTGAAGGA
7201	GCGCAAGAA	GGCGATTTCG	TTCTTTTCGT	CACGCTCGGT	GATCCGGGCA	TTGAGCAGTC	ATTGAAAATT	ATCGATACGC
7281	TAATTGAAGC	CGGTGCTGAC	GCGCTGGAGT	TAGGTATCCC	CTTCTCCGAC	CCACTGGCGG	ATGGCCCGAC	GATTCAAAAC
7361	GCCACTCTGC	GCGCCTTTTG	GGCAGGTGTC	ACTCCGCGAC	AATGCTGGCA	AATGCTGGCA	GTTTATCGCC	GATTAACACCC
7441	GACCATTTCC	ATTGGCCTGT	TGATGTATGC	CAATCTGGTG	TTTAAACAAAG	GCATTGATGA	GTTTTATGCC	CAGTGCGAAA
7521	AAGTCGGCGT	CGATTCCGGT	CTGGTTGCGG	ATGTGCCAGT	TGAAGAGTCC	GCGCCCTTCC	GCCAGGCGCG	GTTGCGTCAT
7601	AATGTCGCAC	CTATCTTCAT	CTGCCCGCCA	AATGCCGATG	ACGACCTGCT	GCGCCAGATA	GCCTCTTACG	GTCGCTGGTTA
7681	CACCTATTGT	CTGTCAACGAG	CAGGCGTGAC	CTCCGCGACA	AACCGCGCGG	CGTTACCCCT	CAATCATCTG	GTTGCGAAGC
7761	TGAAAGAGTA	CAACGCTGCA	CCTCCATTGC	AGGGATTGTT	TATTTCCGCC	CCGGATCAGG	TAAAAGCAGC	GATTGATGCA
7841	GGAGCTGCGG	GCGCGATTTT	TGGTTCGGCC	ATTGTTAAAA	TCATCGAGCA	ACATATTAA	GAGCCAGAGA	AAATGCTGGC
7921	GGCACTGAAA	GTTTTTGATC	AACCGATGAA	AGCGGCGACG	CGCAGTTAAT	CCCACAGCCG	CCAGTTCCCG	TGGCGGCGATT
8001	TTAACCTTCT	TTAATGAAGC	CGGAAAAATC	CTAAATTCAT	TTAATATTTA	TCTTTTTACC	GTTTCGCTTA	CCCCGGTCGA

8081	ACGTCAACTT	ACGTCATTTT	TCCGCCCAAC	AGTAATATAA	TCAAACAAAT	TAATCCCSCA	ACATAACACC	AGTAAATCA
8161	ATAATTTTCT	CTAAGTCACT	TATTCCTCAG	GTAATTGTTA	ATATATCCAG	AATGTTCCCTC	AAAATATATT	TTCCCTCTAT
8241	CTTCTCGTTG	CGCTTAATTT	GACTAATTCT	CATTAGCGAC	TAATTTTAAT	GAGTGTGAG	GATCCCCGGG	TACCCGGGGA
8321	TCCTCTAGAA	CTAGGGAATT	CTGTTGACAA	TTAATCATCG	GCTCGTATAA	TGTGTGGAAT	TGTGAGCGGA	TAACAATTTT
8401	ACACAGGAAA	CAGCTATGAC	CATGATTACG	GATTCACCTG	AATTCCTTGT	TGATCGCGCT	TTGATATACG	CCGAGATCTA
8481	AGATAAGTAC	GAGCAACACT	GAACAGACAT	GAAATTCATG	AACGACGATT	TACGCATCAA	AGAAATCAAA	GAGATTCTTC
8561	CTCCTGTGCG	ATTGCTGGAA	AAATTCCTCG	CTACTGAAAA	TGCCGCGAAT	ACGGTTGCCC	ATGCCCGAAA	AGCGATCCAT
8641	AAGATCCTGA	AAGGTAATGA	TGATCGCCTG	TTGTTTGTGA	TTGGCCCATG	CTCAATTCAT	GATCCTGTCG	CGGC AAAAGA
8721	GTATGCCACT	CGCTTGCTGG	CGCTGCGTGA	AGAGCTGAAA	GATGAGCTGG	AAATCGTAAT	GCGCGTCTAT	TTTGAAAAGC
8801	CGCGCGCACT	GGTGGGCTGG	AAAGGGCTGA	TTAAGCATCC	GCCATATGGAT	AATAGCTTCC	AGATCAACGA	CGGTCTGCGT
8881	ATAGCCCGTA	AATTGCTGCT	TGATATTAAC	GACAGCGGTC	TGCCAGCGGC	AGGTGAGTTT	CTCGATATGA	TCACCCACAC
8961	ATATCTCGCT	GACCTGATGA	GCTGGGGCGC	AATTGGCGCA	CGTACCACCG	AATCGCAGGT	GCACCGCGAA	CTGGCATCAG
9041	GGCTTTCTTG	TCCGGTCCGC	TTCAAAAATG	GCACCGACGG	TACGATTAAA	GTGGCTATCG	ATGCCATTAA	TGCCGCGCGT
9121	CGCCCGCACT	GCTTCTGTTT	CGTAACGAAA	TGGGGGCTAT	CGCGGATTGT	GAATACCGCG	GGTAACCGCG	ATTGCCCTAT
9201	CATTCTGCGC	GGCGGTAAAG	AGCCTAACA	CAGCGCGAAG	CACGTTGCTG	AAGTGAAAGA	AGGGCTGAAC	AAAGCAGGCC
9281	TGCCAGCAC	GGTGATGATC	GATTTCAGCC	ATGCTAATCT	GTCCAAACAA	TTCAAAAAGC	AGATGGATGT	TTGTGCTGAC
9361	GTTTGCCAGC	AGATTGCCGG	TGGCGAAAA	GCCATTATTG	GCGTGATGGT	GGAAAGCCAT	CTGGTGGAAG	GCAATCAGAG
9441	CTTCGAGAC	GGGAGCCCG	TGGCTACCG	TAAAGCATCC	ACCGATGCCT	GCATCGGCTG	AGAGATATAC	GATGCTCTGT
9521	TACGTCAACT	GGCGAATGCA	GTA AAAAGCGC	GTCGCGGGTA	AGGTTTAATT	GTCGGATGCG	CCGTGAGAGT	GGCGTATCCG
9601	ATGAATCACC	ACAGGCTGTA	TAAGACGCGC	AGCGTCGCAT	CAGGCAATGT	GCTCCATTGT	TAGCAACAAA	AAAGCCGACT
9681	CACCTGCGAT	CGGCTTTCTC	ATTTTAAACG	AATGACGTTT	ACTTCGCTTT	ACCTCTGGTT	GCAACCGCCG	CTGCTTTCCG
9761	TGCGAATGCT	TCAGCATTAC	CCAGATAATA	CGGTTTCTGC	GTTTGAAT	TCTCGTCGAA	CTCATACACC	AGCGCATACG
9841	CAGTCGGGAT	ATTAAGCTCA	AGAATCCGAC	GCAAAACGTT	ATATTGCCCG	AATATTATT	TTTGATATGT	TGAAAAGCGG
9921	ATGCAAATCC	GCACACAACA	TTTCAAAAAG	CAGGATTGGG	TAAATGGCAA	AGGTATCGCT	GGAGAAAGAC	AAGATTAAAG
10001	TTCTGCTGGT	AGAAGGCGTG	CACCAAAAAG	CGCTGGAAAG	CCTTCGTGCA	GCTGGTTACA	CCAACATCGA	ATTTACAAAA
10081	GGCGCGCTGG	ATGATGAACA	ATTAAAAGAA	TCCATCCGCG	ATGCCCACTT	CATCGGCGTG	CATCCCGGTA	CCCATCTGAC
10161	TGAGAAATGA	ATCAACGCCG	CAGAAAAACT	GCTCGCTATT	GGCTGTTTCT	GTATCGGAAC	AAACAGAGTT	GACTCTGGAT
10241	CGCGCGCAAA	CGCGGGGATC	CCGGTATTTA	ACGCACCGTT	CTCAAAATAC	CGCTCTGTTG	CGGAGCTGGT	GATTGGCGAA
10321	CTGCTGCTGC	TATTGCGCGG	CGTGCCGGAA	GCCAATGCTA	AAGCGCACCG	TGGCGTGTGG	AACAAACTGG	CGCGCGGTTT
10401	TTTTGAAGCG	CGCGGCAAAA	AGCTGGGTAT	CATCGGCTAC	GGTCATATTG	GTACGCAATT	GGGCATTCTG	GCTGAATCGC
10481	TGGGAATGTA	TGTTTACTTT	TATGATATTG	AAAATAAACT	GCCGCTGGGC	AACGCACTC	TACGATACCA	TCTTTCTGAC
10561	CTGCTGAATA	TGAGCGATGT	GGTGAGTCTG	CATGTACCAG	AGAATCCGTC	CACCAAAAAT	ATGATGGGCG	CGAAAGAAAT
10641	TTCACTAATG	AAGCCCGGCT	CGCTGCTGAT	TAATGCTTCG	CGCGGTACTG	TGGTGGATAT	TCCGGCGCTG	TGTGATGCGC
10721	TGGCGAGCAA	ACATCTGGCG	GGGCGGGCAA	TCGACGTATT	CCCGAGCGAA	CCGCGGACCA	ATAGCGATCC	ATTTACCTCT
10801	CGCTGTGTGA	AATTCGACAA	CGTCTCTCTG	ACGCCATACA	TTGGCGGTTT	GACTCAGGAA	GCGCAGGAAA	ATATCGGCCCT
10881	GGAAGTTGCG	GGTAAATTGA	TCAAGTATTC	TGACAATGGC	TCAACGCTCT	CTGCGGTGAA	CTTCCCGGAA	GTCTCGCTGC
10961	CACCTGCACG	TGGGCGTCTG	CTGATGCACA	TCCACGAAAA	CCGTCCGGGC	GTGCTAACTG	CGCTGAACAA	AATCTTCGCC
11041	GAGCAGGGCG	TCAACATCGC	CGCGCAATAT	TGCAAACTT	CGCCCCAGAT	GGGTATTGTT	GTTATTGATA	TGTAAGCCGA
11121	CGAAGACGTT	CGCGAAAAAG	CGCTGCGAGC	AATGAACGCT	ATTCCCGGTA	CCATTCCGCG	CCGCTCTGCT	TACTAATTCC
11201	CCTTCTCTGA	AAATCAACGG	GCAGGTCACT	GACTTGCCCG	TTTTTTTATC	CCTTCTCCAC	ACCGTTGCCG	CGTTGCTGCT
11281	CTAGAGTCAA	TTCTCATGTT	TGACAGCTTA	TCATCGATAA	GCTTTAATGC	GGTAGTTTAT	CACAGTTAAA	TTGCTAACCG
11361	AGTCAGGCAC	CGTGATGAA	ATCTAACAAT	CGCTCATCG	TCATCTCTCG	CACCGTCACC	CTGGATGCTG	TAGGCATAGG
11441	CTTTGTTATG	CCGGTACTGC	CGGGCTCTCT	CGGGATATAT	GCTCAATCCG	ACAGCATCGC	CAGTCACTAT	GGCTGCTGCT
11521	TAGCGCTATA	TGCGTTGATG	CAATTTCTAT	GCGCACCCGT	TCTCGGAGCA	CTGTCCGACC	GCTTTGGCCG	CCGCCAGTCT
11601	CTGCTCGCTT	CGCTACTTGG	AGCCACTATC	GACTACGCGA	TCATGGCGAC	CACACCCGTC	CTGTGGATCC	TCTACGCCCG
11681	ACGCATCGTG	CCCGGCATCA	CCGGCGCCAC	AGGTGCGGTT	GCTGGCGCCT	ATATCGCCGA	CATCACCGAT	GGGGAAGATC
11761	GGGCTGCGCA	CTTCGGGCTC	ATGAGCGCTT	CGGTGCGCAT	GGGTATGGTG	GCAGGCGCCG	TGGCGCGGGG	GCTTTGTTGG
11841	GCCATCTCCT	TGCATGCACC	ATTCTTGGCG	GCGGCGGTGC	TCAACGGCCT	CAACCTACTA	CTGGGCTGCT	TCCTAATGCA
11921	GGAGTCGCAT	AAGGGAGAGC	GTGACCCGAT	GCCCTTGAGA	GCCTTCAACC	CAGTCAGCTC	CTTCCGCTGG	GCGCGGGGCA
12001	TGACTATCGT	CGCCGCACTT	ATGACTGTCT	TCTTTATCAT	GCAACTCGTA	GGACAGGTGC	CGGCAGCGCT	CTGGGTCATT
12081	TTTCGGCGAG	ACCGCTTTTC	CTGGAGCGCG	CCAGTATATG	CGCTGTCTCT	TGCGGTATTC	GGAATCTTGC	ATGCGCTCGC
12161	TCAAGCCTTC	GTCATGCTGC	CCGCCACCAA	ACGTTTCCGG	GAGAAGCAGG	CCATTATCGC	CGGCATGGCG	GCCGACGCGC
12241	TGGGTACGTT	CTTGCTGGCG	TTGCGGACGC	GAGGCTGGAT	GGCTTCCCCC	ATTATGATTC	TTCTCGCTTC	CGCGCGCATC
12321	GGGATGCCCC	CGTTGCAGGC	CATGCTGTCC	AGGCAGGTAG	ATGACGACCA	TCAGGGACAG	CTTCAAGGAT	CGCTCGCGGC
12401	TCTTACGACG	CTAACTTCGA	TCATTGAGAC	GCTGATCGTC	ACCGCGATTT	ATGCCGCTC	GCGGACGACA	TGCAAGCGGT
12481	TGGCATGGAT	TGTAGGCGCC	GCCCTATACC	TTGCTGCTCT	CCCCGCGTTG	CGTCGCGGTG	CATGGAGCCG	GGCCACCTCG
12561	ACCTGAATGG	AAGCCGGCGG	CACCTCGCTA	ACGGATTAC	CACCTCAAGA	ATTGGAGCCA	ATCAATCTTT	GCGGAGAACT
12641	GTGAATGCGC	AAACCAACCC	TTGGCAGAAC	ATATCCATCG	CGTCCGCCAT	CTCCAGCAGC	CGCACGCGCG	GCATCTCGGG
12721	CTGCGCTGGG	TTCTGGCCAC	GGGTGCGCAT	AGGTGCGCTC	TTCTCGTTGA	GGACCCGCGT	AGGCTGCGCG	GCTTGCTTTA
12801	CTGGTTAGCA	GAATGAATCA	CCGATACGCG	AGCGAACGTG	AAGCGACTGC	TGCTGCAAAA	CGTCTGCGAC	CTGAGCAACA
12881	ACATGAATGG	TCTTCGGTTT	CCGTGTTTTC	TAAAGTCTGG	AAACGCGGAA	GTGAGCGCCC	TGCACCATTA	TGTTCCGGAT
12961	CTGCATCGCA	GGATGCTGCT	GGCTACCCTG	TGGAACACCT	ACATCTGTAT	TAACGAAGCG	CTGGCATTTA	CCCTGAGTGA
13041	TTTTTCTCTG	GTCCCGCCCG	ATCCATACCG	CAGATTGTTT	ACCCTCACAA	CGTTCCAGTA	ACCGGGCATG	TTTCATCATCA
13121	GTAACCCGTA	TCGTGAGCAT	CCTCTCTCTG	TTTCATCGGT	TCATTACCCC	CATGAACAGA	AATCCCCCTT	ACACGGAGGC
13201	ATCAGTGACC	AAACAGGAAA	AAACCGCCCT	TAACATGGCC	CGCTTTATCA	GAAGCCAGAC	ATTAACGCTT	CTGGAGAAAC
13281	TCAACGAGTT	GGACGCGGAT	GAACAGGCAG	ACATCTGTGA	ATCGCTTAC	GACCACGCTG	ATGAGCTTTA	CCGACGCTGC
13361	CTCGCGGCTT	TCGGTGATGA	CGGTGAAAAC	CTCTGACACA	TGCAAGCTCC	GGAGACGGTC	ACAGCTTGTC	TGTAAGCGGA
13441	TGCCGGGAGC	AGACAAGCCC	GTCAGGGCGC	GTCAGCGGGT	GTTGGCGGGT	GTCGGGGCGC	AGCCATGACC	CAGTCACGTA
13521	GCGATAGCGG	AGTGATATACT	GGCTTAACTA	TGCGGCATCA	GAGCAGATTG	TACTGAGAGT	GCACCATATG	CGGTGTGAAA
13601	TACCGCACAG	ATGCGTAAGG	AGAAAAATAC	GCATCAGGCG	CTCTTCCGCT	TCCTCGCTCA	CTGACTCGCT	GCGCTCGGTC
13681	GTTTCGGCTG	GCGGAGCGGT	ATCAGCTCAC	TCAAAGCGCG	TAATACGGTT	ATCCACAGAA	TCAGGGGATA	ACGACGAGAA
13761	GAACATGTGA	GCAAAAAGGC	AGCAAAAAGC	CAGGAACCGT	AAAAAGGCCG	CGTTGCTGGC	GTTTTTCCAT	AGGCTCCGCC
13841	CCCcTGACGA	GCATCACAAA	AATCGACGCT	CAAGTCAGAG	GTGGCGAAAC	CCGACAGGAC	TATAAAGATA	CCAGGCGTTT
13921	CCCCCTGGAA	GCTCCCTCGT	GCGCTCTCCT	TATCCGACCC	TGCCGCTTAC	CGGATACCTG	TCCGCTTTTC	TCCCTTCGGG
14001	AAGCGTGGCG	CTTTCTCATA	GCTCAGCTG	TAGGTATCTC	AGTCTCGGTT	AGGTGCTTCG	CTCCAAGCTG	GCGCTGTGTC
14081	ACGAACCCCC	cGTTTCAGCCC	GACCGCTGCG	CCTTATCCGG	TAACATCTCG	CTTGAGTCCA	ACCCGGTAAG	ACACGACTTA
14161	TCGCCACTGG	CAGCAGCCAC	TGGTAACAGG	ATTAGCAGAG	CGAGGTATGT	AGGCGGTGCT	ACAGAGTTCT	TGAAGTGGTG
14241	GCCTAACTAC	GGCTACACTA	GAAGGACAGT	ATTTGGTATC	TGCGCTCTGC	TGAAGCCAGT	TACCTTCGGA	AAAAGAGTTG
14321	GTAGCTCTTG	ATCCGGCAAA	CAAACACCG	CTGGTAGCGG	TGTTTTTTTT	GTTTGCAAGC	AGCAGATTAC	GCGCAGAAAA

наличие во встроеной ДНК каких-либо неизвестных последовательностей и информация о том, в какой степени вставка ограничена ДНК, необходимой для осуществления предполагаемой функции:

все последовательности известны и содержат только гены, необходимые для осуществления запланированных функций.

характеристика сайта модификации реципиентного генома, локализация вставки;

В результате гомологичной рекомбинации и одиночного кроссинговера (по гену *trpD*) вся последовательность плазмиды встроилась в хромосому штамма *E. coli* JUTR1801. Таким образом, реципиентный организм содержит добавочные копии генов как в составе хромосомы, так и в составе многокопийной плазмиды.

стабильность инкорпорации привнесенной ДНК в геном реципиентного организма:

исследования не проводились.

описание методики обнаружения и идентификации встроеного фрагмента ДНК, чувствительность, надежность и специфичность этой методики:

встроенные фрагменты ДНК могут быть идентифицированы со 100% надёжностью и специфичностью с помощью полногеномного секвенирования трансгенного микроорганизма.

3.2. информация о генно-инженерном организме:

описание генетических признаков или фенотипических характеристик, в особенности новых признаков и характеристик, которые стали проявляться или перестали проявляться у генно-инженерных организмов по сравнению с реципиентными организмами:

фенотипические признаки (новые по сравнению с родительским штаммом):

1. повышенный синтез и накопление аминокислоты L-лизина;
2. повышенная устойчивость к тетрациклину;
3. более медленный рост в схожих условиях.

генетическая стабильность генно-инженерных организмов:

геном генно-инженерного штамма *E. coli* JUTR1801 стабилен на уровне исходного штамма *E. coli* W3110.

степень и уровень экспрессии трансгена(ов), метод оценки экспрессии трансгена(ов), его чувствительность:

анализ уровня экспрессии трансгенов не проводился.

активность и свойства протеина(ов), кодируемого трансгеном(ами):

трансгены кодируют ключевые ферменты, участвующие в биохимическом пути синтеза триптофана (*TrpE*, *TrpD*, *TrpCF*, *TrpB*, *TrpA*,

AroG, SerA), а также репрессор лактозного оперона (LacI) и металл-тетрациклин / H⁺ антипортер (TetA).

история прежних генно-инженерных модификаций генно-инженерных организмов:

отсутствует.

3.3. характеристика генно-инженерных организмов в связи с безопасностью для здоровья человека:

токсические или аллергенные эффекты генно-инженерных организмов и (или) продуктов их метаболизма:

не выявлены (приложение: заключение токсиколого-гигиенической экспертизы РУП «Научно-практический центр гигиены»).

риски возможных вредных воздействий на здоровье человека, связанные с использованием продуктов, полученных из генно-инженерных организмов: отсутствуют.

способность генно-инженерных организмов к колонизации:

у аналогичных трансгенных штаммов отсутствует способность к колонизации кишечника людей и мышей (Levy SB, Marshall B, Rowse-Eagle D, Onderdonk A. Survival of *Escherichia coli* host-vector systems in the mammalian intestine. Science. 1980 Jul 18;209(4454):391-4. doi: 10.1126/science.6992276. PMID: 6992276.).

патогенность генно-инженерных организмов для иммунокомпетентного человеческого организма:

штамм является непатогенным для человека и животных (приложение: заключение о непатогенности штамма).

4. Информация о потенциальной принимающей среде:

4.1. местоположение участка, где будет осуществляться высвобождение (область, район, населенный пункт, принадлежность земельного участка землевладельцу или землепользователю с его полным наименованием):

высвобождение генно-инженерного штамма *Escherichia coli* JUTR1801 в окружающую среду не предусмотрено; работа со штаммом будет осуществляться в замкнутой системе биореакторов и сопутствующего технологического оборудования, расположенных на заводе по производству кормовых аминокислот ЗАО «БНБК» (Адрес производства – Минская область, Пуховичский район, Дукорский с/с, 27).

4.2. физическая и биологическая близость к человеку и (или) какой-либо другой значительной биоте:

работа со штаммом будет осуществляться в замкнутой системе без контакта с другими биологическими объектами.

4.3. близость к заповедникам, заказникам и другим природоохраняемым объектам и территориям, расстояние участка от мест водозабора (питьевой воды):

Работа со штаммом в замкнутой системе будет осуществляться на участке, который частично расположен на территориях, подлежащих специальной охране: на расстоянии 1 км от водоохранной зоны канала Дричинский.

Источником водоснабжения предприятия являются подземные воды водозабора «Бор»; зона водозаборных сооружений водозабора «Бор» располагается в юго-западном направлении на расстоянии ~12,0 км от территории основной площадки ЗАО «БНБК».

4.4. численность населения в районе высвобождения и деятельность населения, экономически связанная с использованием природных ресурсов местности:

высвобождение генно-инженерного штамма *Escherichia coli* JUTR1801 в окружающую среду не предусмотрено.

4.5. описание участка, включающее его размер и обработанность, климатическую, геологическую и агрохимическую характеристики:

высвобождение генно-инженерного штамма *Escherichia coli* JUTR1801 в окружающую среду не предусмотрено.

4.6. флора и фауна, включая домашних животных, мигрирующие виды и возделываемые сельскохозяйственные культуры:

высвобождение генно-инженерного штамма *Escherichia coli* JUTR1801 в окружающую среду не предусмотрено.

4.7. описание экосистем, организмов-мишеней и организмов, не являющихся продуктами трансгенов, которые могут быть затронуты в результате высвобождения генно-инженерных организмов:

высвобождение генно-инженерного штамма *Escherichia coli* JUTR1801 в окружающую среду не предусмотрено.

4.8. сравнение мест естественного обитания реципиентных организмов с предполагаемым местом высвобождения генно-инженерных организмов;

высвобождение генно-инженерного штамма *Escherichia coli* JUTR1801 в окружающую среду не предусмотрено.

4.9. методы вмешательства в природу участка (методы культивации, ирригации и другие):

высвобождение генно-инженерного штамма *Escherichia coli* JUTR1801 в окружающую среду не предусмотрено.

5. Информация о взаимодействии генно-инженерных организмов с окружающей средой:

5.1. биологические особенности генно-инженерных организмов (по сравнению с интактными реципиентными организмами), которые могут

оказывать влияние на выживаемость, размножение и распространение в потенциальной принимающей среде:

отсутствуют.

5.2. известные и прогнозируемые условия потенциальной принимающей среды, которые могут оказывать влияние на выживаемость, размножение, рассеивание генно-инженерных организмов:

высвобождение генно-инженерного штамма *Escherichia coli* JUTR1801 в окружающую среду не предусмотрено. После культивирования микроорганизма в замкнутой системе вся биомасса и реактор будет подвергаться обеззараживанию.

5.3. чувствительность или устойчивость к специфическим агентам:

по сравнению с реципиентным штаммом увеличена устойчивость к антибиотику тетрациклину до концентрации 30 мкг/мл.

5.4. характеристика и поведение генно-инженерных организмов, и их экологические воздействия в условиях, симулирующих естественную среду (теплица, ростовая комната):

характеристики трансгенных и реципиентных штаммов не отличаются;

5.5. способность к переносу генетической информации: вероятность переноса трансгенов от генно-инженерных организмов к организмам, населяющим потенциальную принимающую среду обитания, либо от этих организмов к генно-инженерным организмам:

способность к переносу генетической информации отсутствует, т.к. культивирование трансгенных микроорганизмов будет осуществляться в замкнутой системе без контакта с другими биологическими объектами.

5.6. вероятность проявления у генно-инженерных организмов в потенциальной принимающей среде непредвиденных и (или) нежелательных свойств, признаков:

на уровне природных бактерий.

5.7. пути рассеивания генно-инженерных организмов в потенциальной принимающей среде, известные или потенциальные способы взаимодействия с рассеивающими агентами, включая вдыхание, заглатывание, поверхностный контакт, проникновение в поры и другое:

отсутствуют.

5.8. вероятность резкого увеличения численности популяции генно-инженерных организмов в потенциальной принимающей среде:

культивирование в замкнутой системе сопровождается прогнозируемым накоплением биомассы бактерий, которая затем подвергается обеззараживанию.

5.9. конкурентное преимущество генно-инженерных организмов по сравнению с интактными реципиентными организмами:

способность расти на питательных средах с добавлением тетрациклина в концентрациях до 30 мкг/мл

5.10. идентификация и описание организмов – мишеней продуктов трансгенов:

организмы-мишени отсутствуют.

5.11. предполагаемые механизм и результат взаимодействия генно-инженерных организмов с организмами-мишенями:

организмы-мишени отсутствуют.

5.12. идентификация и описание организмов, не являющихся мишенями продуктов трансгенов, которые могут быть подвержены влиянию генно-инженерных организмов:

организмы отсутствуют.

5.13. вероятность сдвига в характере взаимоотношений генно-инженерных организмов с другими организмами, изменения круга хозяев:

отсутствует.

5.14. известное или предполагаемое вовлечение генно-инженерных организмов в биогеохимические процессы:

отсутствует.

5.15. другие потенциально возможные взаимодействия генно-инженерных организмов с окружающей средой:

отсутствуют.

6. Информация об осуществлении высвобождения, о мониторинге, контроле, очистке территории и действиях при непредвиденных обстоятельствах:

6.1. информация о высвобождении генно-инженерных организмов:

описание предполагаемого высвобождения генно-инженерных организмов, его цели:

высвобождение генно-инженерного штамма *Escherichia coli* JUTR1801 в окружающую среду не предусмотрено. Культивирование трансгенных микроорганизмов будет осуществляться в замкнутой системе с целью производства кормовой добавки «L-триптофан 98%».

предполагаемые сроки начала и окончания высвобождения и календарный план экспериментов, связанных с высвобождением, включая количество и продолжительность экспериментов:

не предусмотрены.

предполагаемое количество высвобождаемых генно-инженерных организмов:

0.

метод высвобождения генно-инженерных организмов:

не предусмотрен.

подготовка участка к высвобождению:

не предусмотрена.

меры по защите сотрудников во время высвобождения:

не предусмотрены.

обработка участка после высвобождения:

не предусмотрена.

информация о наличии и результатах предыдущих высвобождений генно-инженерных организмов в окружающую среду:

отсутствует, поскольку генно-инженерный штамм *Escherichia coli* JUTR1801 предназначен для использования в замкнутой системе и его высвобождение в окружающую среду не предусмотрено. Работа с генно-инженерным организмом будет осуществляться в соответствии с Постановлениями Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь «О порядке работы с непатогенными генно-инженерными организмами» от 31.05.2019 №12 и «О требованиях безопасности к замкнутым системам при осуществлении работ первого уровня риска генно-инженерной деятельности» от 17.08.2006 №50.

6.2. методы мониторинга:

методы наблюдения за генно-инженерными организмами, мониторинга их взаимодействий с окружающей средой:

на производстве ЗАО «БНБК» будет осуществляться полный контроль за состоянием, перемещением, утилизацией генно-инженерного штамма *Escherichia coli* JUTR1801 с составлением отчетности по установленным формам и стандартам, принятым на предприятиях с соответствующим видом деятельности (приложение: Инструкция по осуществлению производственного контроля в области безопасности генно-инженерной деятельности ЗАО «БНБК», Инструкция о порядке обезвреживания непатогенных генно-инженерных штаммов микроорганизмов ЗАО «БНБК»).

специфичность (то есть возможность идентифицировать генно-инженерные организмы, отличить их от реципиентного и донорного организмов), чувствительность и надежность методов мониторинга генно-инженерных организмов:

отличить генно-инженерный штамм от реципиентного организма можно с помощью молекулярно-генетических методов. Предполагается использовать метод полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами (TRI-ch-F: AGATACCGATGCTCTGTTACG и TRI-ch-R: ATCACGTCTTCAGTCAGATGG; температура отжига: 52°C, время элонгации: 40 с), которые способны парно отжечься только на цепи ДНК генно-инженерного микроорганизма и сформировать ампликон длиной в 669

п.н. Чувствительность такого метода по литературным данным составляет 1-10 молекул ДНК на анализируемый объём.

методы выявления переноса трансгенов другим организмам:

сравнение генома генно-инженерных бактерий с геномом организма, в который мог произойти перенос трансгенов;

продолжительность и частота мониторинга:
по мере необходимости.

6.3. контроль высвобождения генно-инженерных организмов:

методы и процедуры, позволяющие избежать или минимизировать рассеивание генно-инженерных организмов за пределы территории, определенной для проведения высвобождения генно-инженерных организмов:

работа с генно-инженерным штаммом *Escherichia coli* JUTR1801 будет осуществляться в полностью замкнутой системе, без его высвобождения в окружающую среду. После культивирования микроорганизма в замкнутой системе вся биомасса и реактор будет подвергаться обеззараживанию. Обеззараживание будет проводиться согласно Инструкции о порядке обеззараживания непатогенных генно-инженерных организмов, утвержденной Постановлениями Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь от 31.05.2019 №12.

методы и процедуры, направленные на охрану территории высвобождения от вторжения посторонних лиц:

на производстве ЗАО «БНБК» имеется система контроля доступа для защиты от вторжения посторонних лиц (КПП с постоянным присутствием охраны, система электронных пропусков).

методы и процедуры, предохраняющие территорию от нежелательного посещения другими организмами:

работа только со стерильными средами и ёмкостями.

6.4. очистка территории:

тип и предполагаемый объем загрязнения территории в результате высвобождения генно-инженерных организмов:

предполагается контаминация генно-инженерными микроорганизмами только замкнутой системы линии по производству кормовой добавки «L- триптофан 98%», которая после завершения каждого производственного цикла будет подвергаться обеззараживанию.

возможные риски, связанные с загрязнением территории:
отсутствуют.

описание предполагаемых действий по устранению загрязнения:

обработка поверхностей дезинфицирующими растворами;
автоклавирование отработанных материалов.

6.5. план действий в чрезвычайных ситуациях:

методы и процедуры контроля генно-инженерных организмов в случае непредвиденного распространения:

на поверхностях оборудования, мебели, стен и полов; одежды и кожных покровов людей используется метод смывов:

Отбор проб проводится следующим образом:

- маркируют пробирки (с вмонтированными в пробки аппликаторами с вязкими тампонами): указывают номер точки отбора проб, дату отбора;
- увлажняют аппликатор в 0,2 мл раствора натрия хлорида 0,9%;
- извлекают стерильный аппликатор из пробирки;
- делают смыв с участка общей площадью 100 см² (4 по 25 см²):
- очерчивают смоченным тампоном квадрат размером приблизительно 5×5 см² (либо используют трафарет для взятия смыва);
- тщательно заштриховывают очерченную поверхность в вертикальном направлении, проводя последовательные полосы и вращая аппликатор в соответствии со схемой, представленной на Рис.1, под углом 5-10°;
- переворачивают аппликатор на 90° и аналогично заштриховывают очерченную поверхность в горизонтальном направлении;
- при отборе проб с мелких предметов смыв делают со всей поверхности предмета;
- после отбора смыва аппликатор вставляют в пробирку, не касаясь края, наружной/ внутренней поверхности пробирки и остатков раствора натрия хлорида 0,9%;
- пробирки с отобранными пробами устанавливают в штатив.

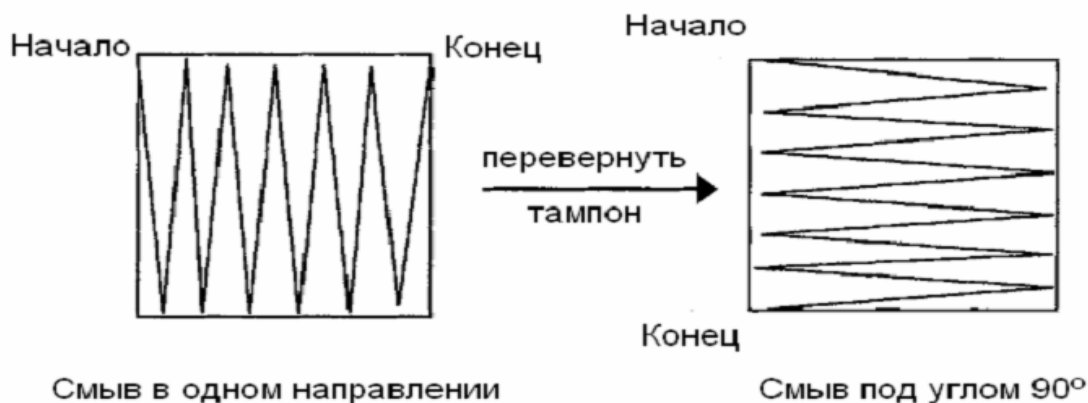


Рис.1.Схема отбора смыва

Пробы транспортируют в микробиологическую лабораторию и немедленно осуществляют посев на питательные среды.

Испытание проводит инженер-микробиолог/ лаборант-микробиолог в боксе в ламинарном шкафу (зона А класса чистоты).

Посев смыва на питательную среду осуществляют следующим образом:

- маркируют чашки Петри: указывают номер точки отбора проб, дату отбора;

- извлекают аппликатор, не касаясь поверхностей и края пробирки;
- слегка надавливая и вращая тампон частыми штрихами, переносят содержимое аппликатора на поверхность двух чашек с модифицированной средой Макконки (с добавлением тетрациклина), согласно схеме, представленной на *Рис.2*;

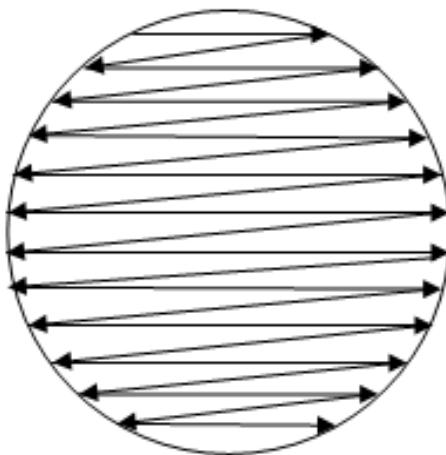


Рис.2 Схема посева на чашку

Чашки Петри с посевами инкубируют при температуре $(30-35)^{\circ}\text{C}$ в течение 24-48 часов.

Интерпретация результатов

Рост розовых или красных колоний, с зоной преципитации желчных солей или без нее, свидетельствует о возможном присутствии *E. coli*. Результат подтверждается идентификационными испытаниями.

- Подозрительные колонии микроскопировать. При обнаружении в мазках грамотрицательных палочек, пересеять каждую подозрительную колонию отдельно со среды агар на среду ТСА (триптон-соевый агар) и инкубировать 18-24 часа при температуре $30-35^{\circ}\text{C}$ для получения суточной культуры.
- Из каждой пробирки/чашки Петри с чистой суточной культурой поставить тест на наличие фермента цитохромоксидаза: снять стерильной петлей изолированную колонию, перенести ее на реактивную зону тест-полоски и равномерно распределить. Через минуту сравнить цвет тест-полоски с прилагаемой шкалой. У оксидаза-положительных бактерий реактивная зона полоски окрашивается в цвета от голубого до пурпурного, у оксидаза-отрицательных бактерий реактивная зона полоски не изменяет окраску при нанесении культуры.
- Поставить тест на определение утилизации цитрата: пересеять суточную культуру на среду агар цитратный, инкубировать 18-24 часа при температуре $30-35^{\circ}\text{C}$, утилизацию цитрата определить по изменению цвета среды из зеленого в синий.
- Поставить тест на определение образования индола: пересеять суточную культуру на бульон Хоттингера, инкубировать 18-24 часа при температуре $30-35^{\circ}\text{C}$, наличие индола определить по появлению красного

кольца на поверхности среды бульон Хоттингера при добавлении 2-3 капель реактива для определения индола.

Если обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, которые не обладают ферментом цитохромоксидазой, не утилизируют цитрат натрия и образуют индол, считать, что образец контаминирован *E. coli*. В иных случаях результат отмечать следующим образом: *E. coli* не обнаружено.

в воздухе производственных помещений - седиментационный метод:

Чашки Петри со средой агар Макконки с тетрациклином расставляют в контрольные точки производственных помещений и оставляют в открытом состоянии на 1 час.

Пробы транспортируют в микробиологическую лабораторию и инкубируют 18-24 часа при температуре 30-35 °С.

Интерпретация результатов

Рост розовых или красных колоний, с зоной преципитации желчных солей или без нее, свидетельствует о возможном присутствии *E. coli*. Результат подтверждается идентификационными испытаниями.

- Подозрительные колонии микроскопировать. При обнаружении в мазках грамотрицательных палочек, пересеять каждую подозрительную колонию отдельно со среды агар Макконки на среду ТСА (триптон-соевый агар) и инкубировать 18-24 часа при температуре 30-35°С для получения суточной культуры.
- Из каждой пробирки/чашки Петри с чистой суточной культурой поставить тест на наличие фермента цитохромоксидаза: снять стерильной петлей изолированную колонию, перенести ее на реактивную зону тест-полоски и равномерно распределить. Через минуту сравнить цвет тест-полоски с прилагаемой шкалой. У оксидаза-положительных бактерий реактивная зона полоски окрашивается в цвета от голубого до пурпурного, у оксидаза-отрицательных бактерий реактивная зона полоски не изменяет окраску при нанесении культуры.
- Поставить тест на определение утилизации цитрата: пересеять суточную культуру на среду агар цитратный, инкубировать 18-24 часа при температуре 30-35°С, утилизацию цитрата определить по изменению цвета среды из зеленого в синий.
- Поставить тест на определение образования индола: пересеять суточную культуру на бульон Хоттингера, инкубировать 18-24 часа при температуре 30-35°С, наличие индола определить по появлению красного кольца на поверхности среды бульон Хоттингера при добавлении 2-3 капель реактива для определения индола.

Если обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, которые не обладают ферментом цитохромоксидазой, не утилизируют цитрат натрия и образуют индол, считать, что образец контаминирован *E. coli*.

в образцах воды и почвы – высев на агаризованную среду:

- 10 мл образца или количество, соответствующее 1 г (мл) продукта, поместить в соответствующее количество среды ТСБ, перемешать и инкубировать в течение 18-24 часа при температуре 30-35°C.
- Встряхнуть емкость, 1 мл гомогената со среды ТСБ внести в 100 мл питательной среды бульон Макконки с тетрациклином, перемешать и инкубировать 24-48 часов при температуре 30-35 °С.
- Со среды бульон Макконки сделать пересев на среду агар Макконки с тетрациклином и инкубировать 18-72 часа при температуре 30-35°C.

Интерпретация результатов

Рост розовых или красных колоний, с зоной преципитации желчных солей или без нее, свидетельствует о возможном присутствии *E. coli*. Результат подтверждается идентификационными испытаниями.

- Подозрительные колонии микроскопировать. При обнаружении в мазках грамотрицательных палочек, пересеять каждую подозрительную колонию отдельно со среды агар Макконки на среду ТСА (триптон-соевый агар) и инкубировать 18-24 часа при температуре 30-35°C для получения суточной культуры.
- Из каждой пробирки/чашки Петри с чистой суточной культурой поставить тест на наличие фермента цитохромоксидаза: снять стерильной петлей изолированную колонию, перенести ее на реактивную зону тест-полоски и равномерно распределить. Через минуту сравнить цвет тест-полоски с прилагаемой шкалой. У оксидаза-положительных бактерий реактивная зона полоски окрашивается в цвета от голубого до пурпурного, у оксидаза-отрицательных бактерий реактивная зона полоски не изменяет окраску при нанесении культуры.
- Поставить тест на определение утилизации цитрата: пересеять суточную культуру на среду агар цитратный, инкубировать 18-24 часа при температуре 30-35°C, утилизацию цитрата определить по изменению цвета среды из зеленого в синий.
- Поставить тест на определение образования индола: пересеять суточную культуру на бульон Хоттингера, инкубировать 18-24 часа при температуре 30-35°C, наличие индола определить по появлению красного кольца на поверхности среды бульон Хоттингера при добавлении 2-3 капель реактива для определения индола.

Если обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, которые не обладают ферментом цитохромоксидазой, не утилизируют цитрат натрия и образуют индол, считать, что образец загрязнен *E. coli*.

методы обеззараживания пораженных территорий, например, уничтожения генно-инженерных организмов:

использование дезинфицирующих средств в соответствии с инструкцией по применению.

методы утилизации или оздоровления растений, животных и других организмов, которые оказались подвергнуты воздействию генно-инженерных организмов в ходе или после их непредвиденного распространения:

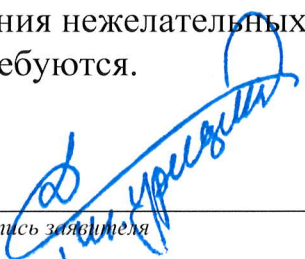
не требуются.

методы изоляции пораженных территорий:

не требуются.

планы защиты здоровья человека и охраны окружающей среды в случае обнаружения нежелательных воздействий генно-инженерных организмов:

не требуются.



подпись заявителя

Д.Т.Урицкий