

异养硝化细菌的分离及其硝化特性实验研究

林燕, 孔海南, 何义亮, 严立, 李春杰

(上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240)

摘要: 采用将传统微生物学方法与现代分子生物学手段相结合的新型异养硝化细菌的分离筛选方法, 从具有 80.1% 的 SND 效果的 MBR 系统中分离筛选出 2 株异养硝化细菌, 通过生理生化实验、16S rDNA 的序列分析, 认定为属新报道的异养型硝化细菌。通过批式试验考察了分离纯化得到的异养硝化细菌的硝化性能。结果表明, *Bacillus* sp. LY 及 *Brevibacillus* sp. LY 具有异养微生物的性质, 在充分利用有机碳进行有氧呼吸的同时还具有较强的硝化及脱氮能力: 24d 好氧培养后, COD 的去除率分别为 71.7% 及 52.6%; 氨氮的转化率分别为 78.2% 及 51.2%; 总氮的转化率分别为 69.2% 及 35.6%。

关键词: 分离; *Bacillus* sp. LY; *Brevibacillus* sp. LY; 异养硝化; 硝化特性

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)02-0324-05

Isolation and Characterization of Heterotrophic Nitrifying Bacteria

LIN Yan, KONG Ha'n'an, HE Yi'liang, YAN Li, LI Chun'jie

(School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Method of isolating the heterotrophic nitrifiers and the characterization of the heterotrophic nitrification were studied. Two heterotrophic nitrifiers were newly isolated from a membrane bioreactor (MBR) in which the TN removal efficiency was 80.1%. The batch test results indicate that *Bacillus* sp. LY and *Brevibacillus* sp. LY could utilize the organic carbon as the source of assimilation when they grew on glucose and ammonium chloride medium accompanying the formation of oxidized nitrogen. After 24 days incubation, the removal efficiencies of the COD by *Bacillus* sp. LY and *Brevibacillus* sp. LY were 71.7% and 52.6%, respectively. The removal efficiencies of ammonium nitrogen by the two isolates were 78.2% and 51.2% and the TN removal efficiencies by the two isolates were 69.2% and 35.6%, respectively.

Key words: isolation; *Bacillus* sp. LY; *Brevibacillus* sp. LY; heterotrophic nitrification; nitrifying characterization

废水生物脱氮是目前水处理领域中关注和研究热点, 其中对异养硝化作用及其菌属的研究, 是对传统硝化理论的丰富与突破。相对于自养硝化菌而言, 虽然有的异养菌的分解效率较低, 但是由于它们在环境中的数量以及生长速率上往往远大于自养菌, 因此在某些环境之中, 异养硝化作用的贡献可以与自养菌相当, 甚至超出^[1]。关于异养硝化作用, 虽然目前仍有很多机理未得到解释, 对一些现象的解释也不尽圆满, 但异养硝化作用的重要性日益受到关注^[2~4]。

本文在膜生物反应器 (Membrane Bioreactor, MBR) 实现稳定高效同步硝化反硝化 (Simultaneous Nitrification and Denitrification, SND) 效果的基础上, 采用将传统微生物学方法与现代分子生物学手段相结合的新型异养硝化细菌分离筛选方法, 对系统中异养硝化细菌进行了分离筛选, 通过生理生化实验、16S rDNA 序列分析, 对分离筛选获得菌株进行了分析。同时采取批式实验对分离菌株的异养硝化性能进行了进一步的试验研究, 为开发设计新的脱氮工艺, 提高脱氮效率, 提供一定理论及技术

基础。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

取自运行稳定且具有 80.1% SND 效果的 MBR 系统。

1.2 异养硝化细菌的分离筛选

1.2.1 分离平板

牛肉膏-蛋白胨固体培养基, 其配方为: 牛肉膏 $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 蛋白胨 $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, NaCl $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 琼脂 $15\sim 20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.2.2 样品的稀释

吸取 MBR 中活性污泥 20mL 加入到盛有 180mL 的无菌蒸馏水和玻璃珠 (分散用) 的 500mL 三角瓶中, 塞上灭菌的棉花塞, 于恒温振荡器上以 $100\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下振荡 10h, 而后进行 10 倍浓

收稿日期: 2005-02-04; 修订日期: 2005-03-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20176027)

作者简介: 林燕 (1976~), 女, 博士, 主要从事废水生物处理方面的研究, E-mail: linyansjtu@yahoo.com

度梯度稀释至 10^{-10} 。

1.2.3 细菌的纯化分离

在制备好的牛肉膏-蛋白胨固体培养基上,从各个稀释度的稀释液里均取 0.1mL 分别稀释涂布至固体平板上(每个稀释度 3 个重复),于生化培养箱 30℃下培养。

在形成菌落的平板内,挑选出大约 100 个单菌落的平板。将单菌落用接种环挑出,划线分离。待形成菌落后,再用接种环移植到固体培养基上,30℃条件下培养,然后挑取一接种环的细菌菌苔放到无菌水中,充分振荡。用此细菌悬液,按照活菌数测定方法在平板上涂布,使其在培养皿上形成 30~50 个单菌落,而后把单菌落按照上述方法再挑菌一次,反复 2~3 次。并以不接菌的平板做空白对照。

1.2.4 液体纯培养的硝化活性验证

将牛肉膏-蛋白胨固体培养基上生长的纯菌菌苔用接种环挑取适量接种于氨氧化能力鉴定培养基:葡萄糖 $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, NaCl $0.3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.03\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, CaCO_3 $7.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 30℃条件下振荡培养,培养期间每隔 3d 取 2mL 培养液至洁净试管,将格利斯试剂 1~2 滴直接点滴入试管中进行硝化活性确认^[5],并以不接纯化菌株的氨氧化能力鉴定培养基作空白对照。如现红色乃至褐色,则说明由于硝化作用而积蓄了亚硝酸盐。2~3min 后再在未显色的试管中加入锌粉少许,静置,观察是否呈现红色。如加入锌粉后显红色,则说明培养液中的产生了硝酸盐。即菌株也具有硝化活性,初步确认为硝化活性菌。

1.3 荧光原位杂交技术检验验证所分离的异养硝化细菌

本文根据自养硝化细菌 16S rRNA 序列设计的探针 Nso1225 (CGCCATTGTATTACGTGTGA) 为变形细菌 *B-proteobacteria* 类的通用探针;探针 NIT3 (CCTGTGCTCCATGCTCCG) 可检测出 Nitrobacter 类的硝化杆菌^[6]。使用的探针 EUB338 (GCTGCCTCCCGTAGGAGT) 为样品总菌数的检测,以确保样品中有足够检出量的 rRNA。具体检测过程如下。

1.3.1 预处理及固定

在 60℃水浴中向 $3\times\text{PBS}$ 溶液中加入多聚甲醛,0.2μm 滤头的针筒过滤。将含分离菌的混合培养液 0.5mL 加入到 1.0mL 以上固定液中。在 4℃下 $15\,000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10min,弃上清液, PBS 洗涤 2

次,离心。准确加入 1mL PBS 与 99.5% 的乙醇(体积分数 1:1)溶液。

1.3.2 原位杂交过程

样品用超声波仪清洗后,取上清液置于 1.5mL 的离心管,用 PBS 稀释一定倍数振动后将适量菌液滴加到涂有明胶的载玻片上,用吹风机(冷档)吹干。依次用 50%、80%、98% 的乙醇水溶液脱水,在冰浴中用溶菌酶溶液处理,再用乙醇水溶液脱水,空气中干燥。

将探针加入杂交缓冲液中,46℃下杂交 2h,然后用洗涤缓冲液洗涤,空气中风干。将风干后的样品立即用荧光共焦激光扫描显微镜(TCS4D; Leica Lasertechnik, Germany)进行观察,并将观察的图片拍摄(样品送至日本国立环境研究所完成检测)。

1.4 氮轨迹跟踪试验

为了研究分离筛选的纯化菌株在好氧条件下的硝化能力,进行了氮轨迹跟踪试验。实验中应用培养基的具体配比见表 1。

表 1 氮轨迹跟踪试验中,营养溶液各成分配比列表

Table 1 The average concentration of substrates in culture in the batch test

成分	浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
葡萄糖	0.467
氯化铵	0.191
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.009
H_3BO_3	0.011
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.214
$\text{MnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.006
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.010
CaCl_2	0.111
NaCl	8.0

首先在无菌条件下取 30mL 处于对数生长期的实验菌液以 $4\,000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的转速离心 10min,去除上清液,用无菌水冲洗后再离心,反复 3 次,最后用无菌水配成 5mL 的菌悬液。将此菌悬液加入上述不同碳源和氮源的培养基中,于 $35\text{℃}\pm 2\text{℃}$ 回旋式气浴恒温振荡器上振荡培养,恒定转速 $110\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。每隔一定时间取出一定量的溶液,经过滤预处理后,测定滤过液 COD、 NH_4^+-N 、 NO_2^--N 、 NO_3^--N 、TN 等指标的变化^[7],实验期间 pH 值用磷酸盐缓冲液调节至 8.0 左右。

所有结果均以不接种细菌的经灭菌的混合营养培养基作对照,以了解分离菌株的异养硝化效果。在实验过程中,为了确定实验混合液是否被杂菌污染,每周培养后将培养菌在平板上涂布以确定其是否纯

化. 另外, 为了将 D_{600} 值与混合液中细菌数量相对应, 用血小板计数法对一系列不同 D_{600} 值的细菌数目进行了两者之间关系的拟合, 得到 D_{600} 值与血小板计数结果之间的关系.

2 结果与讨论

2.1 分离的目的菌株的形态及生理生化特性

实验初始由 MBR 系统混合菌群中分离得到 281 株细菌, 在对其硝化性能验证后从中筛选出能够产生 $\text{NO}_x^- - \text{N}$ 的菌株 39 株, 截止目前对其中 2 株菌株进行了硝化性能实验研究, 分别编号为 B1 及 B2, 并分别进行了相关的细菌学鉴定以及生理生化试验研究, 结果如下.

菌株 B1 在牛肉膏蛋白胨培养基平板上培养 1 ~ 2d 后形成的菌落呈乳白色, 不透明, 革兰氏阳性芽孢杆菌, 细菌大小为 $(0.5 \sim 0.6) \mu\text{m} \times (1.6 \sim 2.6) \mu\text{m}$ (见图 1), 具球杆变化周期, 60°C 不生长, 不具抗酸性. 接触酶阳性, V-P 试验阴性, 淀粉水解阴性, 厌氧洋菜不生长, 葡萄糖不产酸, 除个别生理生化特征 (可利用葡萄糖做有机碳源等) 外, 其主要特征与 *Bacillus macroides* 基本一致^[8].

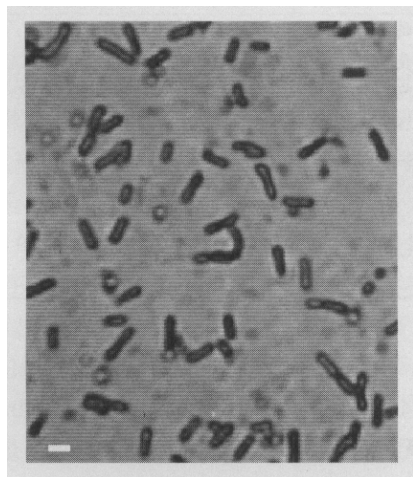


图 1 菌株 B1 的显微摄影照片 (标记长度为 $1\mu\text{m}$)

Fig. 1 Microphotograph of strain B1 (Bar $1\mu\text{m}$)

菌株 B2 在牛肉膏蛋白胨培养基平板上培养 1d 后形成的菌落呈乳白色偏灰, 不透明, 细菌大小为 $(0.4 \sim 0.6) \mu\text{m} \times (1.2 \sim 2.1) \mu\text{m}$ (见图 2), 具球杆变化周期. 革兰氏染色实验中, 菌株在培养初期为呈阳性的芽孢杆菌, 但革兰氏染色不稳定, 在生长至 7d 左右染色却呈阴性, 且菌落变至褐色. 60°C 不生长, 不具抗酸性. 接触酶阳性, V-P 试验阳性, 淀粉水解阴性, 厌氧洋菜不生长, 葡萄糖产酸, 除个别生理生

化特征 (不具抗酸性, 不在铵态氮上生长) 外, 其主要特征与短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus*) 基本一致^[8].

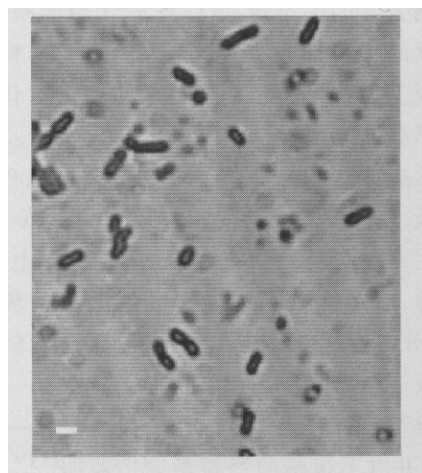


图 2 菌株 B2 的显微摄影照片 (标记长度为 $1\mu\text{m}$)

Fig. 2 Microphotograph of strain B2 (Bar $1\mu\text{m}$)

2.2 FISH 试验结果及分析

从样品的荧光原位杂交结果来看, 在样品中有足够检出量的 rRNA 的条件下 (见用探针 EUB338 的结果, 图 3 及图 4 所示), 用针对变形细菌 β -proteobacteria 类的通用探针 Nso1225 (CGCCATT GTATTACGTGTGA) 及检测 *Nitrobacter* 类的硝化杆菌探针 NIT3 (CCTGTGCTCCATGCTCCG) 均未有自养硝化细菌检出.

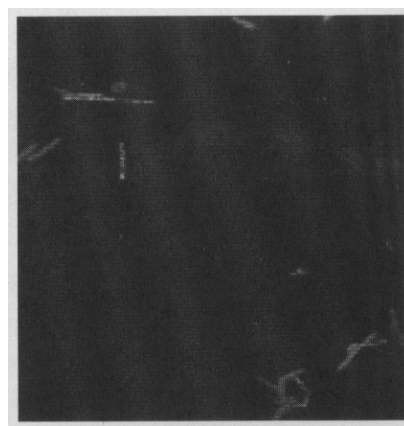


图 3 以 EUB338 为探针, 菌株 B1 的 FISH 分析图

Fig. 3 FISH micrograph of strain B1 using probe Eub338 for demonstration of the presence of sufficient target rRNA in samples

探针的选择依据: 自养型氨氧化细菌分布在 5 个属中, 其中除了 *Nitrosococcus* 属的一部分菌株外, 均属于 β -proteobacteria^[9], 根据所分离细菌的形态学分析, 菌株 B1 及 B2 属于杆菌属, 形态与 *Nitrosococcus* 属 (球状至椭球状) 相差较大, 因此选

用针对 β -proteobacteria 的特异探针 Nso1225; 自养型亚硝酸氧化细菌分别在 4 个属中, 其中 *Nitrobacter* 属及 *Nitrospira* 属均可异养生长^[10, 11], 根据所分离细菌的形态学分析, 菌株 B1 及 B2 呈杆状, 与 *Nitrospira* 属(疏松螺旋状)相差较大, 因此选取针对 *Nitrobacter* 属的 NIT3 探针进行检验.

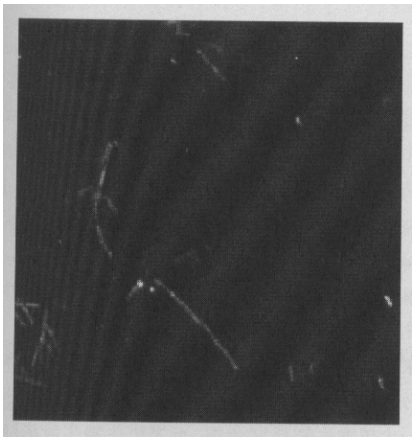


图 4 以 EUB338 为探针, 菌株 B2 的 FISH 分析图
Fig. 4 FISH micrograph of strain B2 using probe Eub338 for demonstration of the presence of sufficient target rRNA in samples

试验结果显示, 在应用上述探针进行杂交实验中, 并没有检测出目标菌株的存在, 此试验结果排除了所分离细菌为自养硝化细菌的可能, 此类研究在国内外的报道甚少, 本文后续对分离的纯化菌株进行了 16S rDNA 序列分析.

2.3 16S rDNA 的 PCR 扩增和测序结果

菌株 B1 16S rRNA 基因序列与 *Bacillus* sp. ZYM 16S ribosomal RNA gene 相似性最高, 达到为 99.7%, 与另外 4 株菌株: *Bacillus fusiformis* strain Z1, *Bacillus macroides* strain LMG 18474, *Bacillus* sp. TUT1008 以及 *Bacillus fusiformis* strain S10 的相似性也在 99% 以上. 菌株 B1 在 GenBank 中名称为 *Bacillus* sp. LY, 其 16S rRNA 基因序列的登录号为 AY787805.

菌株 B2 16S rRNA 基因序列与 *Brevibacillus invocatus* strain LMG 18167 16S ribosomal RNA gene 相似性最高, 达到 99.7%, 与另外 4 株菌株: *Brevibacillus* sp. R-6774, *Brevibacillus invocatus* gene, *Brevibacillus invocatus* strain LMG 18962 以及 *Brevibacillus* sp. R-7745 的相似性分别为 99.6%, 99.1%, 98.9% 及 98.9%. 菌株 B2 在 GenBank 中名称为 *Brevibacillus* sp. LY, 其 16S rRNA 基因序列的登录号为 AY873841.

上述菌株均未见有关异养硝化方面的研究与报道, 本研究中分离的菌株 *Bacillus* sp. LY 及 *Brevibacillus* sp. LY 属于新分离得到的新型异养硝化细菌

2.4 异养硝化菌的硝化特性试验

在采用葡萄糖-氯化铵做碳源及氮源检验微生物硝化性能时, 经过 24d 的好氧培养, 系统中 *Bacillus* sp. LY 及 *Brevibacillus* sp. LY 2 株细菌对 COD, TN 及 NH_4^+ -N 的平均去除率的去除率如表 2 所示.

表 2 24d 培养后, 在 *Bacillus* sp. LY 及 *Brevibacillus* sp. LY 的作用下, COD, TN 及 NH_4^+ -N 的平均去除率

Table 2 The average removal rates of COD, TN, and ammonium nitrogen after 24 days incubation by *Bacillus* sp. LY and *Brevibacillus* sp. LY

项目	各物质变化	纯化菌株	
		<i>Bacillus</i> sp. LY	<i>Brevibacillus</i> sp. LY
COD	初始浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	424.28	589.63
	结束浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	120.00	279.58
	去除率/%	71.7	52.6
TN	初始浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	50.20	48.21
	结束浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	15.48	31.05
	去除率/%	69.2	35.6
NH_4^+ -N	初始浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	45.30	40.71
	结束浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	9.89	19.88
	去除率/%	78.2	51.2
NO_x^- -N	初始浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.98	2.80
	最高积累浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.63	3.30

表 2 数据显示, 经过 24d 好氧培养, 在 *Bacillus* sp. LY 及 *Brevibacillus* sp. LY 的作用下, COD 及总氮(TN) 浓度均呈现出降低的趋势, 证实了这 2 株细菌具有可利用有机物及良好的脱氮性能, 系统中 *Bacillus* sp. LY 及 *Brevibacillus* sp. LY 2 株细菌对 COD 的去除率分别为: 71.7% 和 52.6%, 说明 *Bacillus* sp. LY 和 *Brevibacillus* sp. LY 可利用有机物进行异化分解和同化合成, 具有异养生物的性质, 可以充分利用有机碳源合成生命体.

Bacillus sp. LY 及 *Brevibacillus* sp. LY 对 TN 的去除率分别为: 69.2% 和 35.6%, 结合表 3 中 2 菌株在培养后期 COD 浓度、菌体数目、菌体含氮量及反映混合液中细菌体密度的 D_{600} 值的变化分析了纯化菌株的硝化性能.

表 3 中结果显示, 在培养的后期, *Bacillus* sp. LY 的菌体含氮量由第 2d 的 $20.57\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 下降至第 24d 的 $8.65\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, *Bacillus* sp. LY 及 *Brevibacillus* sp. LY 2 个培养上清液中 NH_4^+ -N 浓度也出现了下降, 分别降低了 $17.21\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 及

8.09mg•L⁻¹, 因此滤过液中的氨氮浓度的下降显然不是由于同化合成作用造成的, 而是由去除氨氮的另外一个途径, 硝化作用所引起的. 实验结果显示, *Bacillus* sp. LY 及 *Brevibacillus* sp. LY 同化合成作用结束之后发生的硝化作用使氨氮的去除效率为 63.5% 及 28.9%.

表 3 *Bacillus* sp. LY 和 *Brevibacillus* sp. LY 在培养后期 *D*₆₀₀ 值、COD 浓度、细菌数目及菌体含氮量的变化

Table 3 The changes of COD concentration and *D*₆₀₀ value in the liquid and the number of cells and nitrogen quantity in the bacteria during the final incubation by *Bacillus* sp. LY and *Brevibacillus* sp. LY.

项目	各物质变化	纯化菌株	
		<i>Bacillus</i> sp. LY	<i>Brevibacillus</i> sp. LY
COD /mg•L ⁻¹	稳定增长期初始	137.36	217.53
	第 24d	120.00	275.11
<i>D</i> ₆₀₀	稳定增长期初始	0.365	0.309
	第 24d	0.270	0.178
菌体数目 /个•mL ⁻¹	稳定增长期初始	4.452 × 10 ¹²	1.449 × 10 ¹¹
	第 24d	1.689 × 10 ¹²	2.857 × 10 ¹⁰
菌体含氮量 /mg•L ⁻¹	稳定增长期初始	20.57	0.888
	第 24d	8.65	0.175

3 结论

(1) 采用传统微生物学方法与现代分子生物学手段相结合的新型异养硝化细菌的分离筛选方法可以分离筛选获得异养硝化细菌.

(2) 分离筛选得到菌株 B1 主要特征与 *Bacillus macroides* 基本一致; 菌株 B2 主要特征与 (*Brevibacillus*) 基本一致. 与分离菌株 B1 相似性最高的为 *Bacillus* sp. ZYM 16S rRNA; 与菌株 B2 相似性最高的为 *Brevibacillus invocatus* strain LMG 18167.

(3) *Bacillus* sp. LY 及 *Brevibacillus* sp. LY 具有异养微生物的性质, 可以充分利用有机碳进行有

氧呼吸, 24d 好氧培养后, 对 COD 的去除率分别为 71.7% 及 52.6%.

(4) *Bacillus* sp. LY 及 *Brevibacillus* sp. LY 具有较强的硝化能力, 24d 好氧培养后, 对氨氮的转化率分别为 78.2% 及 51.2%; 对总氮的转化率分别为 69.2% 及 35.6%.

参考文献:

[1] Brierley E D R, Wood M. Heterotrophic nitrification in an acid forest soil: isolation and characterisation of a nitrifying bacterium [J]. Soil Biol. Biochem., 2001, **33**: 1403~ 1409.

[2] Lin Y, Kong H N, He Y L, et al. Simultaneous Nitrification and Denitrification in a Membrane Bioreactor and Isolation of Heterotrophic Nitrifying Bacteria[J]. Japanese Journal of Water Treatment Biology, 2004, **40**(3): 105~ 114.

[3] 吕锡武, 李锋, 稻森悠平, 等. 氨氮废水处理过程中的好氧反硝化[J]. 给水排水, 2000, **26**(4): 17~ 20.

[4] 温东辉, 唐孝炎. 异养硝化及其在污水脱氮中的作用[J]. 环境污染与防治, 2003, **25**(5): 283~ 285.

[5] [日] 土壤微生物研究会编, 土壤微生物实验法[M]. 北京: 科学出版社, 1983.

[6] Mobarry B K, Wagner M, Urbain V, et al. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1996, **62**: 2156~ 2162.

[7] APHA-AWWA-WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater[S]. 19th ed, American Public Health Washington DC: Association, 1995.

[8] [美] 戈登 RE, 海恩斯 WC, 等, 著. 蔡妙英, 刘聿太, 等译. 芽孢杆菌属[M]. 1983. 74~ 76.

[9] Koops H P, Pommerening-Roser A. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species[J]. FEMS Microbiol. Ecol., 2001, **37**: 1~ 9.

[10] Teske A, Alm E, Regan J M, et al. Evolutionary relationships among ammonia and nitrite oxidizing bacteria [J]. J. Bacteriol., 1994, **176**(21): 6623~ 6630.

[11] Orso S, Gouy M, Navarro E, et al. Molecular phylogenetic analysis of *Nitrobacter* spp. [J]. Int. J. Syst. Bacteriol., 1994, **44**: 83~ 86.