



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106007247 A

(43)申请公布日 2016.10.12

(21)申请号 201610595196.2

(22)申请日 2015.06.05

(62)分案原申请数据

201510324746.2 2015.06.05

(71)申请人 窦欣童

地址 100083 北京市海淀区学院路30号北  
京科技大学

(72)发明人 窦欣童

(51)Int.Cl.

*C02F 9/14*(2006.01)

*C02F 3/34*(2006.01)

*C12N 9/12*(2006.01)

*C02F 101/38*(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种处理污水中喹啉污染物的方法

(57)摘要

本发明公开了一种处理污水中喹啉污染物的方法,包括预处理,主处理,曝气,后处理等步骤,经过处理后能够去除大部分的喹啉污染物。本发明对喹啉类污染物的治理具有非常重要的实际应用价值。

1. 一种含喹啉化合物废水的处理方法,包括如下步骤:(1)预处理:通过过滤和沉淀,去除所处理污水中的悬浮物;(2)主处理:添加氮的氧化物,配成混合废水,收集在进水池中,其中,碳氮比为5-10:1,碳氮比中的碳来自于喹啉化合物、氮来自于添加的氮的氧化物;(3)混合废水通过进水泵提升至上流式曝气生物滤池中,供氧曝气6h;(5)曝气后的污水转入缺氧区,投加承载有反硝化菌的悬浮填料,处理1天;(6)后处理:将缺氧区处理后的污水经消毒处理后,直接排放或回用。

2. 如权利要求1所述的处理方法,其特征在于:所述的反硝化菌为转入了编码如下PPKL1蛋白变体的编码基因的CCTCC M 2010209菌株,所述PPKL1蛋白变体为相对于PPKL1蛋白原始氨基酸序列进行如下突变229I/Q,PPKL1蛋白原始氨基酸序列参见GenBank:NP\_742191.1。

3. PPKL1蛋白变体,其特征在于:所述PPKL1蛋白变体为相对于PPKL1蛋白原始氨基酸序列进行如下突变229I/Q,PPKL1蛋白原始氨基酸序列参见GenBank:NP\_742191.1。

## 一种处理污水中喹啉污染物的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于污水处理领域,具体涉及污水中喹啉污染物的处理。

### 背景技术

[0002] 喹啉是一种无色,具有刺激性气味的吸湿性液体。可溶于乙醇、乙醚、苯、二硫化碳,微溶于水。从其化学结构来看,它属于杂环芳烃类有机物,由煤炭、木材、石油加工时形成。焦化废水中的喹啉则多在脱焦油洗苯的过程中产生。喹啉的污染主要由大气、水体,地下煤矿开采等方式传播,香烟排放的气体中也含有喹啉的成分。一些研究人员研究发现肝脏是喹啉的目标器官,对肝癌的发生有一定的影响。

[0003] 喹啉是典型的多环芳香含氮杂环化合物,具有毒性大、致畸性和致癌性强等特点,难于生物降解,会通过土壤污染地下水资源,对人类健康和生态环境具有巨大的潜在危害,已日益引起人们的关注。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。但是喹啉及其衍生物可致癌、致畸、致突变,且难于生物降解,是环境中的严重污染物。环境中的喹啉主要来自煤气、化石燃料加工、煤焦油残余物和木材保存设施。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。有学者分别对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居有机污染物的第二。由于喹啉含有1个电负性很强的氮原子使得其水溶性增强,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。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,因此寻找有效去除喹啉的方法具有十分重要的意义。

[0004] 现在,有很多的喹啉的处理方法。大致分为物理法、化学法和生物法。物理法和化学法虽然去除效率高,但是成本高,容易产生二次污染。生物治理具有成本低、二次污染轻、环境相容性好等优势,现已成为污染治理技术中的首选方案之一。决定生化处理工艺成功、有效、适用的因素,除了工艺条件和操作管理外,用于污染物降解、转化等过程的功能基因的重要作用也是显而易见的。生物处理法因其具有处理量大、成本较低、条件温和及不产生二次污染等优点而受到人们的青睐。近年来,在不改变现有处理设施的基础上通过特定功能微生物的添加的生物强化技术,能够大大提高原有生物处理系统对目标污染物的去除效果,污水处理能力大幅提高,因而越来越受到人们的重视。

[0005] 国内外研究者从20世纪70年代就开始分离降解喹啉的微生物。有关喹啉的微生物降解途径及其降解动力学、遗传学的研究也在深入,但到目前为止,此类化合物的生物降解过程研究仍相当有限,而对于喹啉降解菌的其他功能研究则更少。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的之一在于提供一种利用生物技术处理含喹啉废水方法,以解决废水中含喹啉污染物难以生物降解和脱毒的问题。

- [0007] 本发明是采用如下技术方案实现的：
- [0008] 一种含喹啉化合物废水的处理方法，包括如下步骤：
- [0009] (1)预处理：通过过滤和沉淀，去除所处理污水中的悬浮物；
- [0010] (2)主处理：添加氮的氧化物，配成混合废水，收集在进水池中，其中，碳氮比为5-10:1，碳氮比中的碳来自于喹啉化合物、氮来自于添加的氮的氧化物；
- [0011] (3)混合废水通过进水泵提升至上流式曝气生物滤池中，供氧曝气6h；
- [0012] (4)曝气后的污水转入缺氧区，投加承载有反硝化菌的悬浮填料，处理1天；
- [0013] (5)后处理：将缺氧区处理后的污水经消毒处理后，直接排放或回用。
- [0014] 优选的，所述的反硝化菌为转入了编码如下任一个PPKL1蛋白变体(相对于PPKL1蛋白原始氨基酸序列(其氨基酸序列参见：GenBank:NP\_742191.1)分别进行如下突变60E/R、69F/P、82P/G、120I/F、147L/A、178R/S、189E/V、229I/Q、243V/Q、251S/E、259E/P)(60E/R表示在原始序列第60位的E氨基酸替换为R氨基酸，其它含义类同)的编码基因的CCTCC M 2010209菌株。
- [0015] 本发明另外提供一种喹啉降解蛋白PPKL1，其氨基酸序列如NP\_742191.1。该蛋白是从恶臭假单胞菌中通过喹啉诱导的差异蛋白表达筛选得到的。该蛋白具有较强的去除分解喹啉的能力。
- [0016] 本发明提供了一系列的PPKL1蛋白变体(相对于PPKL1蛋白原始氨基酸序列分别进行如下突变60E/R、69F/P、82P/G、120I/F、147L/A、178R/S、189E/V、229I/Q、243V/Q、251S/E、259E/P)，其具有更强的去除分解喹啉的能力。将所示的变体氨基酸的编码序列在CCTCC M 2010209菌株中表达时，发现重组菌相对于未转化所述基因的聚磷菌具有更好的去除分解喹啉的能力，具有更好的效果。
- [0017] 将该蛋白导入到反硝化菌中，该菌株不仅具有较好的去除氮磷的效果，同时还能够有效去除污水中的喹啉，具有较好的应用前景。
- [0018] 上述方法具有以下有益效果：
- [0019] 1、通过本发明的处理方法，大大提高了喹啉的降解速率，降低了反应时间。
- [0020] 2、提供一种降解喹啉的蛋白及转化菌株，具有较高的喹啉去除效率以及氮磷去除效果。
- [0021] 为了便于理解，以下将通过具体的实施例对本发明进行详细地描述。需要特别指出的是，具体实例仅是为了说明，并不构成对本发明范围的限制。显然本领域的普通技术人员可以根据本文说明，在本发明的范围内对本发明做出各种各样的修正和改变，这些修正和改变也纳入本发明的范围内。

## 具体实施方式

- [0022] 实施例1喹啉化合物废水的处理
- [0023] (1)预处理：取含有喹啉浓度为100mg/L污水通过常规的过滤池进行过滤，通过常规的沉淀池进行沉淀，去除所处理污水中的悬浮物；
- [0024] (2)主处理：将去除了悬浮物的处理后的污水，添加氮的氧化物(如果含氮量足够，也可以不用添加)，配成混合废水，收集在进水池中，其中，碳氮比为8:1，碳氮比中的碳来自于喹啉化合物、氮来自于添加的氮的氧化物；

[0025] (3)混合废水通过进水泵提升至上流式曝气生物滤池中,供氧曝气6h;

[0026] (4)曝气后的污水转入缺氧区,投加承载有反硝化菌的悬浮填料,处理1天;所述反硝化菌为菌种保藏编号为CCTCC M 2010209的菌株,具体可以参见CN102115719A;

[0027] (5)后处理:将缺氧区处理后的污水经消毒处理后,通过测定,其中喹啉的浓度为0.5mg/L。

[0028] 实施例2喹啉降解基因PPKL1的获得

[0029] 取恶臭假单胞菌,采用喹啉作为诱导剂,进行诱导培养,分别以诱导和未诱导的菌株作为对比,进行总蛋白的提取,进行双向二维电泳,通过对照,发现了10处差异表达蛋白。其中选取其中一处表达差异较大的点进行测序。得到了相应的氨基酸序列,其序列如Genbank:NP\_742191.1所示。将该基因进行常规的原核表达,具体步骤都为常规的技术。通过活性测定发现,该蛋白具有较强的喹啉去除效果。

[0030] 实施例3PPKL1蛋白突变的活性提高

[0031] 通过多重PCR将相应的60E/R、69F/P、82P/G、120I/F、147L/A、178R/S、189E/V、229I/Q、243V/Q、251S/E、259E/P、121E/S,突变位点分别引入到NP\_742191.1所示蛋白中,从而构建了不同的突变体蛋白(可参考现有技术的制备方法即可获得)。制备并获得了不同突变体基因,然后分别于载体相连,将验证成功的重组质粒转化进入反硝化菌CCTCC M 2010209中,获得降解喹啉的基因工程菌。

[0032] 实施例4喹啉降解效果的验证

[0033] 将实施例3获得的多个工程菌分别按照实施例1的方法,分别在不同的喹啉浓度下验证相应的降解喹啉的效果。以CN 102206657A的Ep2菌作为对照。具体结果如下表所示:

菌株	原始污水 喹啉浓度为 100 mg/L 处理后剩 余的浓度 (mg/L)	原始污水喹 啉浓度为 400mg/L 处理后剩余的浓 度 (mg/L)	原始污水喹 啉浓度为 600 mg/L 处理后剩余的浓 度 (mg/L)
反硝化菌 60E/R	0	10.5	87.5
反硝化菌 69F/P	0	11.3	89.6
反硝化菌 82P/G	0	12.3	68.7
反硝化菌 120I/F	0	15.4	59.6
反硝化菌 147L/A	0	17.6	88.3
反硝化菌 178R/S	0	20.3	77.4
反硝化菌 189E/V	0	21.5	67.3
反硝化菌 229I/Q	0	22.7	69.8
反硝化菌 243V/Q	0	13.2	85.6
反硝化菌 251S/E	0	13.5	88.7
反硝化菌 259E/P	0	11.3	76.7
反硝化菌 121E/S	10.2	307.2	500.5
Ep2 菌	0	88.5	269.5

[0034] 从以上的结果可以看出,导入了突变的蛋白PPKL1的反硝化菌大部分都具有增强的去除喹啉的效果,这充分说明并不是任意的改变都具有较好的效果。