



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111979138 B

(45) 授权公告日 2022.06.21

(21) 申请号 202010438425.6

(22) 申请日 2020.05.21

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111979138 A

(43) 申请公布日 2020.11.24

(83) 生物保藏信息
CCTCC NO:M 2020011 2020.01.06

(73) 专利权人 厦门大学
地址 361000 福建省厦门市思明南路422号

(72) 发明人 卢英华 沈亮 曹海鹏 陈锦良

(74) 专利代理机构 厦门市首创君合专利事务所
有限公司 35204
专利代理师 张松亭 姜谧

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C02F 3/02 (2006.01)

C02F 3/34 (2006.01)

C12R 1/40 (2006.01)

C02F 101/16 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2011084022 A1,2011.04.14

KR 20130058089 A,2013.06.04

JP 2001079593 A,2001.03.27

DE 102009048333 A1,2011.05.19

审查员 陈永强

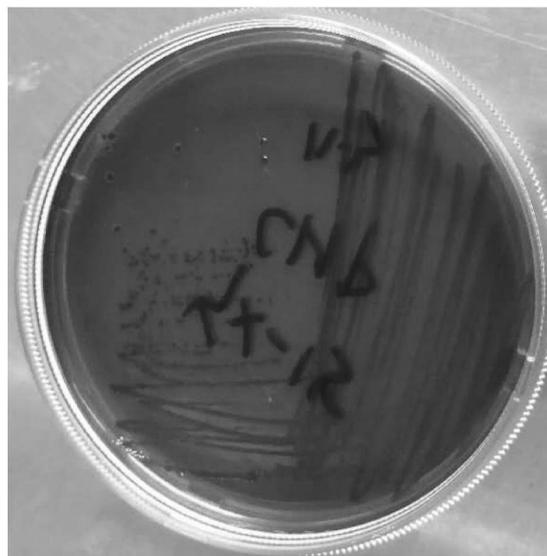
权利要求书1页 说明书6页
序列表1页 附图4页

(54) 发明名称

一种异养硝化好氧反硝化菌Y15及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种异养硝化好氧反硝化菌Y15及其应用,其为恶臭假单胞菌*Pseudomonas putida* PY15,其保藏编号为CCTCC M 2020011,于2020年1月6日保藏于中国典型培养物保藏中心。本发明在污水处理中能显著降低污水的含氮量,具有强化脱氮的效果。



1. 一种异养硝化好氧反硝化菌Y15,其特征在于:其为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)Y15,其保藏编号为CCTCC NO:M 2020011,于2020年1月6日保藏于中国典型培养物保藏中心。
2. 权利要求1所述的异养硝化好氧反硝化菌Y15在水体生物脱氮中的应用。
3. 如权利要求2所述的应用,其特征在于:所述水体生物脱氮为生活污水强化脱氮。
4. 如权利要求3所述的应用,其特征在于:包括:将所述异养硝化好氧反硝化菌Y15的菌液以0.8-1.2%的接种量接种于生活污水中,在25-30℃并100-200rpm的条件下培养20-72h。
5. 如权利要求4所述的应用,特征在于:所述菌液的制备方法为:将所述异养硝化好氧反硝化菌Y15的斜面培养物接种于LB液体培养基中,于28-32℃并100-200rpm的条件下培养20-30h,然后离心获得沉淀,再将该沉淀重悬于PBS中,即得。
6. 一种生活污水强化脱氮的方法,其特征在于:将权利要求1所述的异养硝化好氧反硝化菌Y15接种于所述生活污水中进行培养。
7. 如权利要求6所述的方法,特征在于:包括:将权利要求1所述的异养硝化好氧反硝化菌Y15的菌液以0.8-1.2%的接种量接种于生活污水中,在25-30℃并100-200rpm的条件下培养20-72h。
8. 如权利要求7所述的方法,特征在于:所述菌液的制备方法为:将所述异养硝化好氧反硝化菌Y15的斜面培养物接种于LB液体培养基中,于28-32℃并100-200rpm的条件下培养20-30h,然后离心获得沉淀,再将该沉淀重悬于PBS中,即得。
9. 一种水体生物脱氮组合物,其特征在于:其有效成分包括权利要求1所述的异养硝化好氧反硝化菌Y15。
10. 如权利要求9所述的一种水体生物脱氮组合物,其特征在于:其有效成分为所述异养硝化好氧反硝化菌Y15。

一种异养硝化好氧反硝化菌Y15及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于环境微生物技术领域,具体涉及一种异养硝化好氧反硝化菌Y15及其应用。

背景技术

[0002] 随着社会经济发展和城市化进程的深入推进,大量生活污水和工、农业废水流入江河湖泊,使水体N、P含量超标(尤其是氮含量超标),造成水体富营养化,超40%的地表水不能用作饮用水,严重威胁水体安全及人体健康。目前,我国每年投入大量人力、物力用于水体脱氮,治理水体污染,其中应用最广、操作最简便、最经济、最环保的脱氮技术是生物脱氮技术,而微生物是脱氮的关键生物。微生物脱氮具有种类多、投入成本低、适应性强及脱氮效率高等优点,其脱氮原理主要是通过氨化、硝化及反硝化等反应,将水体中的有机氮和无机氮转化为含氮气体从水体中排出。传统认为,硝化反应由好氧微生物在曝气条件下将 NH_4^+ -N转化 NO_2^- -N和 NO_3^- -N,反硝化反应则是由厌氧或兼性厌氧微生物在无氧或缺氧条件下将 NO_2^- -N和 NO_3^- -N还原为含氮气体,溶解氧对反硝化脱氮过程具有严重的制约作用。因此,传统的脱氮工艺都是在曝气和缺氧条件下进行的,脱氮工艺冗长,占地面积大,基建投资高,脱氮效率低。

[0003] 近年来,为提高脱氮效率,缩短脱氮工艺,降低污水处理成本,许多研究者致力于异养硝化、好氧反硝化工艺及相关细菌的研究,并分离出大量异养硝化、好氧反硝化细菌,主要是一些假单胞菌、单胞菌、产碱菌和芽孢菌等。该类微生物可以使硝化、反硝化过程在好氧条件下同时完成,使同步硝化反硝化成为可能,降低设备投资和运行成本;以硝化反应产物为氮源进行反硝化,避免脱氮过程亚硝酸盐和硝酸盐对硝化反应的抑制,加速反应进程;同步反硝化可以产碱,中和硝化反应产生的酸,维持脱氮过程pH的稳定,降低操作难度和运行成本;另外,异养硝化、好氧反硝化细菌生长迅速,对溶解氧浓度要求不高,脱氮周期短,污水处理效率高,已成为细菌脱氮领域研究的热点。

[0004] 目前,关于异养硝化、好氧反硝化细菌的研究主要集中在脱氮机理、脱氮条件、脱氮动力学和氮元素流向等方面,实际应用有限。因此,从自然界中筛选出具有高效同步硝化反硝化功能的细菌,并对其在常规环境条件下脱氮效率研究,具有重要的研究意义和应用价值。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种异养硝化好氧反硝化菌Y15。

[0006] 本发明的另一目的在于提供上述异养硝化好氧反硝化菌Y15的应用。

[0007] 本发明的技术方案如下:

[0008] 一种异养硝化好氧反硝化菌Y15,其为恶臭假单胞菌*Pseudomonas putida* Y15,其保藏编号为CCTCC NO:M 2020011,于2020年1月6日保藏于中国典型培养物保藏中心(保藏地点为湖北省武汉市,武汉大学)。

[0009] 本发明的另一技术方案如下：

[0010] 上述异养硝化好氧反硝化菌Y15在水体生物脱氮中的应用。

[0011] 在本发明的一个优选实施方案中，所述水体生物脱氮为生活污水强化脱氮。

[0012] 进一步优选的，包括：将所述异养硝化好氧反硝化菌Y15的菌液以0.8-1.2%的接种量接种于生活污水中，在25-30℃并100-200rpm的条件下培养20-72h。

[0013] 更进一步优选的，所述菌液的制备方法为：将所述异养硝化好氧反硝化菌Y15的斜面培养物接种于LB液体培养基中，于28-32℃并100-200rpm的条件下培养20-30h，然后离心获得沉淀，再将该沉淀重悬于PBS中，即得。

[0014] 本发明的再一技术方案如下：

[0015] 一种生活污水强化脱氮的方法，将所述异养硝化好氧反硝化菌Y15接种于所述生活污水中进行培养。

[0016] 在本发明的一个优选实施方案中，包括：将权利要求1所述的异养硝化好氧反硝化菌Y15的菌液以0.8-1.2%的接种量接种于生活污水中，在25-30℃并100-200rpm的条件下培养20-72h。

[0017] 进一步优选的，所述菌液的制备方法为：将所述异养硝化好氧反硝化菌Y15的斜面培养物接种于LB液体培养基中，于28-32℃并100-200rpm的条件下培养20-30h，然后离心获得沉淀，再将该沉淀重悬于PBS中，即得。

[0018] 本发明的又一技术方案如下：

[0019] 一种水体生物脱氮组合物，其有效成分包括所述异养硝化好氧反硝化菌Y15。

[0020] 在本发明的一个优选实施方案中，其有效成分为所述异养硝化好氧反硝化菌Y15。

[0021] 本发明的有益效果是：

[0022] 1、本发明在污水处理中能显著降低污水的含氮量，具有强化脱氮的效果。

[0023] 2、本发明能同时进行异养硝化、好氧反硝化，可处理较高浓度的 NH_4^+-N 、 NO_3^--N ，且 NO_2^--N 积累较少。分别以 NH_4^+-N 、 NO_3^--N 为氮源时，培养72h后 NH_4^+-N 、 NO_3^--N 去除率均可达100%。

[0024] 3、本发明能在曝氧条件下同时完成硝化、反硝化过程，且脱氮速率快、遗传稳定高，可用于污水强化脱氮。

[0025] 4、本发明具有较高的遗传稳定性，在连续6次液体传代培养时，氨氮脱氮率均在96%以上

附图说明

[0026] 图1为本发明实施例1中的恶臭假单胞菌Y15的菌落特征图。

[0027] 图2为本发明实施例1中的电子显微镜下的Y15的菌体特征图。

[0028] 图3为本发明实施例3中的Y15的模拟污水 NH_4^+-N 脱氮结果图。

[0029] 图4为本发明实施例3中的Y15的模拟污水 NO_3^--N 脱氮结果图。

[0030] 图5为本发明实施例4中的Y15连续传代培养下的氨氮脱氮结果图。

[0031] 图6为本发明实施例5中的Y15在不同碳源培养基中氨氮脱氮率图。

[0032] 图7为本发明实施例6中的不同组合的处理方式下实际污水脱氮效果图。

具体实施方式

[0033] 以下通过具体实施方式结合附图对本发明的技术方案进行进一步的说明和描述。

[0034] 实施例1恶臭假单胞菌Y15的分离和鉴定

[0035] 1. 恶臭假单胞菌Y15的分离

[0036] 1.1 样品来源

[0037] 样品取自贵阳市南明区某污水处理厂的活性曝气污泥。

[0038] 1.2 脱氮菌株的富集、分离纯化

[0039] 取1mL活性污泥样品接种于富集培养基中(配方:柠檬酸三钠5.66g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02g/L, KH_2PO_4 1.5g/L, Na_2HPO_4 7.9g/L, KNO_3 0.84g/L, 微量元素溶液1mL/L, pH 7.41), 28℃、150rpm条件下富集培养72h, 重复三次。取1mL富集培养液稀释液于9mL灭菌生理盐水中, 稀释至 10^{-1} 。依次分别稀释至 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 及 10^{-7} 等梯度。无菌条件下, 取 10^{-5} 、 10^{-6} 及 10^{-7} 等梯度的菌液各200 μ L, 均匀涂布于反硝化鉴别平板中(配方: KNO_3 1.0g/L, L-天冬酰胺1.0g/L, 1%BTB 5.0mL/L, 柠檬酸三钠8.5g/L, KH_2PO_4 1.0g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0g/L, $CaCl_2$ 5.0g/L, $FeCl_3$ 0.05g/L, pH 7.0, 琼脂15g/L), 37℃培养静置72h。培养结束后, 挑取有蓝色晕圈的菌落, 转接于固体斜面培养基中培养, 每株菌经平板划线纯化两次, 并编号、保藏。

[0040] 1.3 脱氮菌株的复筛

[0041] 将上述分离的菌株接种于模拟生活污水培养基中, 28℃、150rpm条件下培养48h, 将氨氮脱除率在90%以上菌株保藏并进一步复筛(NH_4^+ -N检测采用纳氏试剂分光光度计法, 具体参考新国标HJ 535-2009)。复筛时, 每株菌按1%接种量分别接种于100mL含100mg/mL的 NH_4^+ -N、 NO_3^- -N模拟污水培养基中, 28℃、150rpm条件下培养72h。经 NH_4^+ -N、 NO_3^- -N检测(NO_3^- -N检测采用紫外分光光度计法), 分离出一株高效异养硝化好氧反硝化菌Y15株, 72h内 NH_4^+ -N和 NO_3^- -N的脱除率均高达100%。将该菌株命名为Y15。

[0042] 2. Y15的鉴定

[0043] 2.1 形态鉴定

[0044] 取少量菌种以平板划线的方式接种于LB培养基中, 37℃静置培养24h。菌落特征如图1所示, 菌落呈白色半透明、圆隆、湿润光滑、边缘整齐等特征。挑取少量斜面培养的Y15菌苔, 进行革兰氏染色, 制备好的薄片经油镜镜检。结果显示: Y15菌体染色呈红色(革兰氏阴性菌)、杆状、无芽孢、单个分布。另取少量菌苔经水洗、戊二醛固定及干燥后使用扫描电镜观察。结果如图2所示, Y15菌体呈明显的杆状、两端钝圆、直径约0.5~1.0 μ m, 长1.0~2.0 μ m。

[0045] 2.2 生理生化特征鉴定

[0046] 以Y15为出发菌株, 参考《常见细菌系统鉴定手册》进行生理生化特征试验。试验所用试剂均为国产分析纯。具体检测指标及鉴定结果如下表1。

[0047] 表1 Y15生理生化特征鉴定结果

试验内容	结果	试验内容	结果
葡萄糖产气	-	硝酸盐还原试验	+

[0049]	乳糖	+	明胶液化试验	-
	蔗糖	+	L-亮氨酸	-
	甘露糖	-	精氨酸	+
	接触酶	+	硫化氢试验	-
	氧化酶	+	甲基红反应	-
	肌苷	+	V.P 试验	-

[0050] 注:+表示阳性;-表示阴性

[0051] 2.3 16SrDNA鉴定

[0052] 以平板划线分离的Y15单菌落为模板,细菌通用引物27F和1492R为引物,加入一定量的2×Taq PCR mix进行16SrDNA PCR扩增。反应条件为:98℃5min;94℃30s,55℃30s,72℃1min30s;72℃5min,循环30次。琼脂糖凝胶电泳验证后,PCR产物送至上海生工 生物工程有限公司进行序列分析。将所测的16S rDNA序列在GenBank中BLAST比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)。经比对,Y15的16S rDNA序列与Pseudomonas putida E46的同源性高达99.93%。Y15的16S rDNA的具体序列为:

```

catgcaagtcgagcggatgagaagagcttgctcttcgattcagcggcggacgggtgagtaatgcctaggaatctgcctgtagtg
ggggacaacgtttcgaaggaacgtaataccgcatacgtctacgggagaaagcaggggaccttcgggccttcgctatcagatgag
cctaggtcggattagctagttggtgggtaatggctaccaagggcagcatccgtaactggctctgagaggatgatcagtcacactggaac
tgagacacgggtccagactcctacgggagggcagcagtgagggaatattggacaatgggcgaaagcctgatccagccatgccgcgtgtgtg
aagaaggtcttcggattgtaaagcactttaagttgggaggaagggcagtaagcgaatacctgctgtttgacgttaccgacagaataagca
ccggctaactctgtccagcagccgcgtaatacagaggggtgcaagcgttaactggaactactgggcgtaaaagcgcgcgtaggtggttt
gttaagttgatgtgaaagccccgggctcaacctgggaactgcatcaaaaactggcaagctagagtacggtagagggtggtggaatttcc
[0053] tgtgtagcggtgaaatgcgtagatataaggaaggaacaccagtgccgaagggcaccacctggactgatactgacactgaggtgcgaaag
cgtggggagcaaacaggattagataccctgtagtccacgccgtaaacgatgtcaactagccgttgaatccttgagattttagtgccgca
gtaaacgcattaagttgaccgcctggggagtagcggcgaaggttaaaactcaaatgaattgacggggcccgcacaagcgggtggagc
atgtggttaattcgaagcaacgcgaagaaccttaccaggccttgacatgcagagaactttccagagatggattggtgccttcgggaactct
gacacaggtgctgcatggctgtcgtcagctcgtcgtgagatgtgggtaagtcccgaacgagcgaaccttgccttagtaccagc
acgttatggtgggactctaaggagactccggtgacaaaccggaggaaggtggggatgacgtcaagtcacatggcccttacggcctg
ggctacacacgtgctacaatggtcggttacaggggtgccaagccgcgaggtggagcctaactcacaaccgatcgtagtcgggatcg
cagtctgcaactcactgcgtgaagtcggaatcgtagtaatcgcgaatcagaatgtcgcggtgaatacgttccgggcttgcacacacc
gcccgtcacaccatgggagtggtgaccagaagtagctagctaaccttcgggaggacggtacc (SEQ ID NO.01)。

```

[0054] 结合形态、生理生化特征和分子鉴定结果,确定Y15为恶臭假单胞菌。

[0055] 实施例2恶臭假单胞菌Y15的抗生素药敏试验

[0056] 取Y15的单菌落转接入LB液体培养基中,37℃、150rpm培养24h。将菌液稀释10倍,取200μL稀释液均匀涂布于LB平板中,每皿等距离贴三只同一种药敏纸片,置于37℃恒温

培养箱静置培养24h,统计药敏试验结果。结果如表2所示,Y15只对红霉素有耐药性,对其它抗生素敏感,再污水处理中具有高度的生物安全性。

[0057] 表2 Y15抗生素药敏试验结果

抗生素种类	平均抑菌直径 (mm)	抗生素种类	平均抑菌直径 (mm)
诺氟沙星	19.1±0.1	环氟沙星	23.1±0.2
氯霉素	25.2±0.2	丁胺卡那	19.5±0.1
青霉素	26.1±0.1	庆大霉素	25.9±0.1
头孢	24.1±0.1	红霉素	0
氨苄西林	35.2±0.1	复方新诺明	24.5±0.1
四环素	28.2±0.1		

[0059] 实施例3恶臭假单胞菌Y15的脱氮性能试验

[0060] 取恶臭假单胞菌Y15斜面种子转接于100mL LB液体培养基中,30℃、150rpm条件下培养24h,获得种子液。取出该种子液,8000rpm离心1min,弃上清液,使用灭菌的PBS溶液洗涤菌体3次,最后悬浮于10mLPBS溶液中,获得菌液。取0.5mL的该菌液转接于500mL NH_4^+ -N、 NO_3^- -N模拟污水培养基中($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.72g/L;二水柠檬酸三钠 3.50g/L;维氏盐溶液 50mL/L;微量元素溶液1mL/L,pH 7.0。其中,维氏盐溶液配方为: $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 6.50g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.50g/L; NaCl 2.50g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g/L; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.04g/L。微量元素溶液配方为:EDTA 50g/L; ZnSO_4 2.20g/L;钼酸铵1.10g/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5.06g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.00g/L; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.61g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.57g/L; CaCl_2 5.50g/L,pH 6.0),28℃、150rpm条件下培养72h,前24h每隔3h取1次样,之后在48、72h取样,每次取10mL,并置于4℃冷藏。使用纳氏试剂分光光度计法、紫外分光光度计法及碱性过硫酸钾分光光度计法检测样品中的 NH_4^+ -N、 NO_3^- -N、 NO_2^- -N及TN。结果如图3、图4所示,以 NH_4^+ -N为氮源时,Y15在24h内基本降解全部的 NH_4^+ -N和少量因高温灭菌产生的 NO_3^- -N;TN降解较缓慢,24h时约35%的降解率,培养至72h总氮降解率达81.89%; NO_2^- -N主要在培养前期产生,3h时积累量约0.2mg/L,而后迅速降低,至12h后基本维持在0.05mg/L以下。以 NO_3^- -N为氮源时, NO_3^- -N脱除速度较快,24h时脱除率达82.50mg/L;而TN脱除速度较慢,24h脱除率约为21.97%,72h时TN脱除率达74.70%,说明大部分氮源在培养前期主要转化为胞外含氮有机物; NO_2^- -N有一定积累,培养至24h时,其浓度达最大值约3.14mg/L。以上数据表明,Y15具有较高的脱氮速率,能同时异养硝化好氧反硝化反应。

[0061] 实施例4恶臭假单胞菌Y15的脱氮稳定性试验

[0062] 取实施例3制备的菌液,以1%接种量转接于100mL浓度为100mg/L NH_4^+ -N模拟生活污水中,28℃、150rpm条件下培养72h。再取1%上述菌液转接于100mL灭菌 NH_4^+ -N模拟生活污水中,28℃、150rpm条件下培养72h,重复操作6次,每次取10mL 样品冷藏于4℃冰箱。使用纳氏试剂分光光度计法检测6次培养后的脱氮率。结果如图5所示,恶臭假单胞菌Y15在模拟污水连续培养6次,均保持96%以上的 NH_4^+ -N脱氮率,表明恶臭假单胞菌Y15在连续传代培养时具有较高的遗传稳定性。

[0063] 实施例5恶臭假单胞菌Y15的碳源适应性试验

[0064] 取实施例3制备的Y15液体种子,以原体积1%的比例接种于不同碳源100mg/L NH_4^+ -N模拟生活污水中(碳氮摩尔比均为10:1),28℃、150rpm条件下培养72h。培养结束后,使

用纳氏试剂分光光度计法检测各培养基中氨氮含量,并计算各碳源下的脱氮率。试验碳源及脱氮率如图6所示,当恶臭假单胞菌Y15以葡萄糖、蔗糖、柠檬酸钠、乙酸钠、琥珀酸钠、酒石酸钾钠、甘油及淀粉为碳源时,对各培养基的 NH_4^+ -N具有一定的脱氮率,其中,以蔗糖和柠檬酸钠为碳源时, NH_4^+ -N脱氮最佳,72h脱除率均在97%以上。

[0065] 实施例6恶臭假单胞菌Y15在污水脱氮中的应用试验

[0066] 取贵阳市南明河某河段生活污水4份,每份500mL(每份设置三个平行),分别接入南明区某污水处理厂新采集的1%活性污泥、0.5%活性污泥+0.5%Y15菌液(指数期菌液,菌液处理同上所述)、1%Y15菌液,余份作空白对照。28℃、150rpm条件下培养24h,检测培养前后样品中 NH_4^+ -N、 NO_3^- -N及TN的变化(检测方法同上所述)。结果如图7所示,以上四组样品经培养后, NH_4^+ -N分别由32.29mg/L降至13.30mg/L、10.57mg/L、15.27mg/L和21.92mg/L; NO_3^- -N分别由22.03mg/L降至13.40mg/L、14.29mg/L、14.38 mg/L和18.21mg/L;TN分别由80.22mg/L降至28.22mg/L、27.32mg/L、34.02mg/L、47.82mg/L。其中,活性污泥+菌液组的 NH_4^+ -N、 NO_3^- -N及TN脱氮率总体优于其它组别,说明Y15在污水处理中能显著降低污水的含氮量,具有强化脱氮的效果,在污水治理中具有一定的应用前景。

[0067] 以上所述,仅为本发明的较佳实施例而已,故不能依此限定本发明实施的范围,即依本发明专利范围及说明书内容所作的等效变化与修饰,皆应仍属本发明涵盖的范围内。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 厦门大学	
[0003]	<120> 一种异养硝化好氧反硝化菌Y15及其应用	
[0004]	<160> 1	
[0005]	<170> SIPOSequenceListing 1.0	
[0006]	<210> 1	
[0007]	<211> 1408	
[0008]	<212> DNA	
[0009]	<213> <i>Pseudomonas putida</i>	
[0010]	<400> 1	
[0011]	catgcaagtc gagcggatga gaagagcttg ctcttcgatt cagcggcggga cgggtgagta	60
[0012]	atgcctagga atctgcctgg tagtggggga caacgtttcg aaaggaacgc taataccgca	120
[0013]	tacgtcctac gggagaaagc aggggacctt cgggccttgc gctatcagat gaggcctaggt	180
[0014]	cggattagct agttggtggg gtaatggctc accaaggcga cgatccgtaa ctggtctgag	240
[0015]	aggatgatca gtcacactgg aactgagaca cggctccagac tcctacggga ggcagcagtg	300
[0016]	gggaatattg gacaatgggc gaaagcctga tccagccatg ccgcgtgtgt gaagaagtc	360
[0017]	ttcgattgt aaagcacttt aagttgggag gaagggcagt aagcgaatac cttgctgttt	420
[0018]	tgacgttacc gacagaataa gcaccggcta actctgtgcc agcagccgcg gtaatacaga	480
[0019]	gggtgcaagc gttaatcggg attactgggc gtaaagcgcg cgtaggtggt ttgttaagtt	540
[0020]	ggatgtgaaa gccccgggct caacctggga actgcatcca aaactggcaa gctagagtac	600
[0021]	ggtagagggt ggtggaatth cctgtgtagc ggtgaaatgc gtagatatag gaaggaacac	660
[0022]	cagtggcgaa ggcgaccacc tggactgata ctgacactga ggtgcaaaag cgtggggagc	720
[0023]	aaacaggatt agataacctg gtagtccacg ccgtaaacga tgtcaactag ccgttggaat	780
[0024]	ccttgagatt ttagtggcgc agctaacgca ttaagttgac cgcctgggga gtacggccgc	840
[0025]	aaggttaaaa ctcaaatgaa ttgacggggg cccgcacaag cggtaggagca tgtggtttaa	900
[0026]	ttcgaagcaa cgcaagaac cttaccagge cttgacatgc agagaacttt ccagagatgg	960
[0027]	attggtgcct tcgggaactc tgacacaggt gctgcatgcc tgtcgtcagc tcgtgtcgtg	1020
[0028]	agatgttggg ttaagtcccg taacgagcgc aacccttgc cttagttacc agcacgttat	1080
[0029]	ggtgggcaact ctaaggagac tgccggtgac aaaccggagg aaggtgggga tgacgtcaag	1140
[0030]	tcatcatggc ccttacggcc tgggctacac acgtgctaca atggtcggta cagagggttg	1200
[0031]	ccaagccgag aggtggagct aatctcaca aaccgatcgt agtccggatc gcagtctgca	1260
[0032]	actcgactgc gtgaagtcgg aatcgctagt aatcgcaat cagaatgtcg cggatgaatac	1320
[0033]	gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gtgggttgca ccagaagtag	1380
[0034]	ctagtctaac cttcgggagg acggtacc	1408

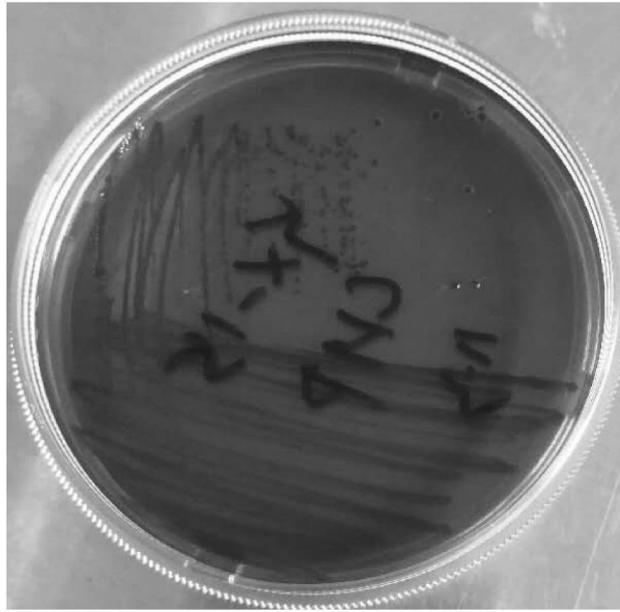


图1

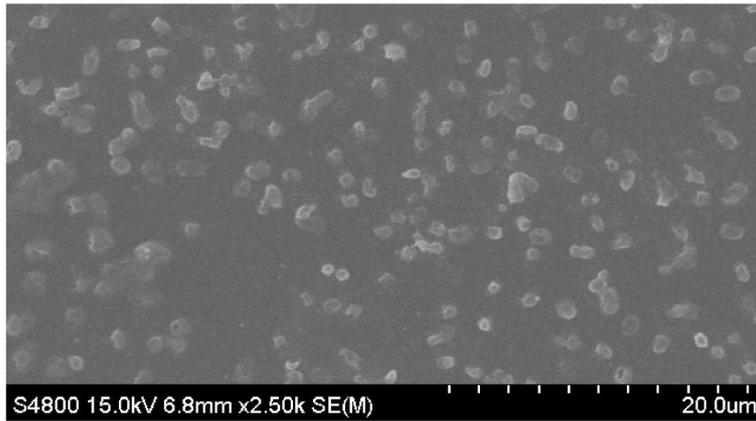


图2

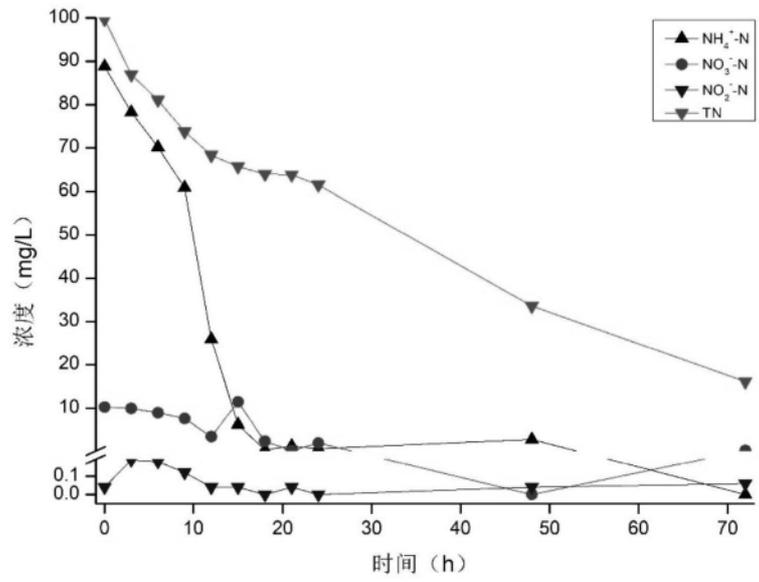


图3

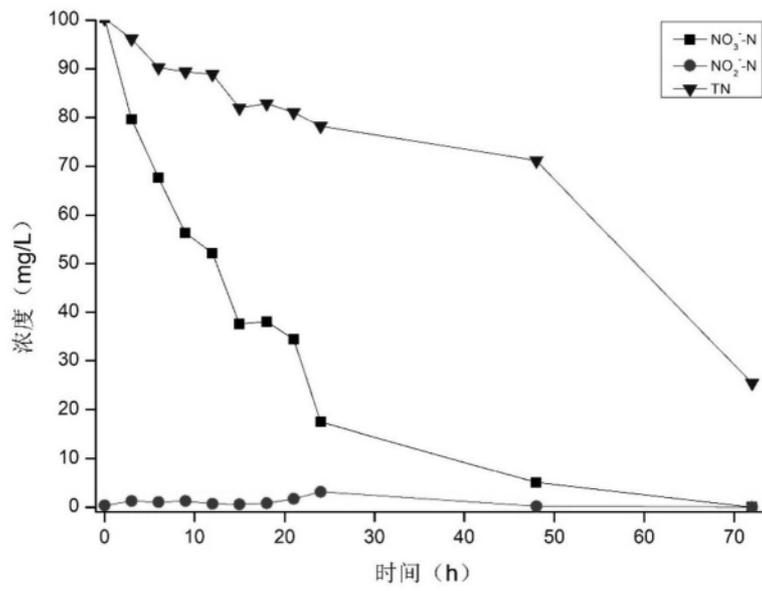


图4

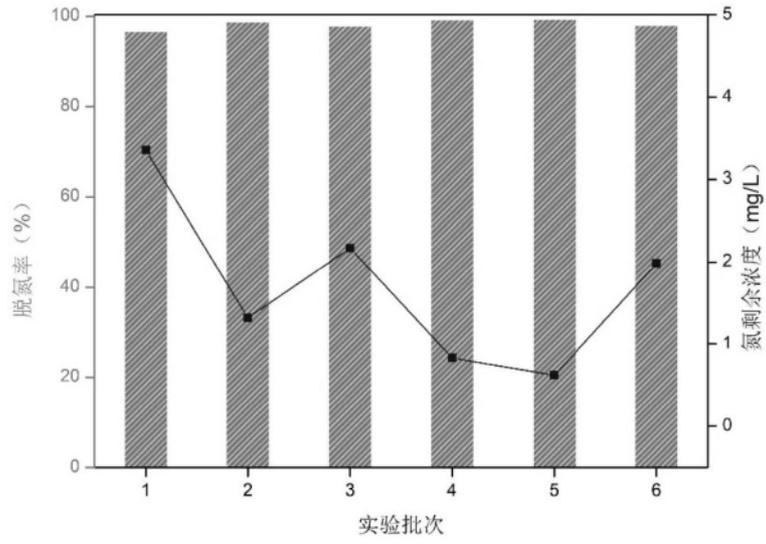


图5

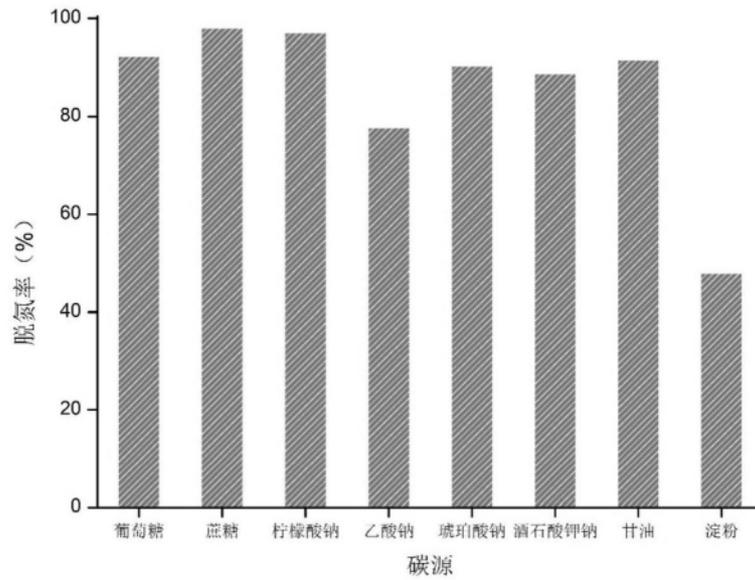


图6

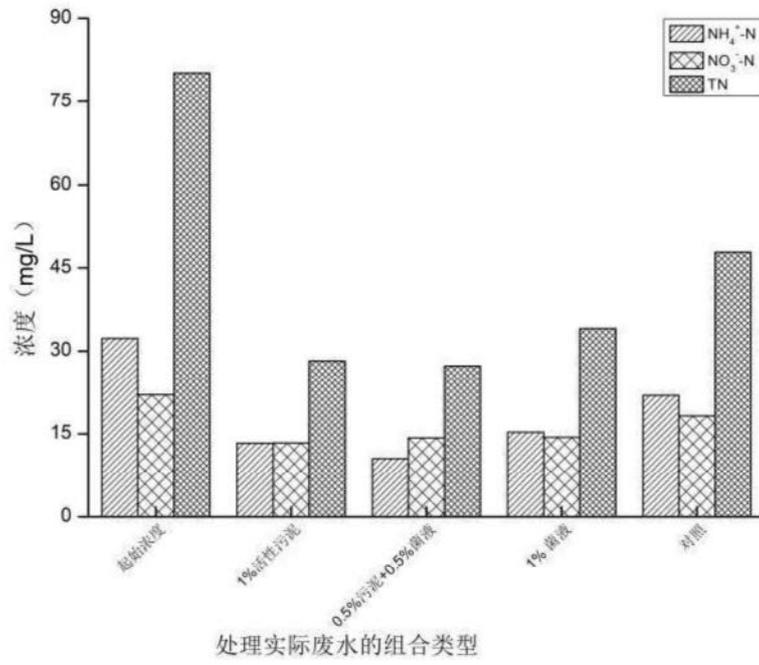


图7