

喹啉降解菌 *Rhodococcus* sp. QL2 的分离鉴定及降解特性

朱顺妮^{1,2}, 刘冬启^{1,2}, 樊丽^{1,2}, 倪晋仁^{1,2*}

(1. 北京大学深圳研究生院环境与城市学院 城市人居环境科学与技术重点实验室, 深圳 518055; 2. 北京大学环境工程系, 北京 100871)

摘要: 从某焦化厂生物处理系统的活性污泥中驯化、分离出 1 株能以喹啉为唯一碳、氮、能源生长代谢的菌株 QL2. 经过对其形态特征、生理生化特征和 16S rRNA 序列分析鉴定该菌株为红球菌属 (*Rhodococcus* sp.). 研究表明, 菌株 QL2 利用喹啉生长的适宜温度为 35~42℃, 培养基初始 pH 为 8~9, 摇床转速为 150 r/min. 外加氮源能促进菌株的生长, 其中无机氮比有机氮、铵态氮比硝态氮更利于细菌的生长. 在喹啉初始浓度为 60~680 mg/L 范围内菌株 QL2 降解喹啉符合零级动力学方程. 喹啉初始浓度为 150 mg/L 时在 8 h 内完全降解, TOC 去除率 14 h 内可达到 70%. 降解过程中产生有颜色的物质, 且杂环上的氮原子以氨氮的形式被释放. 通过 HPLC 及 GC/MS 分析出喹啉降解过程中的主要中间产物为 2-羟基喹啉. 该菌底物利用范围广, 能降解苯酚、萘、吡啶等多种芳香族化合物.

关键词: *Rhodococcus* sp.; 分离鉴定; 系统发育; 降解特性; 动力学

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)02-0488-06

Isolation, Identification and Degradation Characteristics of a Quinoline-Degrading Bacterium *Rhodococcus* sp. QL2

ZHU Shun-mi^{1,2}, LIU Dong-qi^{1,2}, FAN Li^{1,2}, NI Jin-ren^{1,2}

(1. The Key Laboratory of Environmental and Urban Sciences, Shenzhen Graduate School of Peking University, Shenzhen 518055, China; 2. Department of Environmental Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: A quinoline-degrading bacterium QL2, which utilizes quinoline as sole source of carbon, nitrogen and energy, was isolated from activated sludge in a coke-plant wastewater biological treatment system. According to the morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics, and sequence analysis of 16S rRNA, the strain was identified as *Rhodococcus* sp.. The optimal temperature, initial pH, and shaker rotary speed for strain QL2 utilizing quinoline are 35~42℃, pH 8~9, and 150 r/min, respectively. Extra nitrogen sources stimulate the isolate growth on quinoline, and inorganic nitrogen better than organic nitrogen, NH_4^+ -N better than NO_3^- -N. The degradation reaction of quinoline by strain QL2 can be described with zero order kinetic equation within the initial quinoline concentrations of 60~680 mg/L. When the initial concentration was 150 mg/L, quinoline was degraded completely in 8 hours and TOC removal efficiency was 70% in 14 hours. This bacterium produced pigmented compounds, and ring nitrogen was released into the growth medium as ammonium. The main intermediate in the degradation pathway was 2-hydroxyquinoline by the analysis of HPLC and GC/MS. With a broad range of substrate utilization, the strain can degrade phenol, naphthalene, pyridine, and some other kinds of aromatic compounds.

Key words: *Rhodococcus* sp.; isolation and identification; phylogenetic analysis; degradation characteristics; kinetics

喹啉是含氮杂环化合物的典型代表, 用途极其广泛, 是多种医药、农产品、染料等生产中的重要原料和溶剂^[1]. 环境中喹啉主要来自煤气化、化石燃料加工、煤焦油残余物和木材保存设施^[2]. 此外, 喹啉及其衍生物还是焦化废水、石油废水、制药废水等多种工业废水中的难降解有机污染物成分. 何苗等^[3,4]分别对 2 种焦化废水的有机物组成进行了分析, 指出喹啉类化合物的含量仅次于苯酚类化合物而位居第二. 喹啉及其衍生物具有致癌、致畸、致突变性^[5~7], 且难于生物降解. 由于喹啉含有 1 个电负性很强的氮原子使得水溶性增强, 因此这类化合物更易在环境中扩散和持久存在. 已有调查发现在木

馏油污染场所附近的地下水和土壤中喹啉及其羟基喹啉的浓度高达数个 mg/L^[8,9], 除此之外, 喹啉及其衍生物还存在于城市空气、烟草烟雾、海水和鱼的组织中^[10~12]. 因此寻找有效去除喹啉的方法具有十分重要的意义.

与物理化学方法相比, 生物降解具有经济且不会产生二次污染的优势, 因此被广泛关注. 虽然从 20 世纪 70 年代以来, 国外就开始分离降解喹啉的

收稿日期: 2007-03-02; 修订日期: 2007-05-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20607001)

作者简介: 朱顺妮 (1981~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为环境微生物及水处理, E-mail: zhushunni@iee.pku.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: nijinren@iee.pku.edu.cn

微生物^[13],但到目前为止,对于此类化合物的生物降解研究相当有限.筛选出的喹啉降解菌以革兰氏阴性菌居多^[14~18],而革兰氏阳性菌鲜有报道^[19],且降解菌的许多特性特别是降解动力学研究的很少.本试验分离到 1 株以喹啉为唯一碳源、氮源、能源生长,且降解效率较高的红球菌属菌株 QL2,并对其进行环境因素影响及降解特性研究,以期为进一步展开此类废水的生物处理提供良好的微生物菌源和理论依据.

1 材料与方法

1.1 培养基

富集培养基(g/L):蛋白胨 10.0,葡萄糖 1.5,酵母膏 3.5,NaCl 9.5.LB 培养基(g/L):酵母膏 5,蛋白胨 10,NaCl 10. 无机盐培养基(MSM): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.79 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02 g,NaCl 1.0 g; 1 mL 微量元素储备液(主要成分: $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2 g; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.2 g; $CuSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.1 g; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.09 g; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.12 g, H_3BO_3 0.006 g; 加水至 1 L, pH=7.0).

1.2 菌株的富集与分离

将取自某钢铁厂焦化废水生物处理系统中的曝气池回流污泥接种到 100 mL 富集培养基的摇瓶中,加入 0.03% 喹啉,于 30℃、120 r/min 摇床振荡培养 5 d. 以此摇瓶中的培养菌液作为菌种,加至含 0.05% 喹啉浓度的新鲜富集培养液中,再次驯化培养 5 d.

将 2 次培养的菌液接种到含喹啉 0.05% 的无机培养基中,在同样条件下培养,每 3 d 转接 1 次.转接 3 次后,将培养液适当稀释,不同浓度的稀释液分别涂布在含 0.05% 喹啉的无机盐平板上,30℃ 在培养箱中培养 3 d. 挑取长势较好的单菌落,接入 LB 斜面上.将斜面上长出的菌在底物无机盐平板上反复划线纯化.

1.3 菌株的鉴定

(1) 生理生化及形态鉴定 生理生化鉴定由广东省微生物分析检测中心完成.菌体形态用光学显微镜和电子显微镜观察,型号为飞利浦 CM10 透射电镜.

(2) PCR 扩增、反应产物的纯化及克隆 菌株 16S rRNA 的克隆参照文献^[20],所用 PCR 引物为细菌通用引物, F27 (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') 和 R1492 (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'). 采

用细菌 DNA 快速纯化/回收试剂盒对扩增到的 1.5 kb 左右的片段进行切胶回收,将回收到的片段连接到 pMD18-T 载体上,转化至大肠杆菌 JM109,进行蓝白斑筛选.挑选白斑菌落,提取质粒,酶切验证插入片段大小(1.5 kb 左右).测序由北京诺赛基因组研究中心完成.

(3) 同源性分析及系统发育树的构建 将测序结果在 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 中进行 Blast 序列比对,调出与该序列相关性较高的核酸序列用于系统发育学分析.采用 Bioedit 程序包自带的 Clustal W 软件进行多序列比较(Multiple alignment)分析,形成 1 个多重序列匹配阵列,其中的缺口用“-”补齐.用 Mega3.1 程序包中的 Neighboring-Joining 法^[21]构建系统进化树,使用 Kimura 2-parameter 法,系统树各分枝的置信度经重抽样法(Bootstrap) 1 000 次重复检测,DNA 序列变异中的转换和颠换赋予相同的加权值.

1.4 生长与降解实验

取菌株于含喹啉的 MSM 培养基中振荡培养 24 h 后,4 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,用 0.5% 的无菌盐水洗涤 3 次,去除残留的底物及中间产物.同样离心后,再用 0.5% 无菌盐水将菌体配成菌悬液.

在装有 100 mL MSM 培养基的锥形瓶中,加入喹啉作为碳源和氮源,将菌液接入其中,分别对温度(20、30、35、40、45℃)、pH(5、6、7、8、9、10)、摇床转速(0、50、100、150、200 r/min)对细菌生长的影响进行试验.另外通过添加不同氮源考察氮源对细菌生长的影响,设初始碳氮比为 5:1.每隔一定时间取样测定菌株的生长量.

在 MSM 培养基中,分别加入不同浓度的喹啉,在最佳生长条件下每隔一定时间取样,对喹啉进行微生物降解动力学研究.所有操作都同时做空白对照.

1.5 底物利用范围

以苯酚、吡啶、吡啶、邻苯二甲酸、水杨酸、萘、菲、二甲苯、2-羟基喹啉、苯甲酸、儿茶酚、原儿茶酸为碳源,在 MSM 培养基中添加 0.1% $(NH_4)_2SO_4$ 作为氮源,进行底物范围利用实验.同时设菌液空白为对照样,培养一定时间取样分析细菌生长量,并进一步通过在波长 200~400 nm 范围内扫描比较原化合物和转化产物的紫外光谱有否发生变化.

1.6 分析方法

细菌生长量的测定用波长 600 nm 处的光密度表示.细菌质量浓度用过滤后称重法测 VSS.氮氮的

测定采用纳氏试剂比色法^[22]. TOC 的测定采用总有机碳测定仪 (JENA, multi N/C 3100).

代谢产物表征采用 UV-Vis 检测: 取 5 mL 培养液 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液稀释后用紫外-可见分光光度计 (SHIMADZU, UV-1700) 进行波长扫描.

喹啉及其降解产物的分析用 HPLC, 仪器型号为 Agilent 1100, 色谱柱为 ZORBAX SB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇: 水 = 60: 40, 流速 1 mL/min, 检测波长 275 nm, 进样量 5 μL.

GC/MS 前处理采用乙酸乙酯萃取降解液, 萃取液旋转干燥定容. GC/MS 分析用 Agilent 6890 N/ 5975 MSD 和 HP-35 柱 (30 m × 250 μm × 0.25 μm). 操作条件为: 进样口温度 250℃, 检测器温度 250℃, 炉温 70℃, 保持 3 min, 10 °C/min 升温至 300℃, 保持 10 min.

2 结果与讨论

2.1 分离菌株的形态特征

菌株 QL2 在 LB 培养基上生长时为规则的圆形, 边缘整齐, 表面光滑, 菌落颜色呈橙红色. 通过革兰氏染色后在显微镜下观察呈阳性, 细菌细胞呈短杆状, 大小为 (1.1 ~ 1.5) μm × 0.9 μm. 图 1 为该菌细胞的透射电镜照片.



图 1 菌株 QL2 的透射电镜照片 (× 8 900)

Fig. 1 Transmission electron micrograph of strain QL2

2.2 分离菌株的生理生化特征

菌株 QL2 接触酶、明胶液化反应为阳性, 氧化酶反应、甲基红试验 (M. R.)、V-P 测定为阴性, 不能

水解淀粉, 能还原硝酸盐. 能从鼠李糖、乳糖、肌醇糖中产酸, 不发酵麦芽糖、葡萄糖、蔗糖. 能以乳酸钠作为碳源. 在 20 ~ 41℃ 均能生长良好, NaCl 盐度耐受范围 0 ~ 10%.

2.3 分离菌株的系统发育分析

测序结果表明该菌 16S rRNA 片段为 1 492 bp, 在 GenBank 中的登录号为 EF079074. 为了确定 QL2 的分类学地位, 利用 BLAST 在 GenBank 数据库中进行同源性检索, 显示 QL2 与红球菌属的多种细菌具有较高的同源性 (> 97%), 在所得的检索结果中, 90% 为红球菌, 其余为诺卡氏菌属细菌和未鉴定细菌.

系统聚类分析发现它和 *Rhodococcus pyridinovorans* 亲缘关系最近并聚为一簇, 其同源性高达 100%, 两者在系统发育树上聚为一个分支. 综合以上菌株的形态、生理生化特征和 16S rRNA 序列分析结果, 该菌属于放线菌类诺卡氏菌科 (*Nocardiaceae*) 中的红球菌属 (*Rhodococcus* sp.). 系统发育树如图 2.

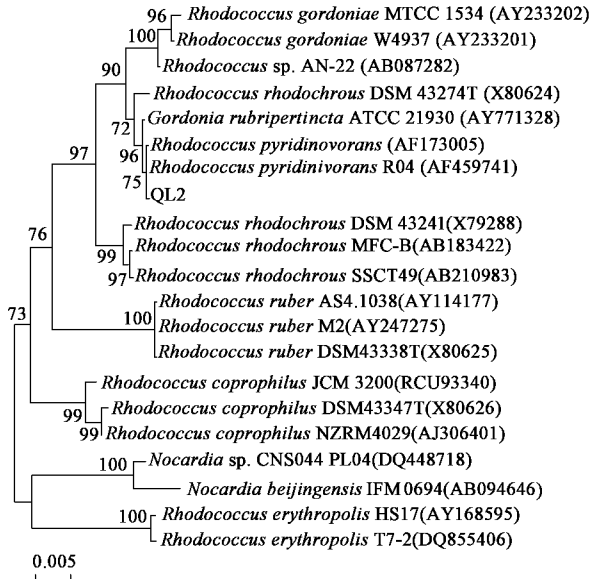


图 2 菌株 QL2 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain QL2

2.4 环境因素的影响

(1) 温度和初始 pH 菌株适宜生长温度为 35 ~ 42℃, 在 37℃ 达到最佳. 该菌适合在较高温度下生长, 但是超过高温范围细菌的生长则会受到强烈抑制. 菌株 QL2 的 pH 适宜生长范围比较宽, 最适 pH 为 8 ~ 9. 该菌在偏碱性的条件下生长较好, 是由于喹啉在微生物降解过程中会产生一些酸性中间产

物^[23],碱性培养基中的 OH⁻ 正好可以中和酸性中间产物的 H⁺,使溶液的 pH 值趋于中性,而酸性培养基只会积累更多的 H⁺ 而使细胞生长受到抑制。

(2) 摇床转速 摇床转速可以间接反映溶解氧量,该菌在好氧条件下生长良好,静置培养不利于细菌生长,但转速过大对细菌的生长也同样不利.菌株 QL2 的最适转速为 150 r/min.

(3) 外加氮源 氮是微生物生长必不可少的营养元素之一,本试验对 (NH₄)₂SO₄、NH₄NO₃、NaNO₃ 和 CO(NH₂)₂ 等 4 种有代表性的外加氮源进行比较.试验结果表明(见图 3),4 种外加氮源对细菌的生长均有促进作用,效果依次为: (NH₄)₂SO₄ > NH₄NO₃ > NaNO₃ > CO(NH₂)₂. 说明无机氮比有机氮更有利于细菌的生长,而铵态氮比硝态氮更利于细菌的生长。

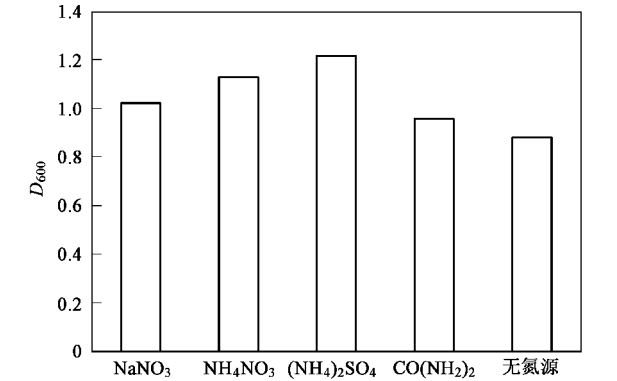


图 3 外加氮源对菌株生长的影响 (初始 C:N = 5:1)

Fig.3 Effects of additional nitrogen on the growth of the strain

2.5 降解动力学分析

在 37℃、pH = 8、摇床转速 150 r/min 的条件下,进行了菌株 QL2 以喹啉为唯一碳源、氮源的降解动力学研究,降解曲线如图 4 所示.空白对照组对喹啉没有降解作用.降解曲线回归后可以用零级反应方程来描述。

表 1 列出了喹啉的降解动力学方程,可以看出不同浓度的喹啉降解能较好地用零级反应形式表示,即喹啉以恒定的反应速度降解,而喹啉的初始浓度不同,其降解速率常数不同.降解速率常数随喹啉浓度升高而增加,但当达到一定浓度,如 360 mg/L 以上时,反应速率常数又有所减小,说明喹啉初始浓度对反应速率有一定影响,底物浓度太高时会有一定抑制作用,使降解速率变慢。

2.6 菌株的降解特性分析

图 5 为喹啉初始浓度 150 mg/L 时菌株 QL2 的生

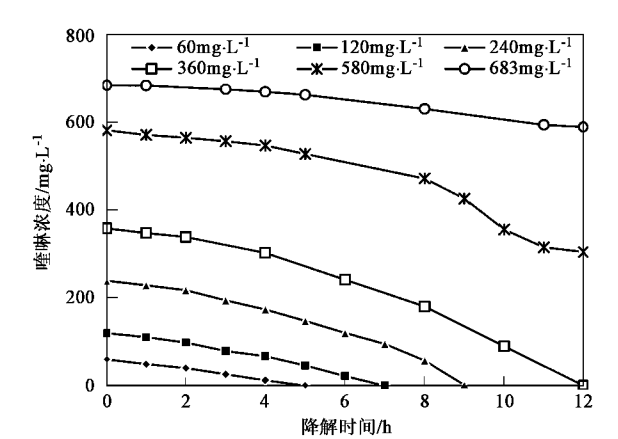


图 4 喹啉的降解动力学曲线

Fig.4 Quinoline degradation kinetic curve of strain QL2

表 1 喹啉降解的动力学方程				
Table 1 Quinoline degradation kinetic equation of QL2				
喹啉初始浓度 <i>c</i> /mg·L ⁻¹	动力学方程	速率常数 <i>k</i> ₀ /mg·(L·h) ⁻¹	<i>R</i> ²	
60	<i>c</i> = - 12.10 <i>t</i> + 61.37	12.10	0.995	
120	<i>c</i> = - 17.21 <i>t</i> + 127.98	17.21	0.981	
240	<i>c</i> = - 25.40 <i>t</i> + 261.50	25.40	0.960	
360	<i>c</i> = - 29.59 <i>t</i> + 391.07	29.59	0.959	
580	<i>c</i> = - 23.38 <i>t</i> + 614.79	23.38	0.931	
683	<i>c</i> = - 8.61 <i>t</i> + 694.75	8.61	0.963	

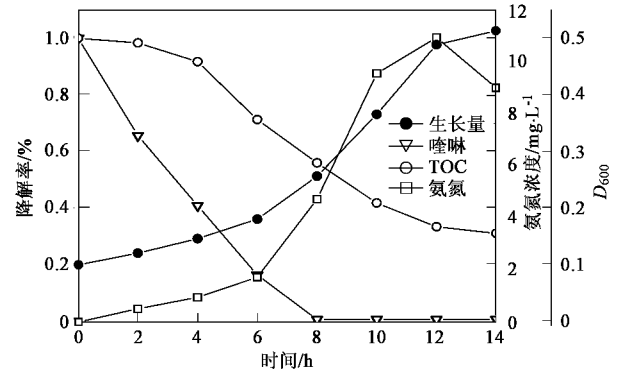


图 5 菌株 QL2 的生长、喹啉降解、TOC 及氨氮释放变化曲线

Fig.5 Biomass production, degradation of quinoline and TOC, release of ammonium by strain QL2

长、喹啉及 TOC 的降解率、溶液中氨氮的释放曲线.细菌在接种后经过短暂的停滞期后迅速达到对数生长期并持续一段时间,在 12 h 后达到稳定生长期.在培养过程中喹啉消失速度较快,能在 8 h 内完全降解,这样快速地降解非常有利于含喹啉污水的处理,具有现实意义.另外,在喹啉完全降解后细菌仍能生长,说明细菌的生长可以利用喹啉的某些降解产物.从 TOC 的去除来看,14 h 内 QL2 对 TOC 去除

率约为 70%，此后 TOC 下降缓慢. 剩余 TOC 可能来自生物体的可溶性聚合物，也可能是中间产物的积累. 喹啉的降解伴随着氨氮的释放，当喹啉降解完全后，氨氮仍有上升趋势，表明氨氮并不是从喹啉降解的第 1 步反应产生，而是由喹啉的中间产物释放到水溶液中.

在试验过程中培养液出现粉红色，且颜色逐渐加深成棕红色，但有时在变成粉红色之后迅速变成绿色，并最终变成墨绿色，这种现象是随机发生的. 该现象与 Schwarz 等^[23]报道的类似. 而 O’Loughlin 等^[19]分离的红球菌 Q1 在降解过程中不产生可溶性粉红色，而是在生长对数期产生绿色，在稳定期转为褐绿色. Blaschke 等^[24]分离出的红球菌没有颜色产生. 这些现象表明喹啉的降解呈现多样性，不同降解菌代谢喹啉可能产生不同的中间代谢产物.

图 6 给出了随时间的延长，HPLC 监测到的喹啉降解液中间代谢产物的变化. 可以看出，随着保留时间(RT)延长，6.4 min 的喹啉峰消失的同时出现了 RT 为 4.07 min 的新峰，且富集了一段时间后消失. 该保留时间与标准 2-羟基喹啉(购于 ABCR)对照相符. 通过 GC/MS 分析，也得出与 2-羟基喹啉标准样品的质谱图一致(见图 7). 它的分子离子峰为 $m/z = 145 [M^+]$ ，另外还有 2 个主要的离子碎片峰为 $m/z = 117 [M^+ - CO]$ 和 $m/z = 90 [M^+ - CO - HCN]$. 因此可以确定 2-羟基喹啉是 QL2 菌株降解喹啉的第 1 步中间产物. 虽然后续代谢产物目前还无法确定，但 RT 的提前表明中间产物的极性逐渐增强. 此外，氨氮的产生至少可以推断喹啉降解发生了吡啶环开环反应. 后续代谢产物的鉴定工作正在进行中.

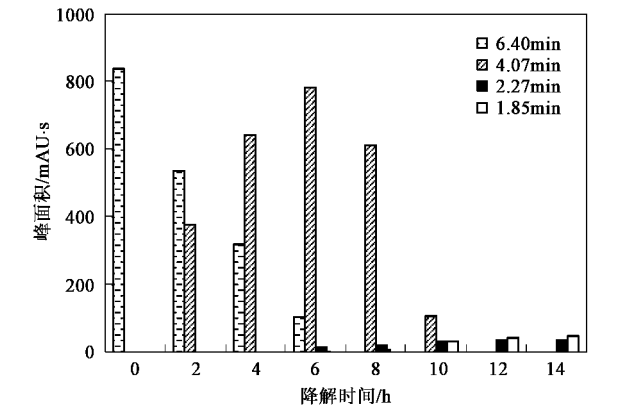


图 6 降解中间产物的 HPLC 分析

Fig.6 HPLC analysis of quinoline-degrading metabolites

2.7 底物利用范围

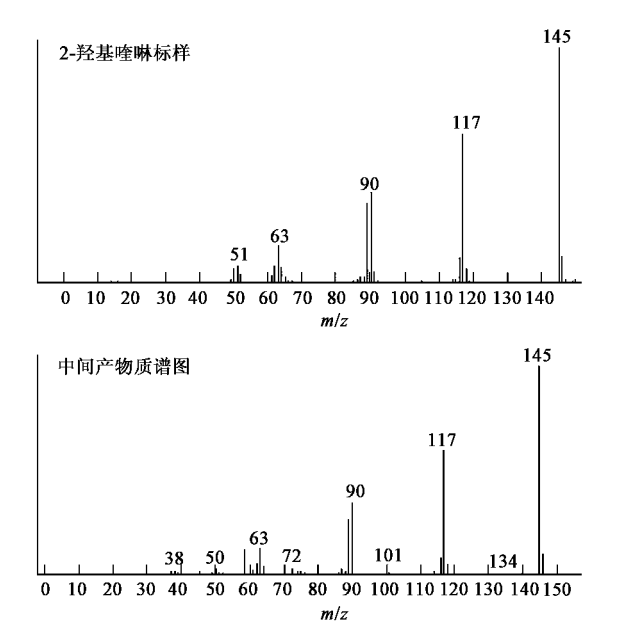


图 7 QL2 代谢中间产物与标准 2-hydroxyquinoline 质谱图对照
Fig.7 Comparison of MS data of a metabolite of quinoline produced by QL2 with 2-hydroxyquinoline

在喹啉存在的环境下往往有多种污染物并存，对底物利用的广谱性更有利于菌的生存以及实际应用. 菌株 QL2 环境适应性强，能利用多种芳香族化合物. 试验的几种物质中，QL2 能利用苯酚、苯甲酸、邻苯二甲酸、原儿茶酸、儿茶酚、水杨酸、萘、吡啶、吡啶和 2-羟基喹啉；不能利用二甲苯和菲. 这与文献报道的其他具有喹啉降解功能的红球菌属的菌株底物利用范围有所不同，喹啉降解菌 *Rhodococcus* sp. Q1 不能利用邻苯二甲酸^[19]，而 Schwarz 等^[25]筛出的 3 株红球菌 (B1、F1、F2) 均不能利用原儿茶酸和萘.

3 结论

(1)从焦化厂活性污泥中筛选得到 1 株能以喹啉为唯一碳、氮、能源的革兰氏阳性细菌 QL2 菌株，该菌株经形态观察、普通生理生化试验、16S rRNA 序列分析和系统发育分析鉴定为 *Rhodococcus* sp. . 此菌具有降解苯酚、萘、吡啶等多种芳香族化合物的能力，具有实际应用意义.

(2)*Rhodococcus* sp. QL2 的适宜生长温度为 35 ~ 42℃，适宜 pH 为 8 ~ 9，最适摇床转速为 150 r/min. 外加氮源对菌株的生长有明显促进作用，无机氮比有机氮更利于细菌的生长，铵态氮比硝态氮更利于细菌的生长.

(3)菌株 QL2 对喹啉的降解能力强，符合零级

动力学方程,初始喹啉浓度低于 360 mg/L 时,喹啉浓度的增加促进底物的降解,而高于该浓度时,则起抑制作用.进一步分析表明,喹啉的降解发生了吡啶环开环反应,2-羟基喹啉为降解过程中的主要中间产物.该菌对喹啉的代谢途径有待于进一步研究.

参考文献:

[1] Johanson S S, Licht D, Arvin E, *et al.* Metabolic pathways of quinoline, indole and their methylated analogs by *Desulfobacterium indolicum*(DSM3383)[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1997, **47**: 292-300.

[2] Fetzner S, Tshisuaka B, Lingens F, *et al.* Bacterial degradation of quinoline and derivatives-pathways and their biocatalysts[J]. Angew Chem Int Ed, 1998, **37**: 576-597.

[3] 何苗,张晓建,雷晓玲,等.厌氧-缺氧/好氧工艺与常规活性污泥法处理焦化废水的比较[J].给水排水,1997, **23**(6): 31-33.

[4] 李咏梅,顾国维,赵健夫.焦化废水中几种含氮杂环有机物在 A1-A2-O 系统中的降解特性研究[J].环境科学学报,2002, **22** (1): 34-39.

[5] Hirao K, Shinohara Y, Tsuda H, *et al.* Carcinogenic activity of quinoline on rat liver[J]. Cancer Res, 1976, **36**: 329-335.

[6] Minako N, Takio Y, Yuko S, *et al.* Mutagenicities of quinoline and its derivatives[J]. Mutat Res, 1977, **42**: 335-342.

[7] LaVoie E J, Shigematsu A, Adams E A, *et al.* Tumor initiating activity of quinoline and methylated quinolines on the skin of SENCAR mice[J]. Cancer Lett, 1984, **22**: 269-273.

[8] Brumly W C, Brownrigg C M, Brilis G M. Characterization of nitrogen-containing aromatic compounds in soil and sediment by capillary gas chromatography-mass spectrometry after fractionation[J]. J Chromatogr, 1991, **558**: 223-233.

[9] Pereria W E, Rostad C E. Investigations of organic contaminants derived from wood-treatment processes in a sand and gravel aquifer near Pensacola, Florida[J]. Sel Papers Hydrol Sci, 1986, **2290**: 65-80.

[10] Adams J D, LaVoie E J, Shigematsu A, *et al.* Quinoline and methylquinolines in cigarette smoke: comparative data and the effect of filtration[J]. J Anal Toxicol, 1983, **7**: 293-296.

[11] Barrick R C, Furlong E T, Carpenter R. Hydrocarbon and azaarene markers of coal transport to aquatic sediments[J]. Environ Sci Technol, 1984, **18**: 846-854.

[12] Warshawsky D. Environmental sources, carcinogenicity, mutagenicity,

metabolism, and DNA binding of nitrogen and sulfur heterocyclic aromatics[J]. J Environ Sci Health Part C: Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 1992, **10**: 1-71.

[13] Grant D J W, Al-Najjar T R. Degradation of quinoline by a soil bacterium[J]. Microbios, 1976, **15**: 177-189.

[14] Shukla O P. Microbiological degradation of quinoline by *Pseudomonas stutzeri*: the coumarin pathway of quinoline catabolism[J]. Microbios, 1989, **59**(238): 47-63.

[15] Wang J L, Wu W Z, Zhao X. Microbial degradation of quinoline: kinetics study with *Burkholderia picekittii*[J]. Biomed Environ Sci, 2004, **17**(1): 21-26.

[16] Miethling R, Hecht V, Deckwer W. Microbial degradation of quinoline: kinetic studies with *Comamonas acidovorans* DSM 6426[J]. Biotechnol Bioeng, 1993, **42**(5): 589-595.

[17] Chen F Z, Cui M C, Fu J M, *et al.* Biodegradation of quinoline by feely suspended and immobilized cells of *Comamonas* sp. Strain Q10[J]. J Gen Appl Microbiol, 2003, **49**(2): 123-128.

[18] Aislabie J, Bej A K, Hurst H, *et al.* Microbial Degradation of Quinoline and Methylquinolines[J]. Appl Environ Microbiol, 1990, **56**(2): 345-351.

[19] O'Loughlin E J, Kehmeyer S R, Sims G K. Isolation, Characterization, and Substrate Utilization of a Quinoline-Degrading Bacterium[J]. Int Biodeter Biodegr, 1996, **38**: 107-118.

[20] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. (3rd ed.). USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

[21] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol, 1987, **4**: 406-425.

[22] 国家环保局.水和废水监测分析方法[M].(第四版).北京:中国环境科学出版社,2003.

[23] Schwarz G, Bauder R, Speer M, *et al.* Microbial metabolism of quinoline and related compounds. II . Degradation of quinoline by *Pseudomonas fluorescens* 3, *Pseudomonas putida* 86 and *Rhodococcus* spec. B1[J]. Biol Chem Hoppe Seyler, 1989, **370**(11): 1183-1189.

[24] Blaschke M, Kretzer A, Schafer S, *et al.* Molybdenum-dependent degradation of quinoline by *Pseudomonas putida* Chin IK and other aerobic bacteria[J]. Arch Microbiol, 1991, **155**(2): 164-169.

[25] Schwarz G, Senghas E, Erben A, *et al.* Microbial metabolism of quinoline and related compound. I. Isolation and characterization of quinoline-degradation bacteria[J]. Syst Appl Microbiol, 1988, **10** (2): 185-190.