

嗜热溶胞菌 SY-14 的基本特性研究

宋玉栋, 胡洪营*, 席劲瑛

(清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点联合实验室环境生物学研究所, 北京 100084)

摘要: 对从污泥堆肥中分离得到的具有溶胞能力的嗜热芽孢杆菌 SY-14 进行了初步鉴定, 并对其生长、产酶及溶胞特性进行了研究. 根据菌株形态及 16S rDNA 测序结果, SY-14 为土芽孢杆菌属 (*Geobacillus* sp.). SY-14 最适生长温度 60℃ 左右, 最适生长 pH 为 6.0~7.0. SY-14 培养上清液对完整和加热灭活后的微生物细胞都具有溶胞能力, 6 h 的细胞溶解率分别可达到 70% 和 85%, 上清液经过热处理后溶胞能力明显下降, 表明溶胞能力主要来自于酶的作用. 间歇培养过程中, SY-14 培养上清液溶胞活性在对数生长期快速升高, 进入稳定期前后达到最大, 之后快速下降. SY-14 培养上清液对受试的 5 株革兰氏阴性菌及部分革兰氏阳性菌都具有溶胞能力.

关键词: 嗜热菌; 溶胞; 胞外酶; 土芽孢杆菌 SY-14; 污泥处理

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)09-2106-06

Characterization of Thermophilic Strain SY-14 with Capability to Lyse Bacterial Cells

SONG Yu-dong, HU Hong-ying, XI Jin-ying

(Division of Environmental Microbiology, Environmental Simulation and Pollution Control State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: One spore-forming thermophilic bacterial strain SY-14, isolated from sewage sludge compost, showed significant capability to lyse bacterial cells. The strain was identified as *Geobacillus* sp. based on morphological characteristics and homology identification of 16S rDNA sequence. The optimal temperature and pH for growth were about 60℃ and pH 6.0~7.0 respectively. The culture supernatant of SY-14 showed lytic activity against both intact and thermal inactivated bacterial cells, and the cell lysis percentages at 6 hours were 70% and 85% respectively. The lytic activity of the culture supernatant decreased significantly after heat treatment, which inferred the lytic activity mainly derived from extracellular lytic enzymes of SY-14. The lytic activity of the culture supernatants of SY-14 increased significantly during the log phase in the batch culture process, and then decreased quickly after the maximum activity was reached. The culture supernatant of SY-14 showed lytic activity against all the five tested Gram-negative strains and some tested Gram-positive strains.

Key words: thermophilic bacteria; lysis; extracellular enzyme; *Geobacillus* sp. SY-14; sludge treatment

活性污泥工艺是目前普遍采用的生活污水及有机工业废水处理工艺, 其主要缺点是产生大量的剩余活性污泥. 微生物细胞是剩余活性污泥的主要组分, 微生物细胞壁的存在妨碍了剩余活性污泥的生物处理和污泥物质的资源化利用, 因此用于溶解剩余活性污泥中微生物细胞的技术, 即剩余活性污泥溶胞技术成为当前污泥处理领域的研究热点之一. 该技术可作为污泥厌氧消化等生物处理的预处理^[1-4], 用于开发低剩余污泥产率的污水处理工艺^[5-8], 为污水生物脱氮除磷工艺提供碳源^[1,9]及从剩余污泥中回收氮磷资源^[10]等. 目前研究的剩余污泥溶胞技术包括超声^[11,12]、热水解^[13,14]、机械破碎^[1,15]、臭氧氧化^[6,10]、酸碱处理^[16,17]和生物溶胞^[18-20]等. 其中生物溶胞技术由于设备简单、反应条件温和且不需要投加化学试剂, 具有较好的发展潜力. 利用嗜热菌进行溶胞是生物溶胞技术的一个重要分支^[18-20], 其原理是利用嗜热菌产生的胞外酶

水解微生物细胞壁, 其关键之一是分离和筛选具有高效溶胞能力的嗜热菌.

目前国内针对利用微生物酶溶解微生物细胞的研究还较少, 利用嗜热菌产生的溶胞酶溶解其他微生物细胞的研究更少. 由于微生物细胞的溶解是剩余活性污泥处理过程中的重要步骤, 因此开展该方面的研究将有利于改善剩余活性污泥的处理并促进其资源化利用. 前期研究中从污泥堆肥中筛选出 1 株具有溶胞能力的嗜热菌, 本实验对其特性进行了初步研究.

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2006-11-15; 修订日期: 2007-01-15

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2004AA601061)

作者简介: 宋玉栋(1982~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: syd99@mails.tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: hyhu@tsinghua.edu.cn

1.1.1 菌株

所用嗜热菌为前期研究从污泥堆肥中分离得到的嗜热菌株 SY-14^[21]. 溶胞实验所用 *Escherichia coli* WR 等中温菌为作者所在实验室保藏菌株.

1.1.2 培养基

LB 培养基: 胰蛋白胨 (OXIOD) 10 g, 酵母粉 (OXIOD) 5 g, 氯化钠 5g, 水 1 L, 121℃, 20 min 灭菌.

肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 5 g, 蛋白胨 10 g, 氯化钠 5 g, 水 1 L, 121℃, 20 min 灭菌.

含 *E. coli* 的双层琼脂培养基: LB 培养基接种 *E. coli* WR, 培养 24 h 后 (37℃, 140 r/min), 菌悬液调 pH 7.2 左右, 加 2% 琼脂, 121℃, 20 min 灭菌所得培养基作为培养基表层, 2% 琼脂作为培养基底层.

含溶壁微球菌的双层琼脂培养基: 肉膏蛋白胨培养基接种 *Micrococcus lysodeikticus* (CGMCC 1.634), 培养 24 h 后 (30℃, 140 r/min), 菌悬液调 pH 7.2 左右, 加 2% 琼脂, 121℃, 20 min 灭菌所得培养基作为培养基表层, 2% 琼脂作为培养基底层.

含活性污泥絮体的双层琼脂培养基: 4 g/L TSS 活性污泥 121℃, 20 min 灭菌后同等体积同样条件灭菌溶化的 4% 琼脂混合后所得培养基作为培养基表层, 2% 琼脂作为培养基底层.

溶胞酶发酵培养基: LB 接种 *E. coli* WR, 培养 4 d 后 (37℃, 140 r/min), 用纯水 1:1 稀释, 调 pH 7.0, 121℃, 20 min 灭菌.

1.2 菌株形态及生理生化特性

参照文献[22]中的方法进行菌株形态及生理生化特性的研究.

1.3 嗜热菌 DNA 的提取、16S rDNA 扩增和序列测定

将接种后培养 12 h 的 SY-14 菌体采用硅藻土快速提取法^[23]提取 DNA, 并以该 DNA 为模板, 利用通用引物: F27 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3' 和 R1492 5'-TACCTTGTACGACTT-3' 进行 PCR 扩增, 反应体系 (50 μL): Buffer (10 ×) 5 μL, Mg²⁺ (2.5 mmol/L) 2 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 4 μL, 引物 (10 pmol/mL) 各 0.5 μL, *Taq* 聚合酶 (5 U/mL) 0.2 μL, H₂O 37.8 μL. 反应条件 95℃ 10 min; 94℃ 60 s, 55℃ 40 s, 72℃ 60 s, 循环 30 次; 72℃ 5 min, 4℃ 保温. 16S rDNA 测序委托北京诺赛公司完成.

1.4 嗜热菌生长特性研究

在 LB 培养基中接种 SY-14 菌株, 分别在 50、55、60、65、70、75 和 80℃ 下培养 24 h, 通过测定培养前后培养液在 600 nm 处的吸光度确定 SY-14 的最适生

长温度.

在 pH 分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.3 和 10.0 的 LB 培养基中接种 SY-14 菌株, 60℃ 培养 24 h, 通过测定培养前后培养液在 600 nm 处的吸光度确定 SY-14 的最适生长 pH.

分别在 LB 培养基和溶胞酶发酵培养基离心上清液 (10 000 r/min, 10 min) 中接种 SY-14, 60℃, 120 r/min 条件下培养, 测定不同培养时间培养液在 600nm 处的吸光度, 研究其增殖特性.

1.5 嗜热菌培养上清液的获得

将培养 12 h 的 SY-14 培养液接种到溶胞酶发酵培养基, 接种量为 1%, 60℃ 振荡培养一定时间后, 培养液离心 (10 000 r/min, 10 min, 4℃), 离心上清液经 0.2 μm 滤膜过滤后, 4℃ 保存, 用于微生物细胞溶解实验.

1.6 微生物菌悬液的制备

待溶胞微生物菌株接种到 LB 或肉膏蛋白胨液体培养基, 37℃ (或 30℃)、140 r/min 条件下培养 24 h (枯草芽孢杆菌培养 12 h). 培养液离心 (10 000 r/min, 10 min, 20℃), 将收获的菌体用 pH 8.5 的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液洗 2 遍, 并用同样的缓冲溶液配制菌悬液.

1.7 嗜热菌培养上清液溶解微生物细胞的实验

2.0 mL 嗜热菌培养上清液 (或 Tris-HCl 缓冲溶液) 与 2.0 mL 待溶胞微生物 (除特别说明外, 所用微生物均为 *E. coli* WR) 菌悬液混合 (混合液 540 nm 处吸光度控制在 0.6 ~ 0.7, 总体积为 4.0 mL) 后, 60℃ 水浴保温, 并定期测定 540 nm 处吸光度. 缓冲溶液与菌悬液的混合液作为对照, 根据吸光度变化判断溶胞情况. 为便于比较, 用各时刻的吸光度 (A_t) 除以初始吸光度 (A_0) 计算得到相对吸光度 RA_t , 即

$$RA_t = A_t / A_0$$

为表征细胞的溶解程度, t 时刻溶胞体系吸光度的下降百分比定义为细胞溶解率 CL_t , 即:

$$CL_t = (1 - RA_t) \times 100\%$$

为表征细胞溶解速率的快慢, 定义 t_1 至 t_2 时刻的细胞溶解速率 r_{cl} 为:

$$r_{cl} = (RA_{t_1} - RA_{t_2}) / (t_2 - t_1)$$

本研究中用 0 ~ 5 h 的细胞溶解速率表征 SY-14 培养上清液的溶胞活性, 单位用 Unit 表示, 1 个 Unit 代表 540 nm 相对吸光度在 1 min 内下降 0.001.

2 结果与分析

2.1 SY-14 菌株的形态、胞外酶特性及鉴定

SY-14 革兰氏染色阳性,杆菌,产芽孢(端生、膨大、椭圆形),菌体大小(0.8~0.9) $\mu\text{m} \times (4 \sim 5) \mu\text{m}$,在含 *E. coli* 的双层琼脂平板上培养后形成透明、扁平菌落,表面湿润,边缘完整.

SY-14 可好氧生长,淀粉酶和蛋白酶阳性,可在含

E. coli 或 *M. lysodeikticus* 双层琼脂培养基上形成透明圈(图 1),表明 SY-14 具有分泌胞外酶溶解 *E. coli* 和 *M. lysodeikticus* 细胞的能力.SY-14 可在含活性污泥絮体的双层琼脂培养基上形成透明区域,这说明SY-14具有分泌胞外酶溶解活性污泥絮体颗粒的能力.

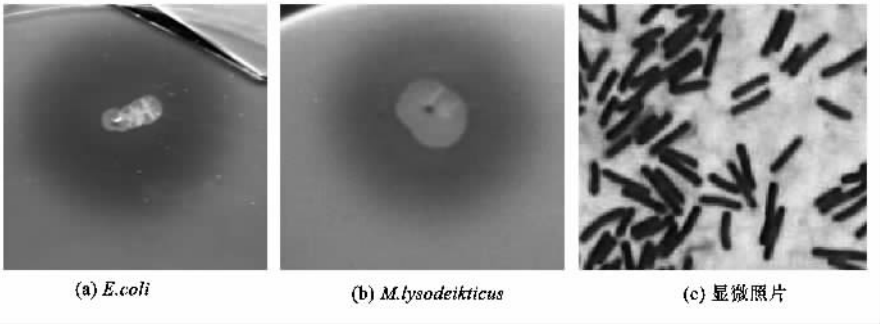


图 1 SY-14 在 *E. coli* 和 *M. lysodeikticus* 的双层琼脂平板上形成的透明圈及在 LB 琼脂斜面上 60℃培养 12 h 后的显微照片(×1 000)

Fig.1 Clearances around the colonies of SY-14 on agar plates containing *E. coli* cells or *M. lysodeikticus* cells and micrograph (×1 000) of stained cells of SY-14 cultured on LB agar slant at 60℃ for 12 h

扩增 SY-14 的 16S rDNA 全长序列,测序后在 GenBank 进行网上同源性的比对分析,结果发现与该菌株同源性极高的菌株绝大多数为土芽胞杆菌属,同源性均在 99% 以上.综合菌株的形态、生理生化特性,将 SY-14 菌株初步鉴定为土芽胞杆菌(*Geobacillus* sp.).

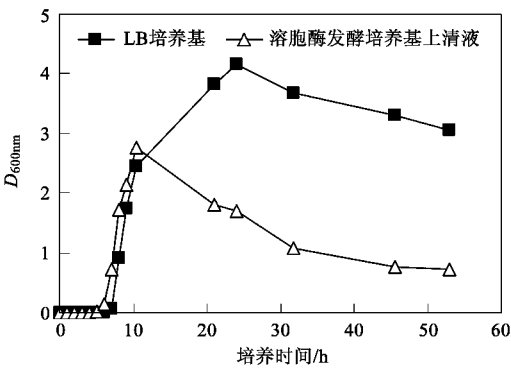
2.2 SY-14 的生长特性

SY-14 在 LB 培养基中的最适生长温度为 60℃ 左右,在 70℃ 及其以上温度不生长,37℃ 下也不生长.SY-14 在 LB 培养基中的最适生长 pH 为 6.0~7.0,在 pH 4.0~5.0 及 pH>9.3 下基本不生长.

SY-14 在 LB 培养基和溶胞酶发酵培养基离心上清液中 60℃、120 r/min 条件下的生长曲线如图 2 所示.可以看出,SY-14 在接种 5 h 后进入对数增长期,8 h 左右对数期结束,根据对数期吸光度的上升速率计算得到 SY-14 在 2 种培养基中的世代时间约为 26 min(溶胞酶发酵培养基离心上清液)和 14 min(LB 培养基).在 2 种培养基中,培养液吸光度达到最大后将发生明显的下降,镜检发现菌体被结晶紫染色的程度明显比对数期细胞低,但尚未形成芽孢.此外,由于溶胞酶发酵培养基上清液中的营养物质较 LB 培养基中的少,因此 SY-14 在其中达到的最大吸光度明显低于 LB 培养基.

2.3 SY-14 培养上清液的溶胞活性物质

由于 SY-14 在含 *E. coli* 的双层琼脂培养基上可产生溶胞酶,因此采用与该培养基组成类似的溶胞酶发酵培养基以获得具有溶胞活性的 SY-14 培养上



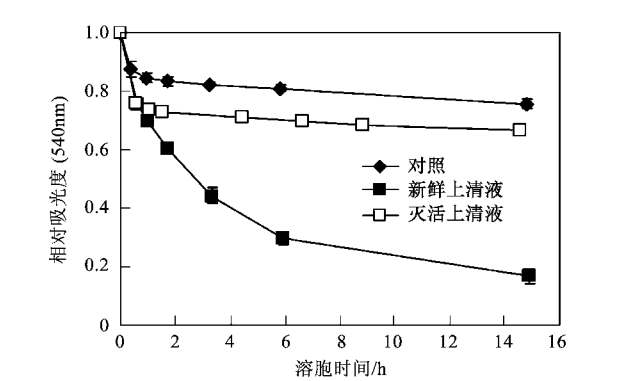
3 次平行测定结果

图 2 SY-14 在 2 种培养基中的生长曲线

Fig.2 Growth curves of SY-14 in LB broth and centrifugation supernatant of medium for lytic enzyme production in this study

清液.结果表明,SY-14 不仅能够溶解琼脂平板内的微生物细胞,其培养上清液也具有溶胞活性.培养上清液产生的溶胞活性,可能来自于 SY-14 分泌的诱导细菌自溶的抑菌物质,也可能来自于 SY-14 分泌的能够水解细菌细胞壁的溶胞酶.为初步确定SY-14 培养上清液溶胞活性的来源,将 SY-14 培养上清液(新鲜上清液)加压蒸气灭菌处理(121℃,20 min)后(灭活上清液)测定其对 *E. coli* WR 的溶胞活性,结果如图 3 所示.可以看出,上清液灭菌处理后,其溶胞活性明显下降,6 h 的细胞溶解率从 70% 下降到 30%,这说明上清液中的某些物质由于加热处理而丧失溶胞活性.

SY-14 新鲜上清液和灭活上清液分别作用于加

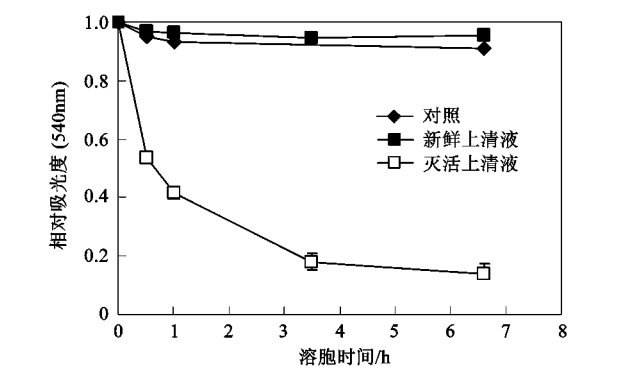


3 次重复实验结果,误差线为绝对偏差

图 3 SY-14 培养上清液灭菌处理前后对 *E. coli* 细胞的溶解

Fig.3 Lysis of *E. coli* cells by fresh or autoclaved culture supernatant of SY-14

热灭活(100℃, 30 min)的大肠杆菌,结果如图 4 所示.可以看出,与缓冲液对照相比,灭活上清液基本没有溶胞活性,而新鲜上清液仍然具有明显的活性,6 h 的细胞溶解率从灭活上清液的 5% 提高到新鲜上清液的 85%. 通常酶对加热处理敏感,而且加热灭活的大肠杆菌细胞无法在抑菌物质作用下自溶,因此推断 SY-14 培养上清液中的溶胞活性主要是酶的作用.



3 次平行实验结果,误差线为绝对偏差

图 4 SY-14 培养上清液灭菌处理前后对热处理 *E. coli* 细胞的溶解

Fig.4 Lysis of heat-treated *E. coli* cell by fresh or autoclaved culture supernatant of SY-14

2.4 SY-14 的产溶胞酶特性

SY-14 在溶胞酶发酵培养基中培养不同时间后,其培养上清液对 *E. coli* WR 的溶解情况如图 5 所示.由图 5 可以看出,不同培养时间获得上清液的差别主要发生在 0.5 h 之后.计算 0~5 h 的细胞溶解速率作为上清液的溶胞活性,如图 6 所示.可以看出,对数生长期上清液溶胞活性明显升高.在培养 12 h,也即培养液吸光度达到最大时,培养上清液的

溶胞活性达到最大,之后溶胞活性迅速下降,培养 25 h 时,上清液溶胞活性降低到溶胞活性快速升高前的水平.

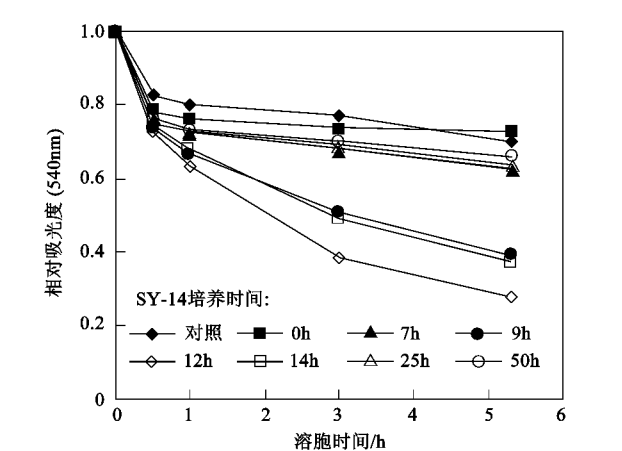


图 5 不同培养时间的 SY-14 上清液溶解 *E. coli* 细胞

Fig.5 Lysis of *E. coli* cells by fresh supernatants of SY-14 batch culture at different incubation time

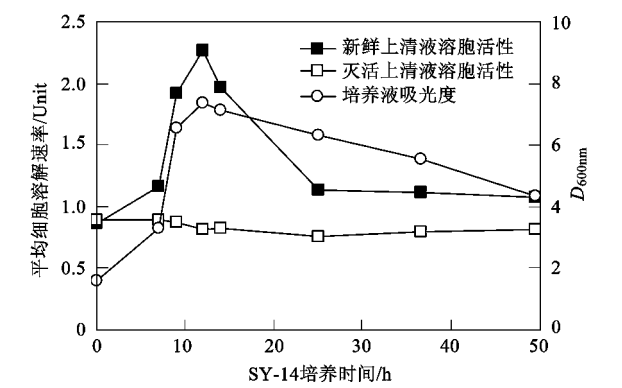


图 6 不同培养时间的 SY-14 上清液对 *E. coli* 的溶胞活性

Fig.6 Lytic activities against *E. coli* cells by supernatants of SY-14 batch culture at different incubation time

高温灭活(121℃, 20 min 加压蒸气灭菌)后的上清液(灭活上清液),其溶胞活性较低,且培养过程中基本维持不变.因此,SY-14 培养过程中上清液溶胞活性的变化,主要是由于上清液中溶胞酶活性的变化.培养上清液中溶胞酶活性达到最大后迅速下降的现象,在其他的研究中也有报道,可能的原因有:溶胞酶被培养上清液中蛋白酶降解或者溶胞酶产生菌产生了溶胞酶的抑制剂^[24].SY-14 培养上清液溶胞活性下降的原因还有待进一步研究.

2.5 SY-14 的溶菌谱

SY-14 培养上清液对不同种属微生物细胞的溶解情况如表 1 所示.可以看出,在不添加 EDTA 等试

剂的情况下,SY-14 培养上清液对 5 种受试革兰氏阴性菌都表现出了较好的溶胞效果,而对于 7 株革兰氏阳性菌,仅对枯草芽孢杆菌、红球菌、球形节杆菌和溶壁微球菌表现出了明显的溶胞能力,而对八叠球菌、谷氨酸棒杆菌、金黄色葡萄球菌基本没有表现出溶胞能力。

表 1 SY-14 培养上清液对不同中温菌细胞的溶解

Table 1 Lysis sensitivities of different bacterial strains to fresh culture supernatant of SY-14

菌种	对 SY-14 培养上清液的溶胞敏感性	
革兰氏阴性菌	<i>Escherichia coli</i> WR	+++
	<i>E. coli</i> CN ATCC700078	+++
	<i>E. coli</i> CGMCC1.3373	+++
	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> J5-1	+++
	<i>P. aeruginosa</i> CGMCC1.860	+++
革兰氏阳性菌	<i>Bacillus subtilis</i>	+++
	<i>Rhodococcus</i> sp. RR1	+++
	<i>Arthrobacter globiformis</i> ATCC8010	+++
	<i>M. lysodeikticus</i> Fleming CGMCC 1.634	++
	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
	<i>Corynebacterium glutamicum</i> JCM 1321	-
	<i>Sarcina</i> sp.	-

无论对于革兰氏阳性菌细胞还是革兰氏阴性菌细胞,肽聚糖层都对细胞壁强度起主要作用^[15,23]。由于革兰氏阴性菌外膜的保护作用,溶胞酶通常不能接触内部的肽聚糖层,因而对革兰氏阴性菌细胞的作用效果较差,通常需要投加 EDTA 等试剂破坏革兰氏阴性菌的外膜来帮助溶胞。由于本研究在 60℃ 的高温条件下进行溶胞,高温条件对革兰氏阴性菌的外膜具有一定的破坏作用^[25,26],因此尽管没有投加 EDTA 等试剂,嗜热菌产生的溶胞酶也可作用于革兰氏阴性菌的细胞。

尽管革兰氏阳性菌的细胞壁结构较简单,只有肽聚糖层,但由于革兰氏阳性菌肽聚糖组成单元具有较多的变化,包括聚糖链中 *N*-乙酰胞壁酸的 6 位—OH 是否被乙酰化,肽聚糖肽尾、肽桥氨基酸序列及其连接方式的差异等^[27],因此革兰氏阳性菌对溶胞酶的敏感性通常具有较大的差异。例如,由于金黄色葡萄球菌肽聚糖中 *N*-乙酰胞壁酸的 6 位—OH 被乙酰化,因此对常用的鸡蛋清溶胞酶不敏感^[24]。在已有的研究中,由产芽孢菌分泌的溶胞酶大多不能够溶解金黄色葡萄球菌的细胞^[28],本研究中 SY-14 菌株也不能溶解金黄色葡萄球菌细胞。

采用各种不依赖培养的分子生物学手段对不同活性污泥系统中微生物种群结构的研究结果表明,变形杆菌- α 、 β 等革兰氏阴性菌在许多活性污泥系

统中占主导地位,而革兰氏阳性菌在生物除磷系统中的含量才相对突出^[29~33]。因此,尽管 SY-14 不能够溶解金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性菌,但该菌株在溶解剩余活性污泥中的微生物细胞方面仍然具有一定的应用潜力。但要获得更大范围的适用性,或获得更高的污泥溶胞效率,有必要筛选更多具有不同溶菌谱的嗜热菌,进行组合应用。

3 结论

(1) 污泥堆肥中分离出的 SY-14 是 1 株具有溶解其他微生物细胞能力的嗜热杆菌,最适生长温度 60℃ 左右,最适生长 pH 为 6.0~7.0,初步鉴定为土芽孢杆菌(*Geobacillus* sp.)。

(2) SY-14 培养上清液对完整和加热灭活后的微生物细胞都具有溶胞能力,对微生物细胞的溶解主要是溶胞酶的作用。

(3) 间歇培养过程中,SY-14 培养上清液溶胞活性在对数生长期迅速升高,并在培养液生物量最大时达到最大,之后快速下降。

(4) SY-14 培养上清液对大肠杆菌、假单胞菌等革兰氏阴性菌和枯草芽孢杆菌、球形节杆菌、溶壁微球菌等部分革兰氏阳性菌具有溶胞作用。

参考文献:

[1] Muller J. Disintegration as a key-step in sewage sludge treatment [J]. Water Sci Technol, 2000, 41(8): 123~130.

[2] Dohanyos M, Zabranska J, Jenicek P, et al. The intensification of sludge digestion by the disintegration of activated sludge and the thermal conditioning of digested sludge [J]. Water Sci Technol, 2000, 42(9): 57~64.

[3] Goel R, Tokutomi T, Yasui H. Anaerobic digestion of excess activated sludge with ozone pretreatment [J]. Water Sci Technol, 2003, 47(12): 207~214.

[4] Kim J, Park C, Kim T H, et al. Effects of various pretreatments for enhanced aerobic digestion with waste activated sludge [J]. J Biosci Bioeng, 2003, 95(3): 271~275.

[5] Wei Y S, Van Houten R T, Borger A R, et al. Minimization of excess sludge production for biological wastewater treatment [J]. Water Res, 2003, 37(18): 4453~4467.

[6] Egemen E, Corpening J, Padilla J, et al. Evaluation of ozonation and cryptic growth for biosolids management in wastewater treatment [J]. Water Sci Technol, 1999, 39(10~11): 155~158.

[7] Nolasco M A, Campos A L O, Springer A M, et al. Use of lysis and recycle to control excess sludge production in activated sludge treatment: bench scale study and effect of chlorinated organic compounds [J]. Water Sci Technol, 2002, 46(10): 55~61.

[8] Rocher M, Roux G, Goma G, et al. Excess sludge reduction in activated sludge processes by integrating biomass alkaline heat treatment [J]. Water Sci Technol, 2001, 44(2~3): 437~444.

- [9] Aravinthan V, Mino T, Takizawa S, *et al.* Sludge hydrolysate as a carbon source for denitrification [J]. *Water Sci Technol*, 2001, **43**(1): 191 ~ 199.
- [10] Saktaywin W, Tsuno H, Nagare H, *et al.* Advanced sewage treatment process with excess sludge reduction and phosphorus recovery [J]. *Water Res*, 2005, **39**(5): 902 ~ 910.
- [11] Tiehm A, Nickel K, Zellhorn M, *et al.* Ultrasonic waste activated sludge disintegration for improving anaerobic stabilization [J]. *Water Res*, 2001, **35**(8): 2003 ~ 2009.
- [12] Hogan F, Mormede S, Clark P, *et al.* Ultrasonic sludge treatment for enhanced anaerobic digestion [J]. *Water Sci Technol*, 2004, **50**(9): 25 ~ 32.
- [13] Li Y Y, Noike T. Upgrading of anaerobic digestion of waste activated sludge by thermal pretreatment [J]. *Water Sci Technol*, 1992, **26**(3 ~ 4): 857 ~ 866.
- [14] 王治军, 王伟. 热水解预处理改善污泥的厌氧消化性能 [J]. *环境科学*, 2005, **26**(1): 68 ~ 71.
- [15] Harrison S T L. Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products [J]. *Biotech Adv*, 1991, **9**(2): 217 ~ 240.
- [16] Vlyssides A G, Karlis P K. Thermal-alkaline solubilization of waste activated sludge as a pre-treatment stage for anaerobic digestion [J]. *Bioresour Technol*, 2004, **91**(2): 201 ~ 206.
- [17] 肖本益, 刘俊新. 污水处理系统剩余污泥碱处理融胞效果研究 [J]. *环境科学*, 2006, **27**(2): 319 ~ 323.
- [18] Hasegawa S, Shiota N, Katsura K, *et al.* Solubilization of organic sludge by thermophilic aerobic bacteria as a pretreatment for anaerobic digestion [J]. *Water Sci Technol*, 2000, **41**(3): 163 ~ 169.
- [19] Sakai Y, Aoyagi T, Shiota N, *et al.* Complete decomposition of biological waste sludge by thermophilic aerobic bacteria [J]. *Water Sci Technol*, 2000, **42**(9): 81 ~ 88.
- [20] Shiota N, Akashi A, Hasegawa S. A strategy in wastewater treatment process for significant reduction of excess sludge production [J]. *Water Sci Technol*, 2002, **45**(12): 127 ~ 134.
- [21] Song Y D, Hu H Y. Isolation and characterization of thermophilic bacteria capable of lysing microbial cells in activated sludge [J]. *Water Sci Technol*, 2006, **54**(9): 35 ~ 43.
- [22] 东秀株, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [23] Terefework Z, Kaijalainen S, Lindström K. AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis* [J]. *J Biotechnol*, 2001, **91**(2 ~ 3): 169 ~ 180.
- [24] 船津胜, 鹤大典著, 李兴福译. 溶菌酶 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1982. 113 ~ 114, 120.
- [25] Hitchener B J, Egan A F. Outer-membrane damage in sublethally heated *Escherichia coli* K-12 [J]. *Can J Microbiol*, 1977, **23**: 311 ~ 318.
- [26] Tsuchido T, Katsui N, Takeuchi A, *et al.* Destruction of outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* by heat treatment [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1985, **50**(2): 298 ~ 303.
- [27] Schleifer K H, Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications [J]. *Bacteriol Rev*, 1972, **36**(4): 407 ~ 477.
- [28] Murao S, Takahara Y. Enzymes lytic against *Pseudomonas aeruginosa* produced by *Bacillus subtilis* YT-25 [J]. *Agr Biol Chem*, 1974, **38**(1): 2305 ~ 2316.
- [29] Blackall L L, Burrell P C, Gwilliam H, *et al.* The use of 16S rDNA clone libraries to describe the microbial diversity of activated sludge communities [J]. *Water Sci Technol*, 1998, **37**(4 ~ 5): 451 ~ 454.
- [30] Bond P L, Erhart R, Wagner M, *et al.* Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and non-efficient biological phosphorus removal activated sludge systems [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(9): 4077 ~ 4084.
- [31] Forster S, Snape J R, Lappin-Scott H M, *et al.* Simultaneous fluorescent gram staining and activity assessment of activated sludge bacteria [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(10): 4772 ~ 4779.
- [32] Liu Y, Zhang T, Fang H H P. Microbial community analysis and performance of a phosphate-removing activated sludge [J]. *Bioresour Technol*, 2005, **96**(11): 1205 ~ 1214.
- [33] Snaird J, Amann R, Huber I, *et al.* Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(7): 2884 ~ 2896.