

阿特拉津降解菌 ADH-2 的分离、鉴定及其特性研究

韩 鹏, 洪 青, 何丽娟, 严秋香, 李顺鹏

(南京农业大学生命科学学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

摘 要:从长期施用阿特拉津的玉米地中采集土样,通过富集培养的方法分离出一株能以阿特拉津为唯一碳、氮源生长的细菌 ADH-2,结合生理生化特性及 16S rRNA 基因的相似性分析将其初步鉴定为节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)。该菌在 10 h 内对 100 mg·L⁻¹ 阿特拉津的降解率为 99.9%。外加氮源能促进菌株的生长,但对阿特拉津的降解有轻微的抑制作用。外加蔗糖和葡萄糖能显著促进菌株的生长,但对阿特拉津的降解表现出显著的抑制。而淀粉既能促进菌株的生长又能促进阿特拉津的降解。对其降解基因的初步研究显示,该菌含有 *trzN*、*atzB* 和 *atzC* 3 个阿特拉津降解相关基因。通过与本实验室另外两株阿特拉津降解菌比较,菌株 ADH-2 具有更好的应用潜力。

关键词:阿特拉津;降解;ADH-2;降解相关基因

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)02-0406-05

Isolation, Identification and Characterization of an Atrazine-degrading Bacteria ADH-2

HAN Peng, HONG Qing, HE Li-juan, YAN Qiu-xiang, LI Shun-peng

(Department of Microbiology, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Key Lab of Environmental Microbiological Engineering, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China)

Abstract: Atrazine is a triazine group of pesticide used for the control of weeds in crops such as sorghum, maize, sugarcane, citrus, etc. Although atrazine has relatively low persistency in soil, its remnants has been found in much higher concentrations even years after application due to widespread use. Bioremediation is an effective and economic method to treat the environment that has been polluted by atrazine. So researchers paid much attention in this area. Most of this research focus on the isolating and characterizing bacteria with abilities to degrade atrazine. In the present study, a bacterial strain ADH-2 capable of utilizing atrazine as sole nitrogen and carbon source was isolated from soil samples collected from maize field suffered long-time application of atrazine by enrichment method. It was preliminarily identified as *Arthrobacter* sp. according to its physiological-biochemical characteristics and the similarity analysis of its 16S rRNA gene sequence (GeneBank Accession No.EF373977). Strain ADH-2 could degrade 99.9% of 100 mg·L⁻¹ atrazine within 10 h. Adding extra nitrogen source promoted the growth of strain ADH-2, but inhibited the degradation of atrazine slightly. The addition of glucose and sucrose showed a distinguished promoting effect to the growth and inhibitory effect to the degradation, while starch could promote both the growth and degradation. The atrazine-degrading related genes of ADH-2 were the combination of *trzN*, *atzB* and *atzC*. Compared with the other two atrazine-degrading bacterium isolated in the lab, ADH-2 showed good potentials in application.

Keywords: atrazine; degradation; ADH-2; degradation related genes

阿特拉津(Atrazine)是一种广泛应用于玉米、高粱、甘蔗等作物的均三氮苯类除草剂。虽然阿特拉津有很好的杂草防除效果,但是它会对一些后茬敏感作

物如小麦、大豆、水稻、瓜菜等产生药害^[1]。由于阿特拉津淋溶性好,易扩散,迁移率高,可以随排灌水和降水流失而造成地下水及江河污染^[2]。有试验表明长期低剂量的阿特拉津作用有诱发人类染色体破裂与生殖系统疾病的危险^[3]。阿特拉津的环境问题得到了广泛的关注,对受其污染环境的生物修复成为了农药污染控制领域的研究热点。目前,细菌、真菌和藻类对阿特拉津的降解作用均有报道,其中 *Pseudomonas* sp. strain ADP 对阿特拉津的降解途径现在已经被阐明,

收稿日期:2008-04-09

基金项目:国家自然科学基金项目(30400013);江苏省科技厅项目(BG2005322);江苏省教育厅项目(JHZD06-2);自然科技资源平台项目(2005DKA21201-2)

作者简介:韩 鹏(1982—),山东龙口人,在读硕士,主要从事环境微生物学研究。

通讯作者:洪 青 E-mail:hongqing@njau.edu.cn

它通过降解基因 *atzABCDEF* 编码的 6 个酶将阿特拉津完全矿化^[4-9]。近期分离到的阿特拉津降解菌 AG1、ADG1、SP12、TC1 则是 *trzN* 和 *atzBC* 基因的组合^[10-11]。本研究分离了一株以阿特拉津为唯一碳、氮源生长的菌株 *Arthrobacter* sp.ADH-2, 并对其降解特性和相关基因进行了研究, 以期为其在生物修复中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 培养基

LB 培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 蛋白胨 10.0, 酵母浸出物 5.0, NaCl 10.0, pH 7.0。

基础盐培养基(MSM, $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): NaCl 1.0, K_2HPO_4 1.5, KH_2PO_4 0.5, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, pH 7.0, 以阿特拉津作为碳、氮源, 浓度视需要添加。

1.2 菌株的分离

从长期施用阿特拉津的玉米地中取土样 5 g, 加入到含阿特拉津($100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的 MSM 培养基中进行富集培养, 每隔 7 d 取培养物接种到相同的富集培养基中, 转接量为 2%, 同时观察阿特拉津的降解情况(阿特拉津在水中的溶解度较小, 只有 $33\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 可以通过观察粉末的消失与否来判断其降解情况)。连续驯化 1 个月后, 取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 稀释涂布于添加阿特拉津($100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的 MSM 平板上, 置于 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养。挑取有透明圈的单菌落, 连续划线纯化培养 3 次, 得到纯化菌株。

1.3 菌株的鉴定

菌株形态及生理生化特性测定参照文献[12]进行。菌株 16S rRNA 基因的克隆及序列测定和比较参照文献[13], 提取 ADH-2 的基因组 DNA 作为模板, 进行 16S rRNA 基因的扩增。一对引物分别为: 正向引物: $5'\text{-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'}$, 反向引物: $5'\text{-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3'}$; 扩增条件为: $95\text{ }^\circ\text{C}$, 5 min; $94\text{ }^\circ\text{C}$, 0.5 min; $52\text{ }^\circ\text{C}$, 1 min; $72\text{ }^\circ\text{C}$, 1 min; 循环 30 次, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。采用 PCR 回收试剂盒回收 16S rRNA 的基因片段, 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物的大小(1.5 kb 左右)后, 将其 TA 克隆后进行测序(由 BIOAISA 公司完成)。测序结果通过在线分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)与 GenBank 中的 16S rRNA 基因序列进行相似性比较。

1.4 阿特拉津浓度的测定

以培养液和三氯甲烷按 1/10 的比例进行全量提取, 适当稀释后用 HPLC 检测。参考文献[14]、[15]进

行, 检测条件: $250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$ C_{18} 不锈钢色谱柱; 流动相为甲醇/水(80:20, V/V); 流速为 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温: $25\text{ }^\circ\text{C}$; Waters 2487 紫外检测器, 检测波长为 226 nm ; 进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

1.5 阿特拉津的降解试验

在阿特拉津浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的基础盐培养基中, 以 3% 的接种量接入用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS 缓冲液洗涤 2 次的在 LB 培养基中培养的 ADH-2 种子液($A_{600\text{ nm}}\approx 2.00$), 于 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养, 每隔 1 h 取样, 测定 $A_{600\text{ nm}}$ 及阿特拉津的浓度。

1.6 外加碳源、氮源对菌体的生长和降解阿特拉津的影响

以含有 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿特拉津的基础盐培养基为基础, 一组分别加入终浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖、蔗糖和淀粉作为外加碳源, 一组分别加入终浓度为 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 和 NH_4NO_3 作为外加氮源, 分别以 3% 的接种量接入用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS 缓冲液洗涤 2 次的在 LB 培养基中培养的 ADH-2 种子液($A_{600\text{ nm}}\approx 2.00$), 于 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养, 培养 8 h 后, 分别取样测定菌体的生长和阿特拉津降解情况。

1.7 阿特拉津相关降解基因的研究

按参考文献[16]进行, 对 *atzA* 保守区扩增的正向引物为 $5'\text{-CCA TGT GAA CCA GAT CCT-3'}$ 、反向引物为 $5'\text{-TGA AGC GTC CAC ATT ACC-3'}$, 扩增条件为: $95\text{ }^\circ\text{C}$, 10 min; $94\text{ }^\circ\text{C}$, 1 min; $50\text{ }^\circ\text{C}$, 1 min; $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min; 30 个循环, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 20 min; 对 *atzB* 保守区扩增的正向引物为 $5'\text{-TCA CCG GGG ATG TCG CGG GC-3'}$ 、反向引物为 $5'\text{-CTC TCC CGC ATG GCA TCG GG-3'}$, 扩增条件为: $95\text{ }^\circ\text{C}$, 10 min; $94\text{ }^\circ\text{C}$, 1 min, $58\text{ }^\circ\text{C}$, 1 min; $72\text{ }^\circ\text{C}$, 1 min; 30 个循环, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸, 20 min; 对 *atzC* 保守区扩增的正向引物为 $5'\text{-GCT CAC ATG CAG GTA CTC CA-3'}$ 、反向引物为 $5'\text{-GTA CCA TAT CAC CGT TTG CCA-3'}$, 扩增条件为: $95\text{ }^\circ\text{C}$, 10 min; $94\text{ }^\circ\text{C}$, 1 min; $45\text{ }^\circ\text{C}$, 1 min; $72\text{ }^\circ\text{C}$, 1 min; 30 个循环, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 20 min; 对 *trzN* 保守区扩增的正向引物为 $5'\text{-CAC CAGCACCTGTACGAAGG-3'}$ 、反向引物为 $5'\text{-GATTCCG AAC CATTCC AAA CG-3'}$, 扩增条件为: $95\text{ }^\circ\text{C}$, 10 min; $94\text{ }^\circ\text{C}$, 变性, 1 min; $50\text{ }^\circ\text{C}$, 1 min; $72\text{ }^\circ\text{C}$, 1 min; 30 个循环, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸, 20 min。琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物的大小, 将其 TA 克隆后进行测序(由 BIOAISA 公司完成), 测序结果通过在线分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 与 GenBank 中的基因序列进行相似性比较。

2 结果与讨论

2.1 阿特拉津降解菌株的分离和鉴定

通过富集培养分离出 1 株降解阿特拉津的菌株 ADH-2。该菌能以阿特拉津为唯一碳氮源生长。其在含阿特拉津 ($500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)MSM 平板上产生明显的透明圈(图 1A),菌落圆形、光滑、边缘整齐。革兰氏染色阳性,无鞭毛(图 1B),菌体在培养过程中有典型的球杆变化,在新鲜营养丰富的培养基中菌体是杆状,形成分枝,老龄培养物菌体变成球形,接触酶阳性,氧化酶阴性,不产芽孢,液化明胶,水解淀粉,严格好氧,硝酸盐还原阳性, 37°C 生长。

以 ADH-2 菌株的基因组 DNA 为模板,用细菌 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增,得到长度约为 1.5 kb 的扩增产物。测序后在 GenBank 上登录,序列号为 EF373977。将 ADH-2 的 16S rRNA 基因序列用 BLAST 程序和 GenBank 中已登录的 16S rRNA 基因序列进行序列同源性比较,ADH-2 与多株节杆菌属细菌的 16S rRNA 基因序列相似性均在 98% 以上,将这些序列进行聚类分析后构建系统发育树(图 2),ADH-2 与 *A. ureafaciens* DSM 20126 T X80744 同源性最高。结合形态及生理生化特征鉴定结果,将 ADH-2 鉴定为节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)。该菌与本试验以前分离的另两株节杆菌 AG1 和 ADG1 的 16S rRNA 基因序列相似性差异分别为 3.4% 和 2.6%^[11]。

2.2 ADH-2 的生长和阿特拉津降解的关系

从图 3 中可以看出,在起初的 4 h 内,菌株主要是把阿特拉津脱氯水解成代谢产物羟基阿特拉津,由于菌株对羟基阿特拉津的利用有一个适应期。因此,菌体基本没有生长,而阿特拉津的浓度却在下降。在后续的时间内,菌株利用羟基阿特拉津作为碳、氮源

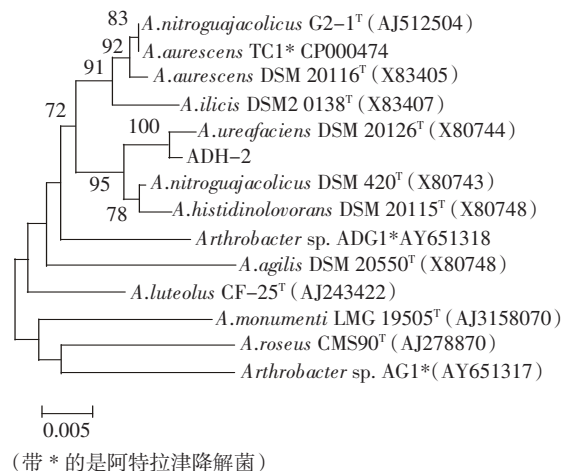


图 2 ADH-2 菌株基于 16S rRNA 基因序列同源性的系统发育树

Figure 2 16S rRNA phylogenetic analysis of ADH-2 with related 16S rRNA in GenBank (16S rRNA gene sequences of bacteria with "*" were atrazine-degrading bacteria)

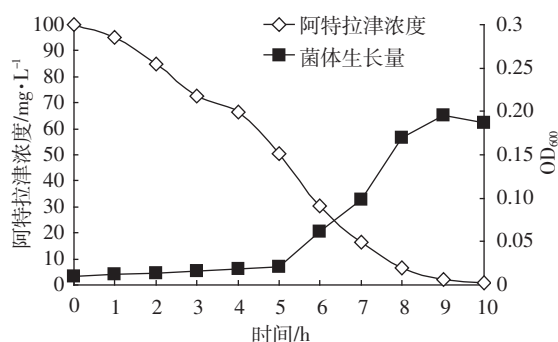
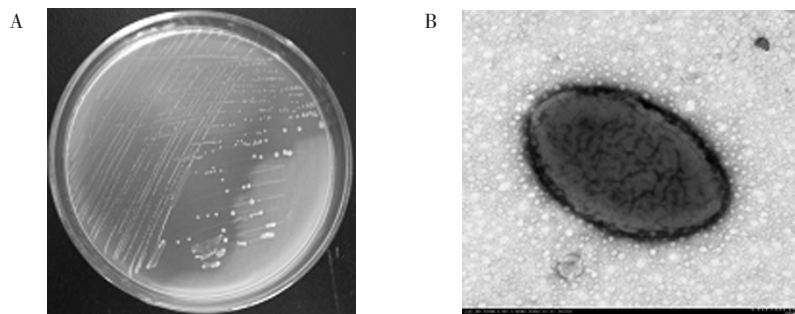


图 3 ADH-2 的生长和阿特拉津降解的关系

Figure 3 Relationship between growth of ADH-2 and degradation of atrazine

进行生长,降解和生长基本同步进行,到第 10 h 降解率达到 99.9%。对于本实验室报道的另外两株节杆菌属的阿特拉津降解菌 AG1 和 ADG1 而言,它们也是



(A) Colony of ADH-2 on MSM with $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ atrazine; (B) TEM picture of ADH-2 ($\times 12,000$)

图 1 ADH-2 的菌体和菌落特征

Figure 1 Colony and cell shape of ADH-2

经过了大概4 h的延滞期,随后菌体的生长和阿特拉津降解呈正相关。但是15 h后,溶液中的阿特拉津浓度还维持在 $3\sim 4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,并且随着时间的延长不再下降。可见它们对低浓度阿特拉津的降解效果不好(图4、5)。鉴于我国农田中阿特拉津的田间残留量一般在 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 以下,因此ADH-2菌株在降解低浓度阿特拉津方面更有优势,具有更好的田间应用前景。

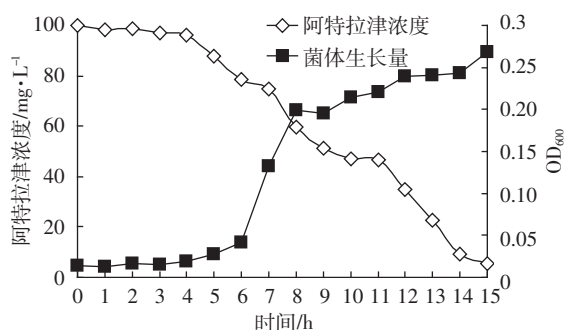


图4 ADG1的生长和阿特拉津降解的关系

Figure 4 Relationship between growth of ADG1 and degradation of atrazine

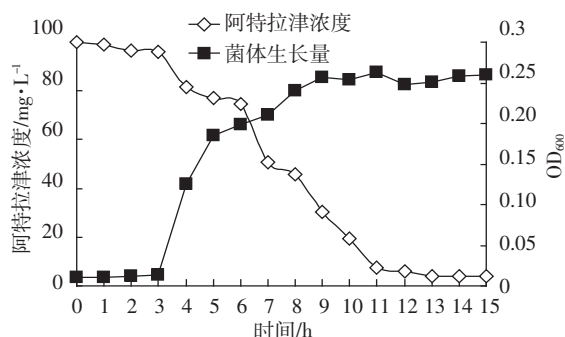


图5 AG1的生长和阿特拉津降解的关系

Figure 5 Relationship between growth of AG1 and degradation of atrazine

2.3 外加碳、氮源对菌株降解阿特拉津的影响

许多阿特拉津降解菌都是以阿特拉津为氮源进行生长并将它降解,因此外加氮源会抑制菌株对阿特拉津的利用和降解。对于菌株 *Pseudomonas* sp. strain ADP 而言,当生长培养液中同时有铵盐、尿素、硝酸盐和阿特拉津时,它几乎不降解阿特拉津^[17]。

在本研究中,和以阿特拉津为唯一碳、氮源的对照(CK)相比,外加氮源($0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaNO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 和 NH_4NO_3)对ADH-2的生长有一定的促进作用,而对阿特拉津的降解却表现出有轻微抑制作用。而外加碳源($1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖、蔗糖、淀粉)对ADH-2菌株降解阿特拉津的影响差别较大。蔗糖和葡萄糖对

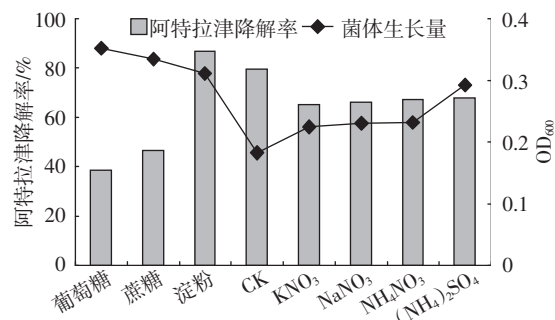


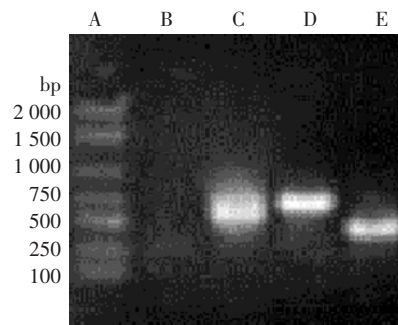
图6 添加不同碳氮源对ADH-2的生长和阿特拉津降解的影响

Figure 6 Effect of adding carbon or nitrogen sources on atrazine degrading and growth of ADH-2

生长表现出显著的促进,而对降解表现出显著的抑制,淀粉对生长和降解都表现出促进效应(图6)。AG1和ADG1均不水解淀粉,而且也没有发现外加碳、氮源对它们降解阿特拉津有明显的促进效果^[11]。

2.4 ADH-2中阿特拉津降解相关基因保守片段的检测

以ADH-2的总DNA作为模板,分别采用保守的特异性引物进行扩增后,获得了 *atzB*、*atzC* 和 *trzN* 的保守片段,没有扩增到 *atzA* 的保守片段(图7),表明ADH-2不含有 *atzA* 基因,测序结果用BLAST软件在GenBank进行同源性比较,结果 *trzN* 与报道的相应片段相似性为99%,*atzB*、*atzC* 基因片段与菌株 *Pseudomonas* sp. strain ADP 的相应片段相似性分别为100%和99%。这些结果表明与基因 *atzABC* 一样,在世界不同地区分离的降解菌中 *trzN* 基因也是高度保守的。ADH-2中阿特拉津的降解相关基因组合与报道的 *Arthrobacter aureus* TC1 菌株以及AG1、ADG1含有相同的基因组合,都是 *trzN*、*atzB* 和 *atzC* 的组合。在已报道的阿特拉津降解菌株中,降解相关基因大都



A:DL2000 marker;B:PCR product of *atzA* fragment;C:PCR product of *atzB* fragment;D:PCR product of *atzC* fragment;E:PCR product of *trzN* fragment

图7 阿特拉津相关降解基因 *atzABC* 和 *trzN* 保守片段的检测

Figure 7 PCR detection of atrazine-degrading related genes fragment of ADH-2

被定位在质粒上^[9-11,18]。本研究采用碱裂解法与煮沸法在 ADH-2 中均没有检测到质粒,初步判断降解相关基因定位于染色体上。

3 结论

本研究从节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)中分离到 1 株可以利用阿特拉津为唯一碳、氮源生长的细菌 ADH-2。外加氮源能促进菌株的生长但对阿特拉津的降解有轻微的抑制作用。外加蔗糖和葡萄糖能显著促进菌株的生长但对阿特拉津的降解表现出明显的抑制效应,而淀粉既能促进菌株的生长又能促进阿特拉津的降解。ADH-2 的阿特拉津相关降解基因是 *trzN*、*atzB* 和 *atzC* 的组合。ADH-2 菌株在降解低浓度阿特拉津方面更有优势,具有更好的田间应用前景。

参考文献:

- [1] Solomon K R, Baker D B, Richards R P, et al. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters[J]. *Environ Toxicol Chem*, 1996, 15(1):31-76.
- [2] Storrs S I, Kiesecker J M. Survivorship patterns of larval amphibians exposed to low concentrations of atrazine[J]. *Environ Health Perspect*, 2004, 112(10):1054-1057.
- [3] Betancourt M, Reséndiz A, Fierro E C. Effect of two insecticides and two herbicides on the porcine sperm motility patterns using computer-assisted semen analysis (CASA) in vitro[J]. *Fierro Toxicol*, 2006, 22: 508-512.
- [4] De Souza M L, Wackett L P, Bound-Mills K L, et al. Cloning, characterization, and expression of a gene region from *Pseudomonas* sp. strain ADP involved in the dechlorination of atrazine[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61:3373-3378.
- [5] De Souza M L, Sadowsky M J, Wackett L P. Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP: gene sequence, enzyme purification, and protein characterization[J]. *J Bacteriol*, 1996, 178:4894-4900.
- [6] Bound-Mills K L, de Souza M L, Mandelbaum R T, et al. The *atzB* gene of *Pseudomonas* sp. strain ADP encodes the second enzyme of a novel atrazine degradation pathway[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 916-923.
- [7] Sadowsky M J, Tong Z, de Souza M, et al. Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP: gene sequence, enzyme purification, and protein characterization[J]. *J Bacteriol*, 1998, 180:152-158.
- [8] Shapir N, Osborne J P, Johnson G, et al. Purification, substrate range, and metal center of AtzC: the N-isopropylammelide aminohydrolase involved in bacterial atrazine metabolism[J]. *J Bacteriol*, 2002, 184: 5376-5384.
- [9] Martinez B, Tomkins J, Wackett L P, et al. Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP[J]. *J Bacteriol*, 2001, 183:5684-5697.
- [10] Piutti S, Semon E, Landry D, et al. Isolation and characterization of *Novicardioides* sp. SP12, an atrazine-degrading bacterial strain possessing the gene *trzN* from bulk- and maize rhizosphere soil[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 221:111-117.
- [11] 代先祝, 胡江, 蒋建东, 等. 污染土壤中阿特拉津降解菌的分离和鉴定[J]. 土壤学报, 2006, 43(3):467-472.
- [12] DAI Xian-zhu, HU Jiang, JIANG Jian-dong, et al. Isolation and identification of in situ atrazine-degrading bacteria from contaminated soils[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43(3):467-472.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001:370-410.
- [12] DONG Xiu-zhu, CAI Miao-ying. Manual of systematic and determinative bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2001:370-410.
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M] (2nd ed.). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.
- [14] 《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法(第四版)[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002:600-602.
- [14] Standard Method for the Examination of Water and Wastewater Editorial Board. Water and waste water monitor analysis method[M]. (Fourth edition). Beijing: Chinese Environmental Science Publishing Company, 2002: 600-602.
- [15] Mandelbaum R T, Allan D L, Wackett L P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(4):1451-1457.
- [16] De Souza M L, Seffernick J, Martinez B, et al. The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved[J]. *J Bacteriol*, 1998, 180:1951-1954.
- [17] García-González V, Govantes F, Shaw L J, et al. Nitrogen control of atrazine utilization in *Pseudomonas* sp. strain ADP[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(12):6987-6993.
- [18] Sajjaphan K, Shapir N, Wackett L P, et al. *Arthrobacter* *aureus* TC1 atrazine catabolism genes *trzN*, *atzB* and *atzC* are linked on a 160-kilobase region and are functional in *Escherichia coli*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70:4402-4407.