

# AO工艺高效处理N,N-二甲基甲酰胺废水的研究

曹鹏飞<sup>1</sup>, 任学昌<sup>1</sup>, 陈作雁<sup>2</sup>, 冯浩<sup>1</sup>, 杨镇瑜<sup>1</sup>, 安菊<sup>1</sup>, 范新露<sup>1</sup>

(1. 兰州交通大学 环境与市政工程学院, 兰州 730070; 2. 甘肃省自然能源研究所, 兰州 730046)

**摘要:** 利用微生物高效降解N,N-二甲基甲酰胺(DMF)的研究是一项极具挑战的课题。通过缺氧驯化(HA)筛选并获得高效降解DMF的菌群是研究DMF废水生化降解的关键。微生物群落扩增子测序(16S rDNA)结果表明,驯化出的缺氧菌群中 *Proteobacteria*、*Firmicutes* 和 *Euryarchaeota* 为降解DMF的优势菌门,其中 *Zavarzinia*、*Petrimonas*、*Acholeplasma*、*Brevundimonas*、*Arenimonas* 和 *Bosea* 在缺氧条件下可以有效降解DMF,且DMF降解菌的相对丰度与DMF降解效率具有明显相关性。当HA污泥中DMF降解菌的相对丰度达到86.37%时,HA污泥对210 mg·L<sup>-1</sup>的DMF去除效率达到99.98%。DMF降解菌降解DMF的产物为二甲胺(DMA)和甲胺(MMA)。DMF降解菌的相对丰度低于40.25%时,HA污泥对DMF的去除效率仅为57.22%,DMA对DMF降解菌表现出明显的抑制作用。实验采用缺氧/好氧联合(AO)工艺进一步提高了出水水质,好氧污泥(AS)出水中DMA和MMA的浓度均小于0.5 mg·L<sup>-1</sup>,且AS反应器出水中化学需氧量(COD) ≤ 40.6 mg·L<sup>-1</sup>,该水质满足GB 21902-2008《合成革与人造革工业污染物排放标准》中对现有企业污染物排放的要求。

**关键词:** N,N-二甲基甲酰胺; 生物降解; 物种差异; 代谢途径

中图分类号: X703

文献标志码: A

## Study on the Efficient Treatment of N, N-dimethylformamide Wastewater by AO Process

CAO Pengfei<sup>1</sup>, REN Xuechang<sup>1</sup>, CHEN Zuoyan<sup>2</sup>,  
FENG Hao<sup>1</sup>, YANG Zhenyu<sup>1</sup>, AN Ju<sup>1</sup>, FAN Xinlu<sup>1</sup>

(1. School of Environmental and Municipal Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, China; 2. Gansu Institute of Natural Energy, Lanzhou 730046, China)

**Abstract:** The study of efficient degradation of N,N-dimethylformamide (DMF) using microorganisms is of great challenge. Screening and obtaining efficient DMF-degrading bacterial flora through anoxic acclimatization (HA) is the key to study DMF wastewater being biochemically degraded. The results of microbial community amplicon sequencing (16S rDNA) showed that *Proteobacteria*, *Firmicutes*, and *Euryarchaeota* were the dominant phyla for degrading DMF in the domesticated hypoxic bacterial community. Among them, *Zavarzinia*, *Petrimonas*, *Acholeplasma*, *Brevundimonas*, *Arenimonas*, and *Bosea* were able to effectively degrade DMF under hypoxic conditions, and the relative abundance of DMF degrading bacteria was significantly correlated with DMF degradation efficiency. When the relative abundance of DMF-degrading bacteria in HA reached 86.37%, the removal efficiency of DMF by HA sludge reached 99.98% for 210 mg·L<sup>-1</sup>. The products of DMF degradation by DMF-degrading bacteria were dimethylamine (DMA) and methylamine (MMA). The removal efficiency of DMF by HA sludge was only 57.22% when the relative abundance of DMF-degrading bacteria was lower than 40.25%, and DMA showed a significant inhibitory

effect on DMF-degrading bacteria. In this study, an anoxic-oxic (AO) process was used to further improve the effluent water quality, and the concentrations of DMA and MMA in the aerobic sludge (AS) effluent were less than  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , and the chemical oxygen demand (COD) in the effluent from the AS reactor was  $\leq 40.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , which meets the emission standard of pollutants for synthetic leather and artificial leather industry GB 21902-2008.

**Key words:** N,N-dimethylformamide; biodegradation; species differences; metabolic pathways

N,N-二甲基甲酰胺(DMF:  $(\text{CH}_3)_2\text{NHCHO}$ )由于低挥发性和优良的水溶性而被广泛应用于制革、制药和颜料化工等行业<sup>[1-2]</sup>。研究表明,中国每年仅制革行业排入环境中的DMF废水高达1亿吨,且快速增长<sup>[3]</sup>。这些废水中未降解的DMF会在水环境中迁移转化并在人体内富集,引发呼吸系统感染、肝中毒甚至肿瘤等各种疾病,侵害人体健康<sup>[4-5]</sup>。因此,迫切需要开发出经济高效且绿色环保的DMF废水处理技术。

目前,DMF废水通常采用精馏、萃取、吸附和生化法处理。精馏法一般处理含DMF浓度超过 $1.0 \times 10^5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的废水,而精馏法出水中残留的DMF浓度约 $2000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[6-8]</sup>,且处理成本高昂。Fang等<sup>[9]</sup>采用氯仿作为萃取剂,将 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的DMF废水通过2级萃取,仍有含 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的DMF无法回收。吸附法可以处理含DMF浓度为 $200 \sim 5000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的废水,且出水中DMF浓度约 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,但是吸附剂需要进一步洗脱,且脱附液的处理操作过程复杂<sup>[10-11]</sup>。GB 21902-2008《合成革与人造革工业污染物排放标准》规定现有企业污水中DMF的排放限值为 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,上述物化方法很难实现达标排放。已有研究表明,对于处理DMF浓度 $\leq 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 废水,生化法降解DMF是一种更加清洁的有机废水处理技术<sup>[12-13]</sup>。Xia等<sup>[14]</sup>在缺氧条件下降解低C/N、高有机氮废水时发现,碳源不足会导致反硝化效果差,COD去除率仅72%。已有研究<sup>[15-17]</sup>认为DMF浓度 $\geq 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,体系中好氧污泥(AS)对DMF的降解效率会降低<sup>[3]</sup>。此外以往的缺氧方法很难有效降解DMF废水,已有研究表明,DMF在缺氧条件下的降解比有氧条件更缓慢,并且在发酵过程中并未观察到DMF的降解<sup>[17]</sup>。有研究者在DMF的缺氧脱氮过程中发现,DMF对缺氧污泥具有毒性作用<sup>[4]</sup>。这些研究揭示,DMF的毒性对微生物的代谢过程具有明显的抑制作用<sup>[18]</sup>。大部分研究者通过纯化菌株和共培养污泥等方式降解DMF废水<sup>[15-16,19-20]</sup>,很少有研究者采用缺氧和好氧联合(AO)工艺处理DMF废水,通过长期的污泥驯化得到高效的DMF降解菌群,研究污泥中微生物功能菌群结构的变化有利于DMF的降解机理分析。

为实现低浓度DMF废水的达标排放,本文进行以下研究:1)在DMF不能被常规方法有效降解的情况下,寻求一种高效、清洁的降解工艺;2)通过驯化筛选可降解DMF的缺氧菌和好氧菌,研究DMF及中间产物的降解途径;分析功能微生物对DMF的降解特性;3)探究降解DMF微生物的相对丰度与DMF降解效率的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验流程及操作参数

实验过程中使用的缺氧和好氧污泥均来自甘肃省兰州市某工业污水处理厂。实验包括3部分内容:启动实验、驯化实验和缺氧-好氧联合(AO)运行实验。实验过程中所有配水均以分析纯DMF试剂配制,DMF作为唯一的碳源与氮源。启动实验在62天内分别培养两组缺氧种泥(HA-1和HA-2),该阶段使用的HA-1和HA-2种泥分别取自缺氧池的中间位置和排泥口处,HA-1污泥采用单独培养,HA-2污泥采用连续培养,单独培养是指一次性投加接种污泥和DMF废水。连续培养是指一个周期内固定流速完成DMF废水的进样。驯化实验分为缺氧驯化试验和好氧驯化试验,实验周期分别为138天和200天。HA-2培养结束的污泥用作HA驯化的底泥,HA驯化过程分为5个阶段,投加DMF的浓度从 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 逐步增加至 $210 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。AS驯化试验的底泥取自连续曝气池的中间位置,试验设置5个浓度梯度(a、b、c、d和e),进水DMF的浓度从 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 递增至 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。第201~253天AO串联运行时,DMF废水首先流入HA反应器,再经过调节池,使用氢氧化钠溶液或盐酸溶液调节pH在7.0左右,避免因pH过高导致好氧菌死亡。调节池的出水再流入AS反应器继续反应。缺氧和好氧反应器的有效容积均为11L,进水流量均为 $7.64 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,水力停留时间(HRT)均为24h,反应混合物的pH没有得到控制。缺氧、好氧池水温通过两组水浴锅控制恒温,夏季需增设鼓风机加速调节池降温,其他时间水温可自然冷却至 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 附近。调节池容积为15L,其HRT为32.72h。

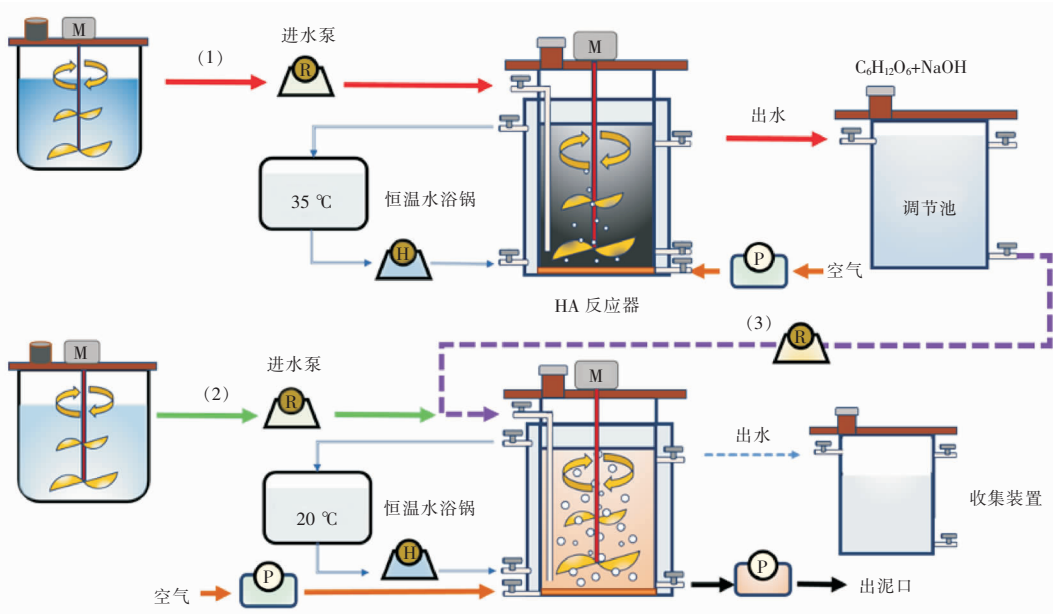


图1 处理含 DMF 废水的 AO 工艺流程图

Fig. 1 Flowchart for treatment of DMF-containing wastewater with AO process

表1 实验中所有污泥实验处理 DMF 时的参数

Tab. 1 Operating parameters of HA, AS, and AO experiments for DMF degradation

	HA-1	HA-2	HA	AS	AO
沉降比	0.35±0.05	0.45±0.02	0.70±0.03	0.45±0.03	-
污泥浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	5.7	15.0	17.5	10.0	-
有机质含量/(%)	22.75±2.54	40.17±4.83	62.35±2.06	60.76±2.72	-
容积负荷/(g·L·d <sup>-1</sup> )	0.05	0.05	0.07	0.07	-
溶解氧/(mg·L <sup>-1</sup> )	0.2±0.05	0.2±0.05	0.2±0.05	2.5±0.5	-
温度/℃	35±0.5	35±0.5	35±0.5	20±0.5	-
实验路线 <sup>a</sup>	(1)	(1)	(1)	(2)	(1)+(3)
反应周期/d	1~62	1~62	63~200	1~200	201~253

注:<sup>a</sup> 代表图1中3种不同的反应路径,(1)表示缺氧处理 DMF 的路径,(2)表示好氧处理 DMF 的路径,(1)+(3)表示缺氧反应器与好氧反应器联合运行处理 DMF 的路径。

## 1.2 实验仪器与测试方法

采用高效液相色谱仪(LC-2030, Mhimadzu, Japan)测定 DMF 浓度,系统配备 Agilent Poroshell 120(4.6 mm×150 mm, 4 μm)C18 反向色谱柱和荧光分光检测器(RF-20A, Mhimadzu, Japan)。流动相比为:25% 甲醇(V/V)、70% 超纯水和 5% 乙腈,总运行时间为 5 min,流速为 1.2 mL·min<sup>-1</sup>,进样量为 25 μL<sup>[21]</sup>。采用气相色谱仪(GC-2010-PLUS, Mhimadz, Japan)测定挥发性脂肪酸(VFAs)<sup>[22]</sup>。DMA、MMA 及 HCOOH 通过离子色谱测定;化学需氧量(COD)采用重铬酸盐分光光度法(GB 88978-1996)测定;氨氮(NH<sub>3</sub>-N)采用纳氏试剂分光光度法(HJ 535-2009)测定;总氮(TN)采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法(GB 11894-89)测定。

采用 BOD 分析仪(LH-BOD601, 兰州连华环保科技有限公司, China)在 20 ℃时测定 5 日生物化学需氧量(BOD<sub>5</sub>);采用 pH 计(PhS-3C, 上海仪电科学仪器股份有限公司, China)测定 pH。测试过程中的所有污水样本均经过 0.22 μm 聚醚砜滤膜(PES)。

## 1.3 基因组 DNA 提取、PCR 扩增和 NovaSeq PE250 测序

基因组 DNA 提取使用 \*CTAB 方法(在 1% 琼脂糖凝胶上监测 DNA 浓度和纯度,使用无菌水将 DNA 稀释至 1 ng·μL<sup>-1</sup>)提取样品的总基因组 DNA 总计每个样品使用 0.1 μg DNA 作为 DNA 样品制备的输入材料。按照制造商的建议,使用 NEBNext®DNA 文库制备试剂盒生成测序文库,

并将索引添加到每个样本中。通过剪切将基因组 DNA 随机片段化为 350bp 的大小,然后将 DNA 片段末端抛光,加 a 尾,并与 NEBNext 适配器连接,用于 Illumina 测序,并进一步富集 (polymerase chain reaction, PCR)。PCR 产物被利用 AMPure XP 系统纯化,并通过安捷伦 2100 生物分析仪分析所得文库的大小分布,所有 PCR 反应均使用 2 μm 正向引物和约 10 ng 反向引物进行 DNA 分析。

微生物聚类分析使用 QIIME2 (Version QIIME2-202202) 软件中的 DADA2 模块进行降噪,序列一致性为 100% 的 ASVs 聚类,并采用 QIIME2 的 classify-sklearn 算法<sup>[23-24]</sup> 对每个 ASVs (amplicon sequence variants) 使用预先训练好的 Naive Bayes 分类器进行物种注释。从而获得最终的 ASVs。构建好的文库经过 Qubit 和 Q-PCR 定量,文库合格后,使用 NovaSeq6000 进行 PE250 上机测序。

## 2 结果与讨论

### 2.1 两种缺氧污泥适应 DMF 的差异性

缺氧污泥对 DMF 适应的差异性通过两组种泥培养实验探究。实验研究了两种不同污泥浓度 (MLSS) 的种泥对 DMF 的耐受性与降解性。如图 2 所示,单独培养 HA-1 种泥时 DMF 的初始浓度为 20 mg · L<sup>-1</sup>。HA-1 种泥在单独培养的第 15 天和 30 天时浓度分别消减 2.34 mg · L<sup>-1</sup> 和 4.50 mg · L<sup>-1</sup>。HA-1 种泥在连续培养的第 30 天时,DMF 的投加浓度为 40 mg · L<sup>-1</sup>,DMF 浓度的日消减量 5.92 mg · L<sup>-1</sup>。这表明,持续投加目标污染物比单独引入更容易刺激微生物产生抗药性<sup>[25]</sup>。第 62 天时,HA-1 种泥中缺氧菌对 DMF 的去除效率仅为 14.22%,且污泥的 SV 仅为 0.30,这说明现有的驯化污泥并未耐受 40 mg · L<sup>-1</sup> DMF 的毒性作用,污泥中的一部分菌种死亡。HA-1 种泥的初始污泥浓度 (MLSS<sub>0</sub>) 仅为 5.7 g · L<sup>-1</sup>,以往研究者使用种泥的 MLSS<sub>0</sub> 约 15 g · L<sup>-1</sup><sup>[3,26]</sup>。此外有研究者认为 DMF 的生物降解性可能取决于种子污泥的类型<sup>[27]</sup>。因此,本阶段尝试了 HA-2 种泥的连续培养。HA-2 污泥表现出了比 HA-1 污泥更强的耐药性与降解性。

第 35~42 天,HA-1 污泥中的 NH<sub>3</sub>-N 的浓度从 10.0 mg · L<sup>-1</sup> 增加至 20.4 mg · L<sup>-1</sup>。已有研究表明,DMF 分解时污泥中的 NH<sub>3</sub>-N 并非全部来自降解的 DMF<sup>[27]</sup>。这说明本阶段培养时,HA-1 中的缺氧细菌难以降解水体中的 DMF,产生大量 NH<sub>3</sub>-N 的原因可能是 DMF 的毒性作用导致一部分细菌

死亡,这部分细胞中的 NH<sub>3</sub>-N 在细胞破裂后被释放至 HA-1 污泥中<sup>[28]</sup>。

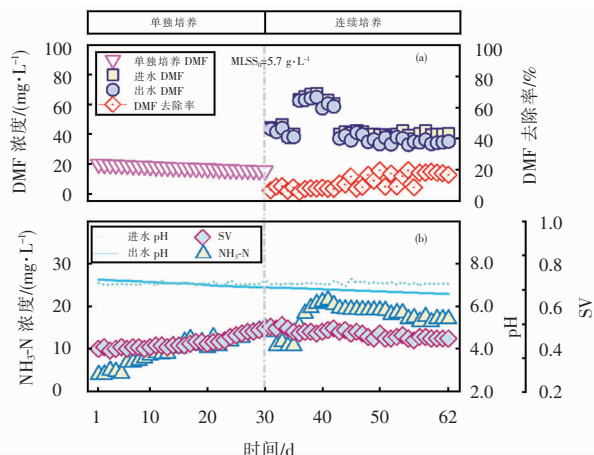


图 2 单独培养和连续培养中 DMF 的浓度、连续培养时 DMF 的去除效率以及 HA-1 污泥的 pH、SV 和 NH<sub>3</sub>-N 浓度随时间的变化

Fig. 2 Concentration of DMF in individual and continuous cultures versus DMF removal efficiency in continuous culture and changes in pH, SV, and NH<sub>3</sub>-N concentration of HA-1 sludge over time

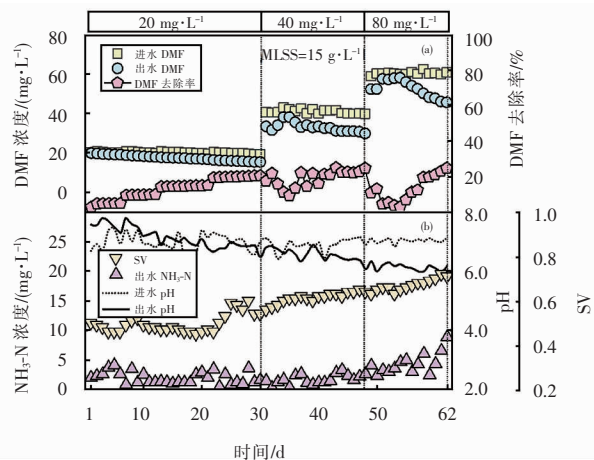


图 3 HA-2 污泥中 DMF 浓度、DMF 去除效率、pH、SV 和 NH<sub>3</sub>-N 浓度的变化

Fig. 3 Changes in DMF concentration, DMF removal efficiency, pH, SV and NH<sub>3</sub>-N concentration in HA-2 sludge

如图 3(a) 和 3(b) 所示,HA-2 种泥的初始 MLSS 为 15.0 g · L<sup>-1</sup>,第 1~62 天中污泥的 SV 从 0.50 上升至 0.71。第 30 天时,HA-2 种泥对 DMF 的去除效率为 20%,该数值超过了 HA-1 整个培养周期中 DMF 的去除效率。在连续培养的第 62 天,HA-2 污泥对 80 mg · L<sup>-1</sup> DMF 的降解效率达到 24.88%。这说明 HA-2 种泥比 HA-1 种泥更耐受 DMF 的毒性,同时 HA-2 污泥中可能出现降解

DMF 的菌株。此外整个培养过程中  $\text{NH}_3\text{-N}$  的浓度从  $2.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  增加至  $10.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 该结果表明 HA-2 污泥中 DMF 被缺氧菌降解为  $\text{NH}_3\text{-N}$  的程度在增强<sup>[27]</sup>。综上所述, HA-2 阶段可能培养出了降解 DMF 的菌株。这一猜想与 HA-1 和 HA-2 样本微生物群落扩增子(16S rDNA)测序的结果一致。在第 124 天的 16S rDNA 检测中 HA-2 中 *Zavarzinia* 在属水平相对丰度最高(14.42%), 相反, HA-1 中该菌种的相对丰度仅为 0.3%, 排名第 6。该菌属已被证明可以有效降解 DMF<sup>[28]</sup>。

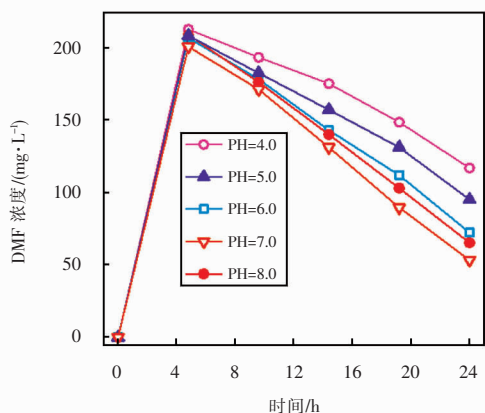
## 2.2 DMF 的缺氧代谢分析

如图 4(a) 所示, 本实验在保持进水 DMF 浓度均为  $210 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的条件下, 研究了不同进水 pH 对缺氧菌降解 DMF 性能的影响。实验发现 pH 对缺氧菌降解 DMF 有显著影响。进水 pH=4.0 时, 仅有 44.28% 的 DMF 被 DMF 降解菌分解。进水 pH=7.0 时, 约 73.64% 的 DMF 被 DMF 降解菌分解。通过 HPLC 对中间产物分析发现, pH=7.0 时 HA 出水中 DMA 和 MMA 的含量明显上升, 这证明提高进水的 pH 有助于 DMF 的水解程度增加。实验继续提高进水 pH 至 8.0 时, DMF 降解菌对 DMF 的降解效率并没有随 pH 的升高而增加, 这说明 pH=8.0 时, DMF 降解菌对 DMF 的分解能力开始减弱, pH 为 7.0 时更适宜于 DMF 降解菌生长和降解 DMF。

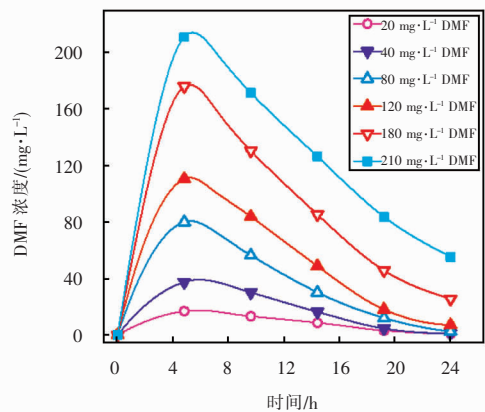
不同进水 DMF 浓度条件下缺氧污泥对 DMF 降解性能的对比研究如图 4(b) 所示。当进水  $\leq 120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, DMF 水解菌对 DMF 的去除效率均高于 94.06%。当进水 DMF 浓度为  $180 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, HA 驯化污泥降解 DMF 的效率下降至 85.80%。这表明微生物群落结构的进化正在朝着特定的方向被驯化, 部分细菌因无法适应高浓度的 DMF 而被淘汰<sup>[15]</sup>。当进水 DMF 浓度为  $210 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, HA 污泥对 DMF 的去除效率仅为 73.64%, 此时 HA 污泥中残留的 DMF 浓度约  $55.35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 残留的 DMF 需要好氧微生物降解。如图 4(c) 所示, 降解 DMF 过程中产生的 DMA 和 MMA 在 HA 污泥中持续积累, 这个现象可能是 DMA 和 MMA 对低丰度的 EDD 表现出的抑制作用导致的。

研究表明 DMF 降解系统中  $\text{NH}_3\text{-N}$  浓度为  $2000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 菌株仍具有分解 DMF 的能力<sup>[26]</sup>, 这证明高浓度  $\text{NH}_3\text{-N}$  对 DMF 的降解效果没有显著的抑制作用。当进水 DMF 浓度为  $210 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, HA 反应混合物中  $\text{NH}_3\text{-N}$  浓度最高仅为  $110 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 这证明抑制 DMF 水解可能存在其他原因。如图 4(c) 所示, 提高进水的 DMF 浓度后反应混合物中的 DMA 和 MMA 浓度明显上升, DMA 和 MMA 可能会抑制

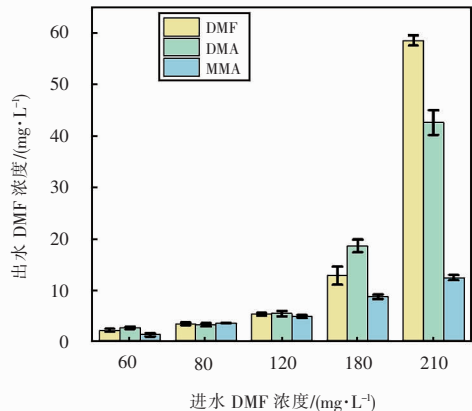
DMF 水解菌的活性, 从而减缓 DMF 降解。为了验证这一观点, 实验控制进水 DMF 浓度从  $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  增至  $210 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 结果表明, HA 反应器中 DMA 的浓度增加了 6.25 倍, MMA 的浓度增加了 3.49 倍。有研究指出 DMA 和 MMA 均具有生物毒性, 且 DMA 的毒性比 DMF 更强<sup>[15,25]</sup>。这说明缺氧降解 DMF 时, 反应器中未降解的 DMF 和降解 DMF 产生的中间产物共同的生物毒性抑制 HA 驯化污泥的生长。



(a) 不同 pH 条件下 HA 驯化污泥对 DMF 的降解曲线



(b) pH=7.0 时, HA 驯化污泥对不同进水浓度 DMF 的降解曲线



(c) 反应器中不同进水 DMF 浓度下出水中各组分的浓度

图 4 不同条件下, DMF 的降解程度与中间产物浓度的变化  
Fig. 4 Degradation degree of DMF with intermediates under different conditions

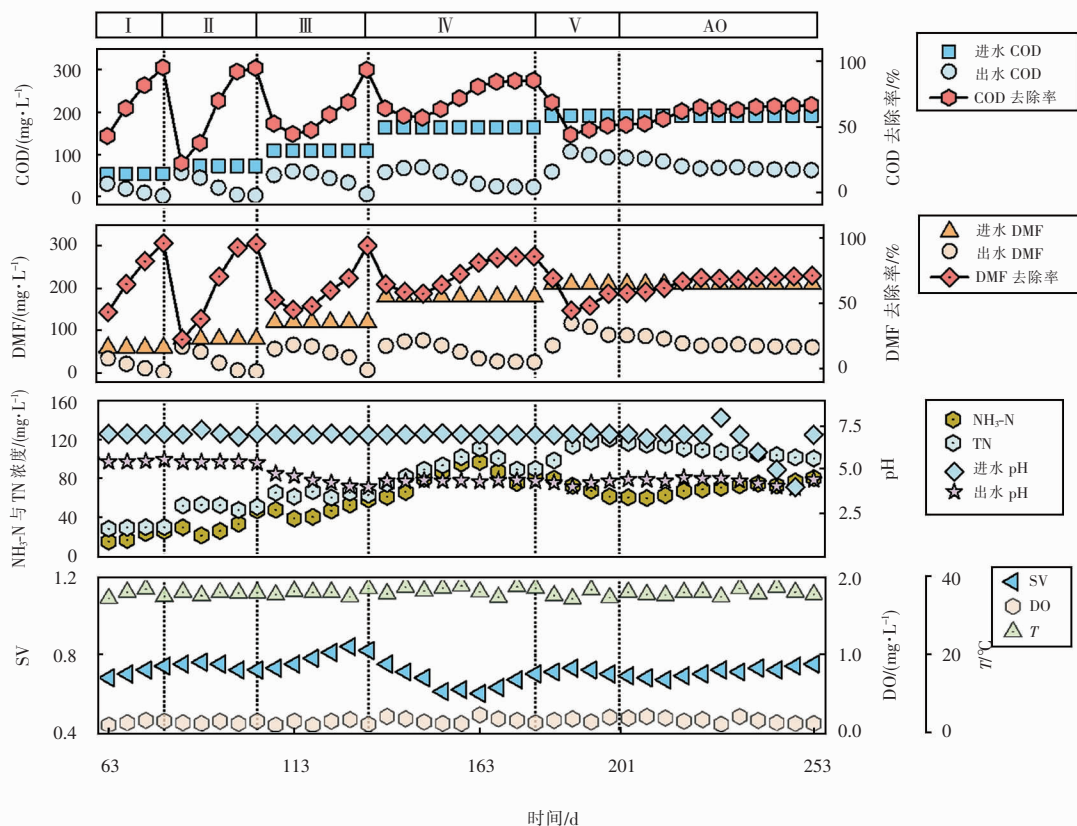


图 5 HA 驯化与 AO 工艺串联阶段中 COD、DMF、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、TN 及 pH 的变化情况

Fig. 5 Variation of COD, DMF,  $\text{NH}_3\text{-N}$ , TN and pH in the tandem phase of HA domestication and AO process

DMF 在 DMF 水解酶 (DMFase) 的作用下首先分解为 DMA 和  $\text{HCOOH}$ , 少量的 DMA 进一步被缺氧菌分解为 MMA<sup>[15]</sup>, 此外, 这个过程中 DMF 中的氮元素被脱氮菌最终转化为  $\text{NH}_3\text{-N}$ 。在 DMF 和 DMA 的叠加毒性作用下, DMF 水解菌的活性在低浓度 DMF 的 HA 驯化污泥中并未被抑制, 并且 DMF 水解菌表现出了良好的降解活性<sup>[29]</sup>。已有报道称  $\text{NO}_3^-$  会有效促进 DMF 水解菌的生长和 DMF 的去除。原因是  $\text{NO}_2^-$  反硝化可以不断产生电子, 电子促进  $\text{N}_2$  的产生并加速 DMF 的水解<sup>[15, 30]</sup>。水解过程生成的  $\text{HCOOH}$  被兼氧细菌氧化成  $\text{CO}_2$ , 在氨化过程中作为电子供体, 供给 DMF 脱氮所需的电子<sup>[31]</sup>。

### 2.3 AS 培养降解 DMF 的活性污泥

尽管已有报道称, AS 菌群能够在 DMF 浓度为  $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的溶液中存活, 溶解性有机碳的去除效率高达 98%, 但是这项研究中 TN 的去除效率仅为 48%<sup>[32]</sup>。课题组进行了一组 200 天的 AS 污泥驯化实验。AS 污泥絮体长期保持了优良的脱碳和脱氮能力, 其对 DMF 和 TN 的去除效率分别为 95.2% 和 87.50%。如图 6 所示, a、b 段污泥 SV 稳定上升, 这

表明污泥生长状态良好; c 段开始时, AS 污泥的 SV 增长速度明显减慢, 污泥中 TN 的浓度在 e 段初期从  $17.2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  快速上升至  $28.6\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 这可能是因为提高 OLR 后一部分 AS 污泥死亡。AO 段表示缺氧串联好氧运行的阶段, 此时 AS 污泥出水中  $\text{NH}_3\text{-N}$  浓度为  $7.2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , TN 的浓度为  $10.6\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{NH}_3\text{-N}$  除了细胞自身利用外, 一部分以  $\text{NH}_3$  气体的形式流入空气中<sup>[26, 33]</sup>。DMF 水解产生的  $\text{NH}_3\text{-N}$  会通过硝化作用产生  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{NO}_2^-$ , 根据以往研究的描述, 在好氧条件下, DMF 首先通过 DMFase 酶水解为 DMA, 然后 DMA 通过有氧呼吸作用进一步被降解为 MMA, 并释放能量供细胞生长<sup>[4, 34]</sup>。利用好氧菌容易将 DMA 进一步分解为 MMA 的特性, 降解 DMF 的优势菌门才能彻底水解 DMF 产生  $\text{NH}_3\text{-N}$  和  $\text{CO}_2$ 。

比较不同 DMF 进水浓度的 AS 驯化实验发现, 当进水 DMF 浓度  $\leq 100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, AS 反应器均能实现运行稳定, 每个阶段驯化稳定后 AS 污泥对 COD 去除率始终维持在 95% 以上。已有研究表明, 当 DMF 浓度从  $40\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  增加到  $100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, DMF 的生物毒性增加了 0.4 倍<sup>[29]</sup>, AS 污泥中毒性

增强会使一些污泥细胞死亡,这可能是 d 段和 e 段的初期污泥 SV 下降的原因。

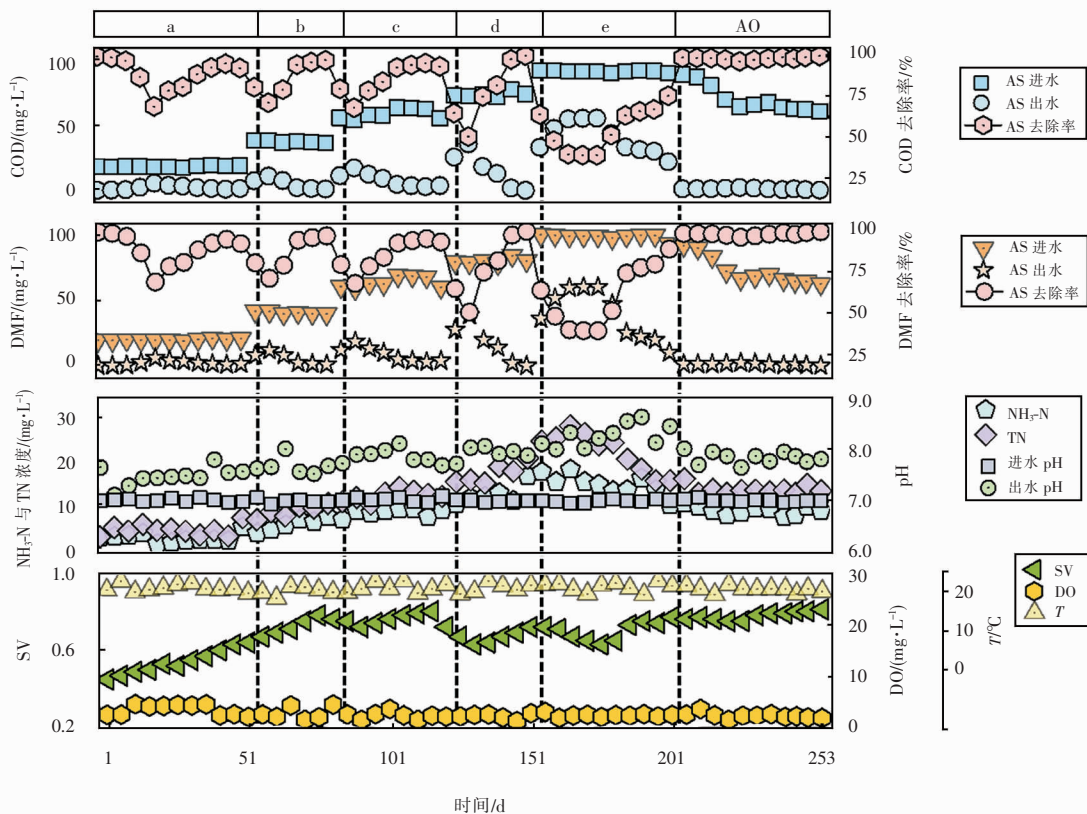


图6 AS驯化与AO工艺串联运行中COD、DMF、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、TN及pH的变化情况

Fig. 6 Changes of COD, DMF,  $\text{NH}_3\text{-N}$ , TN and pH in the tandem operation of AS domestication and AO process

## 2.4 16S rDNA 扩增子测序分析

### 2.4.1 DMF对微生物群落结构的影响

基于100%的序列一致性原则,16S rDNA的检测结果从最终的94 952个高质量细菌reads中共生成3 860个ASVs。在此基础上,实验一共鉴定出49门,598属。

分别对驯化第1天和第61天的HA-1,第1天和第62天的HA-2,第148天和第200天的HA,第1天、第63天、第200天的AS微生物基因测序,此时各系统的运行条件均保持稳定。

由图7(a)可知,HA-1、HA-2、HA和AS污泥中细菌和古细菌的百分含量存在明显差异。在第200天时,HA和AS污泥中古细菌含量分别占21.06%和13.92%。此外,Chao1指数在HA-200中明显高于HA-148(见图7(d)),这说明HA驯化过程中EDD菌群不断繁殖,也证实HA驯化了DMF降解菌株。AS-200的驯化细菌Shannon指数比HA-200更大(见图7(e)),这说明第200天时,AS中的群落多样性高于HA,且物种分布的更加均匀。第200天时,对HA污泥样本微生物16S rDNA测序发现,相对丰

度前4的菌属有:*Zavarzinia* (32.53%)、*Petrimonas* (10.93%)、*Brevundimonas* (9.85%)和*Acholeplasma* (9.71%)。*Zavarzinia*、*Petrimonas*和*Brevundimonas*均来自*Proteobacteria* (55.67%),*Acholeplasma*来自于*Firmicutes* (25.02%)菌门,而*Zavarzinia*、*Brevundimonas*和*Acholeplasma*在DMF的反硝化脱氮过程中被报道<sup>[35]</sup>。

AS驯化稳定时的优势菌属有:*Paracoccus* (27.01%)、*Burkholderia* (13.14%)、*Nitrosomonas* (11.88%)和*Zavarzinia* (10.06%)。其中,*Proteobacteria*、*Euryarchaeota*和*Bacteroidota*菌门已被证实存在降解DMF的好氧菌<sup>[29,36-37]</sup>。但是目前关于*Patiscibacteria*菌门降解DMF的研究并未报道。尽管AS与HA驯化时的结果在门水平上分布相似,*Proteobacteria*、*Firmicutes*和*Bacteroidota*菌门在两组反应器中均存在。但是DMF降解菌在属水平上的分布在AS和HA之间存在明显差异。16S rDNA基因测序结果显示,HA体系未发现*Nitrosomonas*菌属,AS中*Nitrosomonas*菌属的相对丰度为11.88%,已有研究表明,该菌属能够氧化少量

的  $\text{NH}_3\text{-N}$ , 这个过程产生的能量用于还原  $\text{CO}_2$ , 部分的  $\text{NH}_3\text{-N}$  和  $\text{CO}_2$  合成自身细胞<sup>[38-40]</sup>。

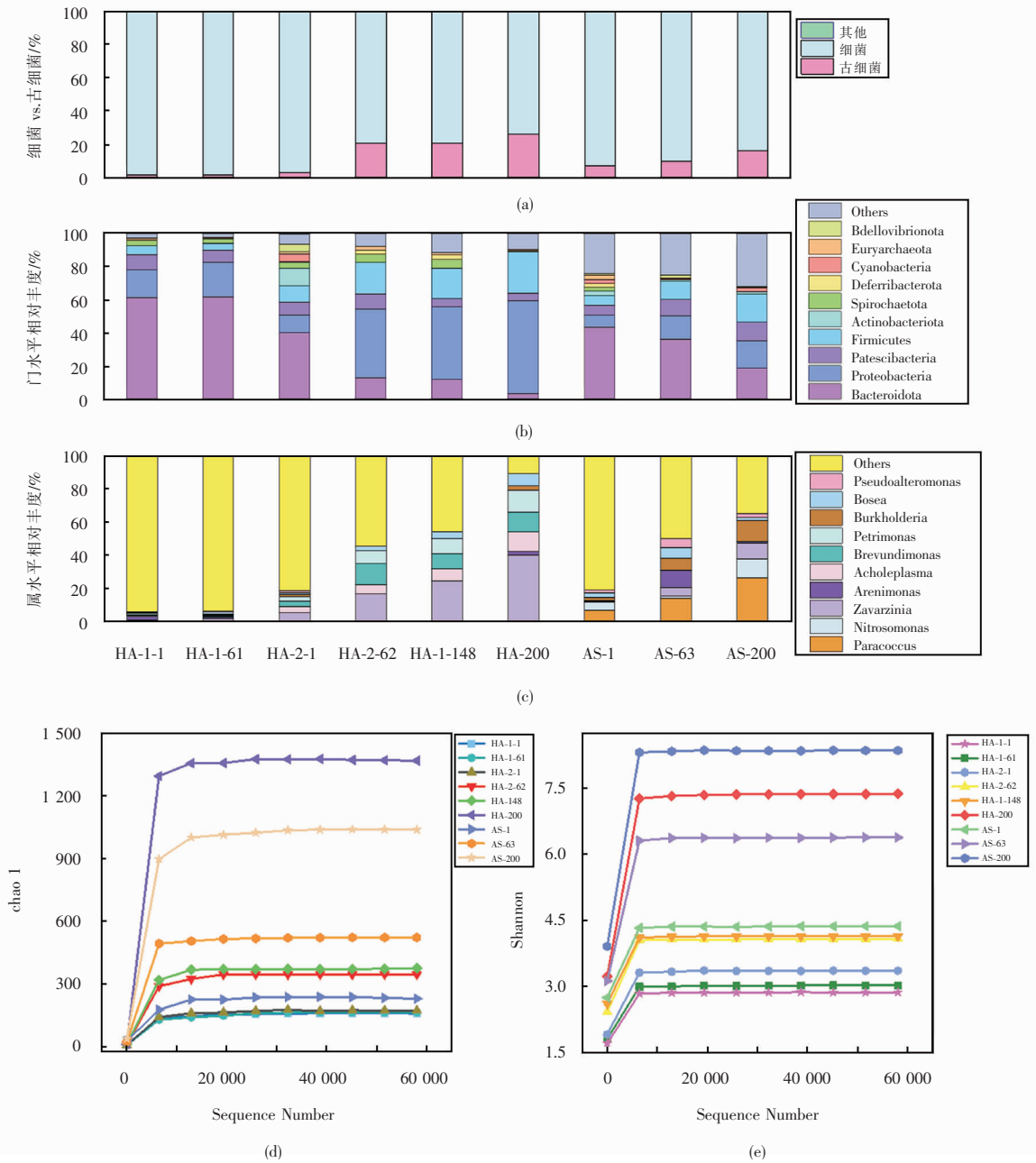


图 7 微生物群落结构分析

Fig. 7 Analysis of microbial community structure

### 2.4.2 微生物差异种分析

在实验的第 200 天时, 本文研究了 HA 污泥和 AS 污泥群落结构的差异。在属水平分析发现, *Paracoccus* 在两组中具有显著性差异, 并且该菌属在 AS 反应器中相对丰度高于 HA 反应器。对比 AS 污泥中的菌种, HA-2 污泥中的 *Zavarzinia compransoris*、*Acholeplasma manati* 和 *Spirochetales bacterium enrichment culture clone\_D2CL\_Bac\_16S\_Clone1* 的物种数量明显高于 AS 污泥, 这

些菌种也被鉴定为 *Proteobacteria*、*Firmicutes* 和 *Spirochaetota* 菌门中降解 DMF 的优势物种, 它们促进了 DMF 的水解过程。AS 污泥中 *Flavobacterium bacterium\_40-80* 和 *Candidatus\_Adlerbacteria bacterium\_GW2011\_GWC1\_50\_9* 与 HA-2 中两种菌株存在显著性差异, 并且相对丰度高于 HA-2 污泥。AS-200 污泥中 *Proteobacteria* 门、*Gamma proteobacteria* 纲、*Saccharimonadales* 目和 *Saccharimonadaceae* 科的微生物具有显著性差异, 这些 AS

菌株的丰度明显高于 HA 菌株,其中 *Burkholderiales* 目在 AS 污泥中相对丰度高于 HA-1 污泥和 HA 污泥,已有文献确定该菌株可以降解 DMF,但高的 C/N 对该菌株的生长存在明显的抑制作用<sup>[38]</sup>。

## 2.5 DMF 在微生物群落中的代谢途径

以往研究者认为有关 DMF 生物降解的代谢途径有两种可能性,在途径 1 中,DMF 先被酶 DMFase 水解为 DMA 和 HCOOH,该酶也被确定对 DMF 的水解具有唯一性<sup>[12,38,41-42]</sup>。中间产物 DMA 再转化为 MMA。在途径 2 中,DMF 通过反复失去甲基而被降解,DMF 第一次氧化去甲基化转化为 N-甲基甲酰胺(NMF),NMF 再次氧化去甲基化转化为甲醛(HCHO)和甲酰胺(F)<sup>[15]</sup>。通过 UPLC 分析发现,DMF 在缺氧菌群降解的主要过程为途径 1,这个过程起始阶段会产生 DMA,并逐渐积累,*Parcubacteria* 门的部分兼氧菌会分解 DMA,直至 AS 中的 DMA 和 MMA 被消耗完全,证明当前微生物群落适应了 DMF 和中间产物共存的毒性环境。研究表明,DMF、DMA 与 MMA 等进入人体后在代谢过程中可形成羟基自由基等代谢产物<sup>[43]</sup>。当其与细胞膜反应时,可引起细胞膜脂质过氧化,导致细胞内的蛋白质、酶、DNA 等生物大分子的结构和功能改变,引起细胞各类氧化功能改变、代谢紊乱、DNA 损伤和细胞死亡<sup>[44-46]</sup>。

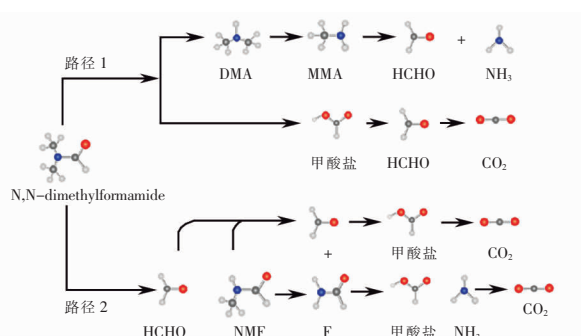


图 8 DMF 的转化途径

Fig. 8 Transformation pathway of DMF

根据以往研究的描述,在好氧条件下,DMF 首先通过 DMFase 酶水解为 DMA,然后 DMA 通过有氧呼吸作用进一步被降解为 MMA,并释放能量供细胞生长<sup>[3,38]</sup>。在该合成代谢过程中注释的优势菌门有 *Patescibacteria*、*Proteobacteria*、*Firmicutes* 和 *Bacteroidota*,这些微生物决定 DMF 的水解程度。这表明具有毒性的 DMF 诱导了微生物菌群的选择。利用好氧菌容易将 DMA 进一步分解为 MMA 的特性,*Patescibacteria*、*Proteobacteria*、*Firmicutes*

和 *Bacteroidota* 等优势菌门才能彻底水解 DMF 产生  $\text{NH}_3\text{-N}$  和  $\text{CO}_2$ 。

## 3 结论

由于缺乏 DMF 水解菌,缺氧污泥无法有效降解 DMF。驯化高相对丰度含有 *Proteobacteria* 和 *Firmicutes* 菌门的水解菌大幅提高了 DMF 的降解效率。

1) HA 污泥的优势菌群为 *Zavarzinia*、*Petrimonas*、*Acholeplasma*、*Brevundimonas*、*Arenimonas* 和 *Bosea*。DMF 降解菌群的相对丰度与 DMF 去除效率具有良好的相关性。HA 污泥驯化的第 148 天时,相对丰度为 40.25% 的 DMF 降解菌对 DMF 去除效率仅为 57.22%,DMA 对低丰度 DMF 降解菌活性表现出明显的抑制作用。第 200 天时,相对丰度为 86.37% 的 DMF 降解菌对 DMF 去除效率为 99.98%。

2) 采用 AO 联合工艺处理 DMF 时,当 HA 进水 DMF 浓度为  $210 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,AS 反应器出水中  $\text{COD} \leq 40.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,AO 联合工艺在 AS 阶段对 TN 的去除效率达到 85.70%,并且 AS 出水水质满足 GB 21902-2008《合成革与人造革工业污染物排放标准》规定的现有企业污水中 DMF 的排放限值。

3) 通过对含 DMF 废水长期的污泥驯化,实验通过 AO 联合技术实现了对一种含 DMF 废水的高效降解。

由于时间关系,实验过程并未对厌氧条件下 DMF 的降解展开研究,仅在缺氧和好氧条件下讨论 DMF 的降解菌群和降解机理问题,同时,对 DMF 降解菌的探究并未深入至相关蛋白酶的表达,下一步计划从发挥作用的蛋白酶展开研究,从机理上分析 DMF 在微生物作用下各种含氮形态下的转化过程。

## 参考文献:

- [1] YANG Q, SANE N, KLOSOWSKI D, et al. Mizoroki heck cross-coupling of bromobenzenes with styrenes. another example of Pd-catalyzed cross-coupling with potential safety hazards[J]. *Organic Process Research & Development*, 2019, 23: 2148.
- [2] 张玉杰,任学昌. 三种石墨相氮化碳活化过一硫酸氢盐降解染料废水[J]. *兰州交通大学学报*, 2021, 40(2): 121-127.
- [3] CAO L L, SU C Y, LU Y Y, et al. Long-term performance study applying a tandem AnSBR-ASBR to treat wastewater containing N,N-dimethylformamide, sludge physicochemical properties, microecology, and functional genes [J]. *Environmental Chemical Engineering*,

- 2023,11(2):439-447.
- [4] LI L, KONG Z, XUE Y. A comparative long-term operation using up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) and anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) for the upgrading of anaerobic treatment of N, N-dimethylformamide-containing wastewater[J]. *Science of The Total Environment*, 2020, 699:361-370.
- [5] 刘建林, 朱晓非. 高疏水石英砂滤料的制备及其油水分离性能研究[J]. *兰州交通大学学报*, 2019, 38(2):99-103, 109.
- [6] ZHANG Q, XU R, XU P W. Performance study of ZrO<sub>2</sub> ceramic micro-filtration membranes used in pretreatment of DMF wastewater[J]. *Desalination*, 2014, 346(1):1-8.
- [7] GAO X L, YIN X M, YANG S. Use of multiple inter-reboilers to achieve energy savings and improve thermodynamic efficiency of the distillation of N, N-dimethylformamide wastewater [J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2019, 36(1):77-83.
- [8] 未碧贵. 混合滤料的润湿性及其过滤处理含油废水性能[J]. *中国环境科学*, 2022, 42(5):2105-2111.
- [9] FANG J, LI C L, SONG B. A new process for treating DMF-containing wastewater in pharmacy industry[J]. *Environment Engineering*, 2009, 27(4):32-39.
- [10] RAZALI M, KIM J F, ATTFIELD M. Sustainable wastewater treatment and recycling in membrane manufacturing[J]. *Green Chemistry*, 2015, 17(12):5196-5205.
- [11] ZHENG H, GU Y, WANG L. Treatment of DMF wastewater by double-effect distillation-adsorption process[J]. *China Environmental Protection Industry*, 2015, 20(7):50-52.
- [12] SANJEEVKUMAR S, NAYAK A S, SANTOSHKUMAR M, et al. *Paracoccus denitrificans* SD1 mediated augmentation with indigenous mixed cultures for enhanced removal of N, N-dimethylformamide from industrial effluents[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 79:1-6.
- [13] ZHOU X, JIN W B, SUN C F, et al. Microbial degradation of N, N-dimethylformamide by *Paracoccus* sp. strain DMF-3 from activated sludge[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 343:324-330.
- [14] 夏永康, 马睿莉. 分段进水比对两级A/O-海绵填料工艺处理DMF废水的影响[J]. *工业水处理*, 2022, 42(1):85-91.
- [15] KONG Z, LI L, KURIHARA R. Anaerobic treatment of N, N-dimethylformamide-containing wastewater by co-culturing two sources of inoculum[J]. *Water Research*, 2018, 139:228-239.
- [16] KONG Z, LI L, KATO H, et al. Dissection and characterization of the prokaryotic community during the long-term operation of a submerged anaerobic membrane bioreactor for the anaerobic treatment of N, N-dimethylformamide-containing wastewater with a co-cultured inoculum[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 282:482-493.
- [17] BROMLEY-CHALLENGER K C A, CAGGIANO N, KNAPP J S. Bacterial growth on N, N-dimethylformamide; implications for the biotreatment of industrial wastewater[J]. *Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2000, 25(1):8-16.
- [18] CHEN X R, ZHAO J G, ZHAO J, et al. Contrasting sludge toxicity under various starting modes (shocking or acclimating) and original organics (with or without N, N-dimethylformamide (DMF))[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015, 104:435-442.
- [19] SWAROOP S, SUGHOSH P, RAMANATHAN G. Biomining of N, N-dimethylformamide by *Paracoccus* sp. strain DMF[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 171(1):268-272.
- [20] BOLDYEN E, RIDEOUT J R, DILLON M R, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 [J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(8):852-857.
- [21] KONG Z, LI L, WANG T J. New insights into the cultivation of N, N-dimethylformamide-degrading methanogenic consortium; a long-term investigation on the variation of prokaryotic community inoculated with activated sludge[J]. *Environmental Research*, 2020, 182:109-117.
- [22] KÜÇÜKAĞA Y, FACCHIN A, STEFANELLI V, et al. Innovative char-sparger for improving volatile fatty acids (VFA) production in homoacetogenic fermentation of H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> with microbial mixed cultures (MMC)[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 471:144-165.
- [23] BOKULICH N A, KAEHLER B D, RIDEOUT J R, et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin[J]. *Microbiome*, 2018, 6(1):90.
- [24] GHISALBA O, CEVEY P, KÜENZI M, et al. Biodegradation of chemical waste by specialized methylotrophs, an alternative to physical methods of waste disposal[J]. *Conservation & Recycling*, 1985, 8(1):47-71.
- [25] KONG Z, LI L, WU J. Insights into the methanogenic degradation of N, N-dimethylformamide; the functional microorganisms and their ecological relationships [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 271:37-47.
- [26] YANG N, CHEN X R, LIN F K, et al. Toxicity for-

- mation and distribution in activated sludge during treatment of N, N - dimethylformamide (DMF) wastewater[J]. *Hazardous Materials*, 2014, 264(13): 278-285.
- [27] WANG J, LIU X L, JIANG X B. Facilitated bio-mineralization of N,N-dimethylformamide in anoxic denitrification system; Long-term performance and biological mechanism[J]. *Water Research*, 2020, 186: 298-306.
- [28] JÉRÔME V, HERMANN M, HILBRIG F, et al. Development of a fed-batch process for the production of a dye-linked formaldehyde dehydrogenase in *Hyphomicrobium zavarzini* ZV 580[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 77(4): 779-788.
- [29] BHOJANI G, BINOD K S, KUMAR S N, et al. Membrane biofouling by chlorine resistant *Bacillus* spp. : effect of feedwater chlorination on bacteria and membrane biofouling [J]. *Biofouling*, 2018, 34(4): 426-439.
- [30] DHAR K, SUBASHCHANDRABOSE S R, VENKATESWARLU K, et al. *Mesorhizobium tamadayense* MM3441: a novel methylotroph with a great potential in degrading N,N'-dimethylformamide[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2020, 153: 105-113.
- [31] CHEN Y W, LI B, QIU Y, et al. A novel chemical/biological combined technique for N, N - dimethylformamide wastewater treatment [J]. *Environmental Technology*, 2016, 37(9): 1088-1093.
- [32] CHEN Z B, SU H Y, HU D X, et al. Effect of organic loading rate on the removal of DMF, MC and IPA by a pilot-scale an MBR for treating chemical synthesis-based antibiotic solvent wastewater [J]. *Chemosphere*, 2018, 198: 49-58.
- [33] LU X Y, WANG W W, ZHANG L G G. Molecular Mechanism of N,N-Dimethylformamide degradation in *Methylobacterium sp.* strain DM1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(12): 275-289.
- [34] LI J H, DIJKSTRA P, LU Q H, et al. Genomics-informed insights into microbial degradation of N,N-dimethylformamide[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2021, 163: 274-283.
- [35] WANG Y Y, GUO H, GAO X G, et al. The intratumor microbiota signatures associate with subtype, tumor stage, and survival status of esophageal carcinoma[J]. *Frontiers in Oncology*, 2021, 11: 754-788.
- [36] QIAN Y F, XU M Y, DENG T C, et al. Synergistic interactions of *Desulfovibrio* and *Petrimonas* for sulfate-reduction coupling polycyclic aromatic hydrocarbon degradation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 407: 371-385.
- [37] SUN Y Y, LI M, LI Y Y, et al. The effect of *Clostridium butyricum* on symptoms and fecal microbiota in diarrhea-dominant irritable bowel syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 953-964.
- [38] KONG Z, LI L, WU J, et al. Insights into the methanogenic degradation of N, N-dimethylformamide; the functional microorganisms and their ecological relationships[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 271: 37-47.
- [39] WANG J, LIU X L, JIANG X B, et al. Facilitated bio-mineralization of N, N-dimethylformamide in anoxic denitrification system; long-term performance and biological mechanism[J]. *Water Research*, 2020, 186: 295-306.
- [40] YANG G, XU H, LUO Y D, et al. Novel electro-assisted micro-aerobic cathode biological technology induces oxidative demethylation of N, N - dimethylformamide for efficient ammonification of refractory membrane-making wastewater[J]. *Hazardous Materials*, 2023, 442: 1300-1311.
- [41] SIDDAVATTAM D, KAREGOUDAR TIMMANAGUDA B, MUDDU SANTOSH K. Genome of a novel isolate of *paracoccus denitrificans* capable of degrading N,N-dimethylformamide[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(19): 5598-5599.
- [42] DZIEWIT L, DMOWSKI M, BAJ J, et al. Plasmid pAMI2 of *Paracoccus aminophilus* JCM 7686 Carries N,N-Dimethylformamide degradation-related genes whose expression is activated by a LuxR family regulator[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(6): 1861-1869.
- [43] 娄域峰. 低浓度甲苯、甲醇、二甲基甲酰胺长期接触者氧化功能变化研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009.
- [44] 羌宇星. N,N,N~', N~'-间苯二甲胺基四乙酸配体、配合物制备表征以及催化性质研究[D]. 上海: 上海大学, 2011.
- [45] LIU C H, WANG H M. Long-term neurotoxic effects of dimethylamine borane intoxication[J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 2012, 319(1): 147-151.
- [46] POSTE A E, GRUNG M, WRIGHT R F. Amines and amine-related compounds in surface waters: a review of sources, concentrations and aquatic toxicity[J]. *Science of The Total Environment*, 2014, 481: 274-279.