



文章栏目：环境生物技术

DOI 10.12030/j.cjee.202301038

中图分类号 X703

文献标识码 A

娄雨晴, 苑泉, 王纯, 等. 微量胼对厌氧氨氧化生物膜长期运行效果的影响[J]. 环境工程学报, 2023, 17(5): 1631-1640. [LOU Yuqing, YUAN Quan, WANG Chun, et al. Effects of trace hydrazine on long-term operation of anammox biofilm[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2023, 17(5): 1631-1640.]

微量胼对厌氧氨氧化生物膜长期运行效果的影响

娄雨晴¹, 苑泉¹, 王纯¹, 王铁健², 孙迎雪^{1,✉}, 吕伟博², 陈云³, 钱亮³, 贺北平³

1. 北京工商大学生态环境学院, 北京 100048; 2. 唐山曹妃甸城市排水有限公司, 唐山 063200; 3. 浦华控股有限公司, 北京 100084

摘要 为探究微量胼(N_2H_4)对厌氧氨氧化生物膜的长期影响, 采用 3 个移动床生物膜反应器(moving bed biofilm reactor, MBBR)处理低浓度氨氮(50.9 ± 3.6) $mg\cdot L^{-1}$ 废水, 分别加入 $0\ mg\cdot L^{-1}$ (对照组, R1)、 $5\ mg\cdot L^{-1}$ (R2) 和 $10\ mg\cdot L^{-1}$ (R3) 的微量 N_2H_4 后连续运行 35 d, 考察 N_2H_4 对 MBBR 系统中总氮去除速率(total nitrogen removal rate, TNRR)、生物量、胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)、血红素和微生物群落的影响。结果显示, 运行末期相对于 R1, R2 和 R3 的 NRR 分别下降了 53% 和 64%。 N_2H_4 质量浓度为 $5\ mg\cdot L^{-1}$ 时, 生物膜的 EPS 分泌量提高, 触发了生物膜保护机制; 当 N_2H_4 质量浓度为 $10\ mg\cdot L^{-1}$ 时, 生物膜的 EPS 和血红素含量均明显下降, N_2H_4 对生物膜产生抑制作用。长期添加微量 N_2H_4 导致门水平中 *Planctomycetes* 和 *Candidatus_Kuenenia* 的相对丰度降低, 可见, N_2H_4 的加入可以使 NRR 短暂增长, 但长期加入会对厌氧氨氧化生物膜产生生物毒性, 抑制厌氧氨氧化菌(AnAOB)的活性。整体而言, $5\ mg\cdot L^{-1}$ 和 $10\ mg\cdot L^{-1}$ 的 N_2H_4 的加入都难以维持 MBBR 长期稳定高效运行, 其对厌氧氨氧化生物膜的负面影响更为明显。

关键词 外源胼; 厌氧氨氧化; 移动床生物膜反应器; 胞外聚合物; 血红素

厌氧氨氧化(anaerobic ammonium oxidation, Anammox)可以代替传统硝化反硝化工艺去除污水中的氮, 具有能耗低、产泥量少、无需外加碳源和运行成本低等优势^[1], 被认为是最有前途的生物脱氮工艺之一。由于厌氧氨氧化生长缓慢, 倍增时间长, 工程上采用生物膜^[2]或颗粒污泥^[3]形态滞留厌氧氨氧化菌(anaerobic ammonium oxidation bacteria, AnAOB), 以保证系统稳定运行。目前, 厌氧氨氧化工艺已成功应用于污泥厌氧消化上清液^[4]等高浓度氨氮污水处理中。由于城市污水具有氨氮浓度低、温度低等特点, 限制了厌氧氨氧化的主流应用^[5]。为提高 AnAOB 活性, 通常采用投加 FeS ^[6]、 $Fe(III)$ ^[7]、纳米零价铁(nZVI)^[8]、羟胺(NH_2OH)^[9]、胼(N_2H_4)^[10]、石墨烯^[11]以及生物炭^[12]等辅助材料。其中, N_2H_4 作为厌氧氨氧化代谢中间产物受到广泛关注。 N_2H_4 可以通过抑制其他细菌生长, 降低与 AnAOB 对底物的竞争, 同时为 AnAOB 的生长提供额外能量, 减少 $NO_3^- - N$ 的产生, 从而提高厌氧氨氧化反应器脱氮性能^[13-15]。

YAO 等^[16]研究表明, 当加入 $3.99\ mg\cdot L^{-1}$ 的 N_2H_4 时, CANON 系统中颗粒污泥的厌氧氨氧化活性增加, 当 N_2H_4 质量浓度为 $4.86\ mg\cdot L^{-1}$ 时, 可以缓解 $NO_2^- - N$ 对 AnAOB 活性的抑制^[17]。MIODOŃSKI 等添加了 $3.7\ mg\cdot L^{-1}$ 的 N_2H_4 后, 在高基质浓度条件下厌氧氨氧化系统在 42 d 内完成了

收稿日期: 2023-01-10; 录用日期: 2023-04-11

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFE0104900); 北京工商大学青年教师科研启动基金项目(QNJJ2021-28)

第一作者: 娄雨晴(1998—), 女, 硕士研究生, louyuqing07@hotmail.com; ✉通信作者: 孙迎雪(1973—), 女, 博士, 教授, sunyx@th.btbu.edu.cn

快速启动, 平均氮负荷率 (nitrogen loading rate, NLR) 比对照组高 2 倍^[18]。蔡庆等^[19]通过批式实验研究 N_2H_4 对高基质浓度下 (NH_4^+-N 约 $225\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, NO_2^--N 约 $280\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 厌氧氨氧化颗粒污泥的短期影响, 结果发现, 当 N_2H_4 质量浓度在 $1.8\sim 9.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 厌氧氨氧化活性明显增加。XIANG 等^[20]研究发现当 N_2H_4 质量浓度为 $2\sim 5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 纯颗粒污泥和絮体-颗粒混合污泥的反应器均可保持长达 4 个月的稳定高效运行, 但纯颗粒污泥系统具有更高效的性能, 总氮去除速率 (total nitrogen removal rate, TNRR) 达到 $(0.33\pm 0.04)\text{ g}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$ 。可见, N_2H_4 对 AnAOB 活性的影响不仅与 N_2H_4 质量浓度有关, 还与污泥形态有关。目前大部分研究集中于 N_2H_4 对颗粒形态 AnAOB 的影响, 而低质量浓度 N_2H_4 对生物膜形态厌氧氨氧化体系的研究尚有不足。但在城市污水低氨氮浓度条件下, 厌氧氨氧化颗粒污泥粒径小, 难以有效持留在系统中^[21], 而通过载体形成的厌氧氨氧化生物膜可被有效截留于反应器中, 因此, 生物膜形式的厌氧氨氧化技术具有更广泛的应用。悬浮载体上的生物膜可自发富集 AnAOB, 加速 AnAOB 的粘附与生长, 从而加速主流厌氧氨氧化工艺性能的提升^[2]。由于生物膜传氧限制, 厌氧氨氧化生物膜可以在低溶解氧 (dissolved oxygen, DO) 环境下生长, 对正常的北方气候温度和低氨氮底物浓度适应良好^[22]。因此, 探究低质量浓度 N_2H_4 对厌氧氨氧化生物膜的长期影响, 可以为厌氧氨氧化的在城市污水脱氮中的应用提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 实验装置

实验室规模的小试采用 3 个圆柱形移动床生物膜反应器, 有效容积为 2 L。R1 为对照组, R2 和 R3 中分别添加 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 N_2H_4 。3 个反应器中均填充已挂膜的填料, 填充比为 35%, 填料直径为 25 mm, 高 10 mm。采用序批式活性污泥法 (sequencing batch reactor activated sludge process, SBR) 运行, 周期为 6 h (360 min), 包括 5 min 进水, 340 min 搅拌, 14 min 沉降和 1 min 排水, HRT 为 1 d, 日处理量为 $2\text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$ 。3 个反应器均在常温条件下运行, 温度在 $(27.6\pm 2.4)\text{ }^\circ\text{C}$ 。反应器装置如图 1 所示。

1.2 生物膜与模拟废水

实验中用到的生物膜污泥来自实验室稳定运行 196 d 的移动床生物膜反应器 (moving bed biofilm reactor, MBBR), NLR 为 $0.6\text{ kg}\cdot(\text{m}^3\cdot\text{d})^{-1}$, 生物膜系统中的污泥质量浓度为 $(1\ 800\pm 100)\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

实验采用模拟废水, 主要成分有 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ }NH_4^+-N$ 、 $55\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ }NO_2^--N$ 、 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ }CaCl_2\cdot 2H_2O$ 、 $180\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ }MgSO_4\cdot 7H_2O$ 、 $27.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ }KH_2PO_4$ 以及 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ }NaHCO_3$ 。每升废水分别加入 1 mL 微量元素 I 和 II^[23]。 N_2H_4 以 $N_2H_4\cdot H_2SO_4$ 的形式投加。初始 pH 通过滴加 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HCl 或 NaOH 溶液调节到 6.9~7.3。配水采用自来水, 未对其进行脱氧处理, 进水 DO 质量浓度为 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.3 实验设计

整个过程按不同运行参数分为 3 阶段。阶段 I (1~11 d): 为获取较为稳定的实验条件, 反应器在初始 NLR 下运行。阶段 II (12~46 d): 加入 N_2H_4 运行, 3 个反应器 N_2H_4 质量浓度分别为 0、5、 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。阶段 III (47~60 d): 停止加入 N_2H_4 , 反应器继续运行。实验设计如表 1 所示。

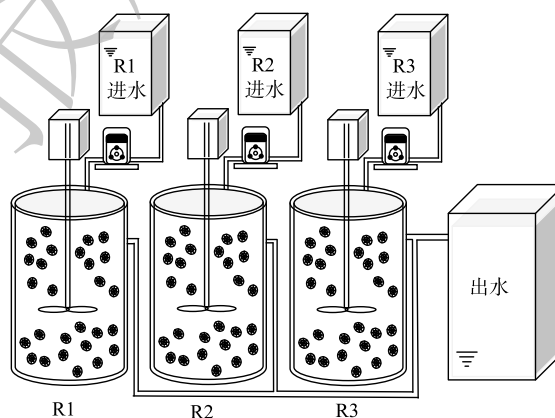


图 1 MBBR 反应器示意图

Fig. 1 Schematic diagram of MBBR

1.4 分析方法

用比色法测定 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 N_2H_4 的质量浓度。其中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 采用标准测试方法^[24]。通过加入 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ HCl}$ 和 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ KIO}_3$ 溶液消除 N_2H_4 对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 测定的干扰^[25]。 N_2H_4 依照 Watt 和 Chrisp^[26] 的检测方法，通过加入 0.5% 的氨基磺酸溶液消除 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 对 N_2H_4 测定的干扰^[27]。在每个阶段结束 (反应器运行第 11、46 和 60 天) 留取生物样品测定生物量 (suspended solids, SS)、有机物量 (volatile suspended solids, VSS)、胞外聚合物 (extracellular polymeric substances, EPS)、血红素和微生物群落结构。

采用水解法提取生物膜样品中的 EPS (主要由蛋白质和多糖组成^[28])，蛋白质 (proteins, PN) 用改良 Folin-Lowry 法测定，使用牛血清蛋白作为标准物质。多糖 (polysaccharides, PS) 用蒽酮-硫酸法测定，使用葡萄糖作为标准物质。EPS 浓度以单位质量挥发性有机物中 EPS 的质量 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) 表示。

用磷酸盐缓冲液 (PBS) 通过细胞破碎的方式提取血红素^[29]，以氯化血红素作为标准物质，通过 Pyridine-NaOH 方法^[30] 测定血红素的含量。血红素浓度以单位质量挥发性有机物中血红素的物质的量 ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) 表示。

1.5 计算方法

为直观表示出整个反应体系中的主导反应，依照亚硝化反应 (式 (1))、硝化反应 (式 (2)) 以及厌氧氨氧化反应 (式 (3)) 的化学计量方程计算得到含有 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 变化量的公式。在进水无有机物的厌氧氨氧化反应器中，异养生物对 NRR 的贡献通常 $< 5\%$ ^[31]，可忽略其对整体反应的影响，故在计算时不考虑反硝化过程，计算得到式 (4)~式 (7)。



$$Q_1 = \frac{1.06C_1 - C_2 + C_3}{2.060} \quad (4)$$

$$Q_2 = \frac{2.32C_3 - 0.26C_1 - 0.26C_2}{2.060} \quad (5)$$

$$Q_3 = \frac{C_1 + C_2 - C_3}{2.060} \quad (6)$$

$$Q_4 = \frac{1.32(C_1 + C_2 - C_3)}{2.060} \quad (7)$$

式中： θ 为周期时间，d； C_1 、 C_2 为 1 个周期内 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的去除量， $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ； C_3 为 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的生成量， $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。 Q_1 为 AOB 对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的氧化速率 (AOR)， $\text{g}\cdot(\text{m}^3\cdot\text{d})^{-1}$ ； Q_2 为 NOB 对 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的消耗速率 (NOR)， $\text{g}\cdot(\text{m}^3\cdot\text{d})^{-1}$ 。 Q_3 为 AnAOB 对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的消耗速率 (AnAOR)， $\text{g}\cdot(\text{m}^3\cdot\text{d})^{-1}$ ； Q_4 为 AnAOB 对 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的消耗速率 (AnANR)， $\text{g}\cdot(\text{m}^3\cdot\text{d})^{-1}$ 。

1.6 微生物群落结构分析

在各阶段的稳定运行期内，保留生物膜样品于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下冻存。实验结束后统一进行基因组 DNA 的提取，之后采用 341F (5'-CCTACGGGNGGCWG-CAG-3') 和 785R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') 作为扩增引物，对细菌 16S rRNA 基因进行 2 轮 PCR 扩增。后续使用 Illumina

表 1 实验设计表

Table 1 The experimental design table

反应器	阶段 I (1~11 d)	阶段 II (12~46 d)	阶段 III (47~60 d)
R1		未添加 N_2H_4	
R2	未添加 N_2H_4	添加 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ N}_2\text{H}_4$	未添加 N_2H_4
R3		添加 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ N}_2\text{H}_4$	

Novaseq 6000 测序平台进行高通量并行测序, 将相似水平在 97% 的序列归为 1 个 OTU 进行生物信息统计分析。

2 结果与讨论

2.1 N_2H_4 对总氮去除率的影响

反应器各阶段运行性能如图 2 所示。在进水 NH_4^+-N 和 $NO_2^- -N$ 质量浓度分别为 $(50.9 \pm 3.6) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(55.5 \pm 3.2) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 条件下持续运行 11 d 后, 3 个反应器运行趋于平稳。阶段 I 结束时 NRR 分别为 27.7、24.7、23.2 $\text{g} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$, 这一差异可能是由于实验前期选取的生物膜填料挂膜不均匀导致。

对照组 R1 内逐渐形成稳定的厌氧氨氧化环境, 阶段 III 时 NRR 最高达到 $139.2 \text{ g} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$ 。R2 和 R3 在加入 N_2H_4 后均表现出 NRR 先快速上升后下降的趋势。阶段 II 运行前期 (第 12~15 天), R2 和 R3 中的 NRR 分别提升了 74% 和 44%, 此时 N_2H_4 的利用率均在 74% 以上。随着运行周期的增加 (第 16~46 天), R2 和 R3 的脱氮效能逐渐下降, 其中 R2 内 NRR 下降了 53%, R3 内 NRR 下降了 64%, 在阶段 II 结束时 (第 46 天) R2 和 R3 中 N_2H_4 的利用率分别从最高值 (97% 和 79%) 下降到 32%。当 R2 和 R3 系统内的脱氮效能低于 $15 \text{ g} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$ 时停止加 N_2H_4 , 开始阶段 III 的运行。 N_2H_4 的抑制解除后, R2 内厌氧氨氧化活性开始逐渐恢复, 到阶段 III 末期, NRR 由阶段 II 末期的 $11.0 \text{ g} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$ 升至到 $33.4 \text{ g} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$, R3 的 NRR 也由 $10.4 \text{ g} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$ 升至 $22.8 \text{ g} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$, 表明停止投加 N_2H_4 后, 其抑制作用可缓慢恢复。经 14 d 恢复后, R2 反应器的脱氮效能恢复到投加 N_2H_4 前的水平, 然而, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 N_2H_4 对生物膜的抑制作用更强, 生物膜恢复更加缓慢。SCHALK 等^[32] (N_2H_4 投加量为 $28.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的研究结果也证实了这一点。但 GANESAN 等^[10] (N_2H_4 投加量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、ZHOU 等^[33] (N_2H_4 投加量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、MIDONSKI 等^[18] (N_2H_4 投加量为 $3.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 XIANG 等^[14] (N_2H_4 投加量为 $2 \sim 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的研究结果均表明, 投加不同质量浓度的 N_2H_4 均能维持脱氮系统长期运行且 N_2H_4 可被快速消耗, 这与本研究的结果并不一致。

本研究中出现 N_2H_4 浓度不断积累且 NRR 不断下降的现象, 推测可能有以下 2 点原因。一方面, 生物膜与颗粒污泥的形态结构存在差异。对比本研究使用的生物膜, 颗粒污泥结构更加密实, 传质效率低, 内部更容易形成较强的浓度梯度, 即实际进入颗粒污泥内部的 N_2H_4 浓度会低于水中测得的浓度。溶质的浓度梯度是随着生物膜厚度的增加而形成的, 生物膜厚度会影响液体的流动扩散和营养物质的传质效果, 从而影响工艺整体性能^[34]。本研究中生物膜厚度较薄 (约 $550 \mu\text{m}$), 可推测扩散到生物膜内部的 N_2H_4 质量浓度较高, 从而对 AnAOB 产生较强的毒性效应。另一方面, 基质的质量浓度和 N_2H_4 质量浓度的比例不同。在前人研究 N_2H_4 对低基质 ($TN < 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 厌氧氨氧化系统的长期影响中, 维持系统良好脱氮效果的基质质量浓度与 N_2H_4 质量浓度的比例在 10 左右。本实验中 R2 和 R3 中此比例分别为 21 和 10.5, 但显然 R3 受到更强的抑制作用, 很可能是 N_2H_4 扩散到生物膜的速度过快, 因此, 需要降低 N_2H_4 的质量浓度以达到更好的 TN 去除效果。根据 STROUS^[35] 提出的厌氧氨氧化分解代谢模型, 可推知未反应完全的 N_2H_4 会促使反应逆向进行从而产生 $NH_4^+ -N$ 。SCHALK 等^[32] 在加入 N_2H_4 的厌氧氨氧化批次实验中观察到, 1 mol 的 N_2H_4 可被

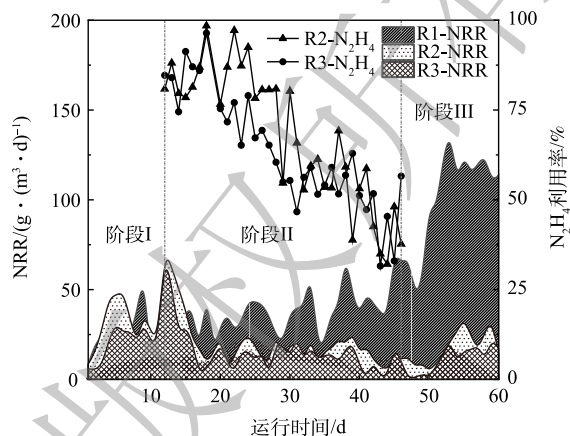


图 2 运行期间 NRR 以及 N_2H_4 利用率的变化

Fig. 2 Variations of NRR and N_2H_4 utilization during

转化为 1.3 mol 的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ，在 ZEKKER 等^[13]的实验中，1 mol 的 N_2H_4 可形成 1.63 mol $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 。可见，AnAOB 对 N_2H_4 有歧化作用，高质量浓度的 N_2H_4 会导致 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 不断积累而升高，从而 NRR 也不断下降。

2.2 N_2H_4 对生物量的影响

整个运行期间 3 个反应器内生物量变化如图 3 所示。对照组 R1 中的生物量随运行时间的增加逐渐升高，在整个实验周期结束时 VSS 达到 $1\ 824\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。且 R1 在 3 个反应器中表现出最好的脱氮性能，也证实了 R1 内生物膜活性较高的结论。在阶段 II 中，R2 和 R3 中均出现了污泥流失情况。停止加入 N_2H_4 后，2 个反应器内污泥量仍持续下降。R2 在阶段 II 和阶段 III 结束时的 VSS 分别为 $1\ 019\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $880\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，R3 在阶段 II 和阶段 III 内 VSS 分别为 $1\ 213\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $587\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。对比初始值，阶段 III 结束时 R2 的 VSS 浓度下降了 52%，R3 内的 VSS 浓度下降了 55%，可以看出，加入 N_2H_4 后反应器内部生物膜会逐渐脱落和流失，生物膜活性减弱，导致系统内部的脱氮效能下降。

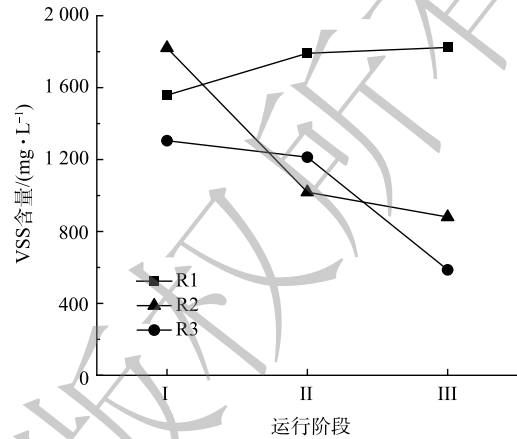


图 3 不同运行阶段 VSS 的变化

Fig. 3 Variation of VSS at different stages

2.3 N_2H_4 对各反应过程的影响

由于进水中含有一定溶解氧，促进了脱氮系统中硝化菌的生长。为评估系统中亚硝化，硝化和厌氧氨氧化效果，对反应器中各阶段的氮素变化量进行分析，从而得到各个反应体系中氨氧化菌 (ammonia-oxidizing bacteria, AOB)、亚硝酸盐氧化菌 (nitrite-oxidizing bacteria, NOB) 和 AnAOB 的变化趋势，结果如图 4 所示。从图 4(a) 可以看出，在阶段 I 和阶段 II，R1 中的 AOB 和 NOB 均维持在稳定状态，AnAOB 活性逐渐升高，阶段 II 结束时提高了约 80%。但在阶段 III 开始时 AOB 作用减弱，NOB 和 AnAOB 作用增强，NRR 最高可达 $139.2\ \text{g}\cdot(\text{m}^3\cdot\text{d})^{-1}$ 。R2 以及 R3 内基质消耗速率分别见图 4(b) 和图 4(c)。加入 N_2H_4 后 2 个反应器内 AOR、AnAOR 和 AnANR 短暂提升，与 NRR 变化规律相一致，说明 N_2H_4 的投加会在短期内迅速提高厌氧氨氧化生物膜系统的脱氮效能。有研究表明，外源 N_2H_4 可以直接被 AnAOB 利用，促进厌氧氨氧化进程^[36]。对本研究中的厌氧氨氧化生物膜来说， N_2H_4 添加量为 $5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的脱氮效果优于 $10\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。对比对照组 R1，R2 和 R3 系统内的

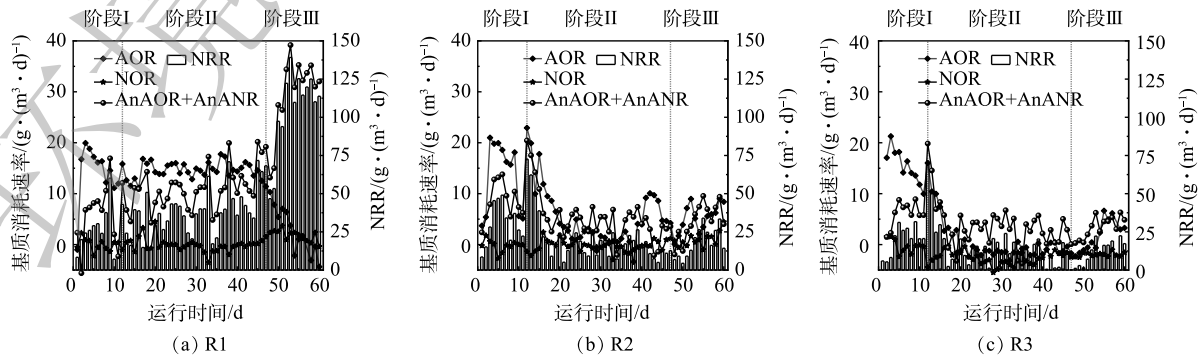


图 4 运行期间亚硝化、硝化和厌氧氨氧化作用的变化

Fig. 4 Variations of nitrosation, nitrification and Anammox during operation

AnAOB 和 AOB 的活性均只在加入 N_2H_4 的前 4 d 得到提升, 但很快就下降到较低水平, 与 NRR 的变化规律一致。这可能是由于 N_2H_4 的长期抑制作用导致反应器内生物量随着生物膜不断脱落而流失 (SS 分别为 $6\ 194\ mg\cdot L^{-1}$ 和 $4\ 322\ mg\cdot L^{-1}$), 因此, 反应器内功能菌的数量进一步降低。阶段 II 运行后期 (第 31~46 天) R2 和 R3 出水 N_2H_4 质量浓度分别稳定在 $1\sim 3\ mg\cdot L^{-1}$ 和 $3\sim 5\ mg\cdot L^{-1}$, 推测在此阶段 N_2H_4 的投加量超过 AnAOB 的利用量, AnAOB 不能有效降解 N_2H_4 , 继续添加会导致 N_2H_4 逐渐积累从而抑制 AnAOB 的活性。由于 N_2H_4 对 AOB 和 NOB 均有毒性作用^[16], 因此, 整个体系中 AOB 和 NOB 作用均较弱, 而 NOB 比 AOB 更敏感, 会导致 NOB 的占比更低。在阶段 III 中, 停止加入 N_2H_4 后, R2 和 R3 中 AOB 和 AnAOB 的占比逐渐上升, 体系中的脱氮效果也在缓慢提升, 可见 N_2H_4 的抑制效果是可逆的, 但 N_2H_4 为 $5\ mg\cdot L^{-1}$ 的 R2 能逐渐恢复到抑制前的脱氮水平, 而投加 $10\ mg\cdot L^{-1}$ N_2H_4 的 R3 较难恢复。

2.4 N_2H_4 对 EPS 的影响

EPS 对生物膜的形成和稳定有重要作用^[37], 因此, 有必要探讨 N_2H_4 对生物膜 EPS 的影响。3 个反应器中 EPS 变化量及蛋白质和多糖的比值 (PN/PS) 变化情况如图 5 所示。对照组 R1 的 EPS 处于稳定增长状态, 各阶段 EPS 含量分别为 6.76 、 10.03 和 $11.22\ mg\cdot g^{-1}$, PN/PS 稳定在 $2.19\sim 2.59$, 与反应器中 NRR 的变化趋势一致。阶段 II 结束时 (第 46 天), R2 中 EPS 由阶段 I 的 $6.60\ mg\cdot g^{-1}$ 增加到 $17.68\ mg\cdot g^{-1}$, 同时 PN 和 PS 的含量也发生变化, PN/PS 由 3.49 增加到 8.23 。由于外部环境的改变会刺激细菌分泌较多的 EPS, 这种自我保护行为会适当减轻不良环境造成的影响^[38], N_2H_4 的毒性作用导致 R2 内的细菌分泌大量 EPS。EPS 中的 PN/PS 通常用于定义生物膜的状态^[34], 活性污泥的 PN/PS 维持在 $1\sim 4$ 是一个适宜的水平^[39]。由于 PN 会比 PS 优先响应外部环境变化^[40], 且较高质量浓度 N_2H_4 可通过分泌大量结合蛋白 (bound protein, B-PN) 触发厌氧氨氧化污泥的自我保护机制^[36], 导致 R2 中的 PN 增长了 2 倍, 生物膜变得蓬松不稳定, 促进了生物膜的脱落和流失, 引起反应器运行效能的下降。这与阶段 II 观察到的反应器出水浊度增大以及 NRR 的下降一致。与 R2 相反, R3 内的 EPS 由 $9.23\ mg\cdot g^{-1}$ 下降到 $4.38\ mg\cdot g^{-1}$, PN/PS 的值由 2.33 增加到 6.88 。这可能是由于 R3 中 N_2H_4 质量浓度过高, 对生物膜产生更强的毒性致使微生物死亡, 导致 EPS 含量下降。停止加入 N_2H_4 后, R2 的 EPS 含量下降了 42%, PN/PS 为 2.20 , 与对照组 R1 近乎相平。R3 的 EPS 含量逐渐升高至 $8.84\ mg\cdot g^{-1}$, PN/PS 为 2.25 。PN/PS 的值越低则系统稳定性越高^[41], 2 个反应器内 PN/PS 均降到适宜范围 ($1\sim 4$) 内, 可证明污泥结构已经趋于稳定, 受 N_2H_4 刺激后生物膜缓慢恢复。

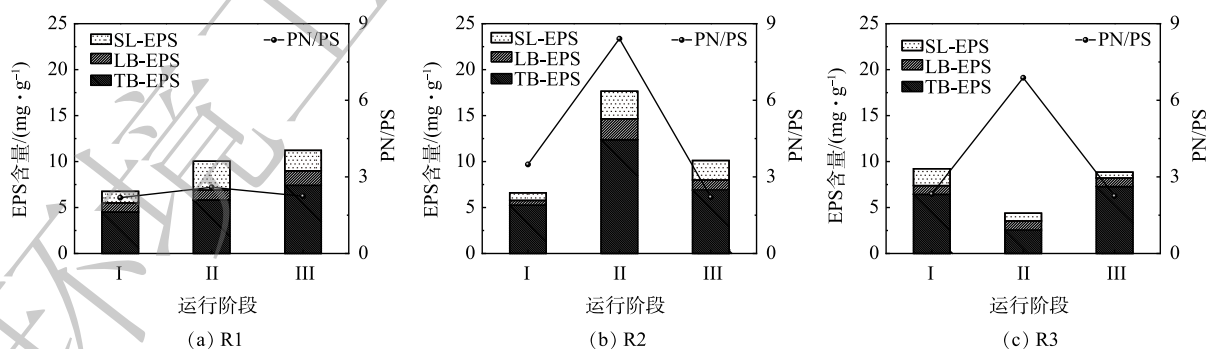


图 5 不同运行阶段 EPS 的变化

Fig. 5 Variation of EPS at different stages

2.5 N_2H_4 对血红素的影响

血红素参与 AnAOB 的主要代谢反应, 具有催化和电子转移潜力, 可以作为评估厌氧氨氧化性能指标^[29]。不同质量浓度 N_2H_4 对 AnAOB 中血红素的影响如图 6 所示。对照组 R1 各阶段的血红

素含量分别为 0.73、0.81、0.72 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ，整体维持在平稳状态。R2 和 R3 中血红素含量均呈现下降的趋势。R2 从 0.45 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ 降至 0.39 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ，R3 则从 0.78 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ 降至 0.11 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ 。在厌氧氨氧化的代谢过程中， N_2H_4 作为厌氧氨氧化过程的中间产物，会被脱氢酶 (hydrazine dehydrogenase, HDH) 氧化成 N_2 ，从而完成脱氮过程^[10]。细胞色素 c 的含量与 HDH 活性存在正相关，HDH 酶的活性越高，处于还原状态的细胞色素 c 的就越多，而血红素是细胞色素 c 的关键组分^[42]。在本研究中，加入 N_2H_4 后的生物膜中的血红素含量一直下降，即 HDH 的活性一直下降，阻碍了厌氧氨氧化过程中催化 N_2H_4 氧化生成 N_2 这一反应的正向进行，从而导致 N_2H_4 积累。由于 N_2H_4 具有强毒性，HDH 受到高质量浓度 N_2H_4 的抑制，血红素的还原能力下降，AnAOB 的活性受抑制，最终导致系统中 NRR 下降。此外，通过对比 R2 和 R3 在整个反应阶段血红素的变化量，可看出 N_2H_4 的加入量越高，抑制作用越明显，厌氧氨氧化活性越难以恢复。

2.6 N_2H_4 对微生物群落的影响

反应器在不同运行周期门水平和属水平的微生物群落结构如图 7 所示。可以看出，细菌的相对丰度随运行条件的改变有明显差异，表明 N_2H_4 对微生物群落的影响逐渐显现。由图 7(a) 中可观察到所有样本中的主要优势菌门有变形菌门 (*Proteobacteria*)、浮霉菌门 (*Planctomycetes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*) 和装甲菌门 (*Armatimonadetes*)，这些都是脱氮系统中常见的典型细菌^[43]。有研究^[44]表明 AnAOB 隶属于浮霉菌门，对照组 R1 在整个运行周期内 *Planctomycetes* 一直维持在较高水平 (12.86%~23.36%)，实现了 MBBR 脱氮系统的长期稳定运行。加入 N_2H_4 后，R2 中 *Planctomycetes* 呈现先上升至 26.33%，而后下降至 2.50% 的现象，丰度的上升与 NRR 的短暂增加的结果相一致。R3 内几乎不存在 *Planctomycetes*，其相对丰度从 4.44% 下降到 2.86%，同时可观察到放线菌门 (*Actinobacteria*) 和酸杆菌门 (*Acidobacteria*) 占明显优势，其相对丰度分别由 0.55% 和 0.31% 增长至 7.17% 和 10.46%，说明 N_2H_4 会促进其它菌门的生长，*Planctomycetes* 与

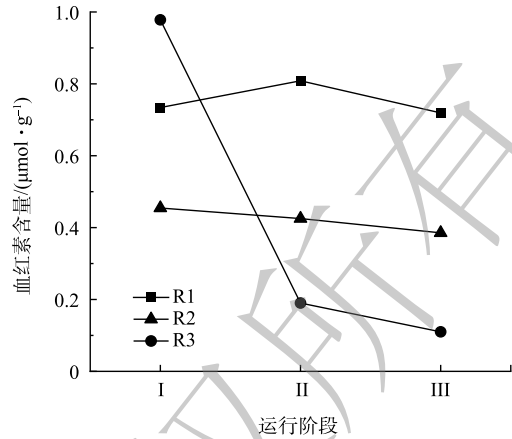


图 6 不同运行阶段血红素含量变化

Fig. 6 Variation of heme content at different stages

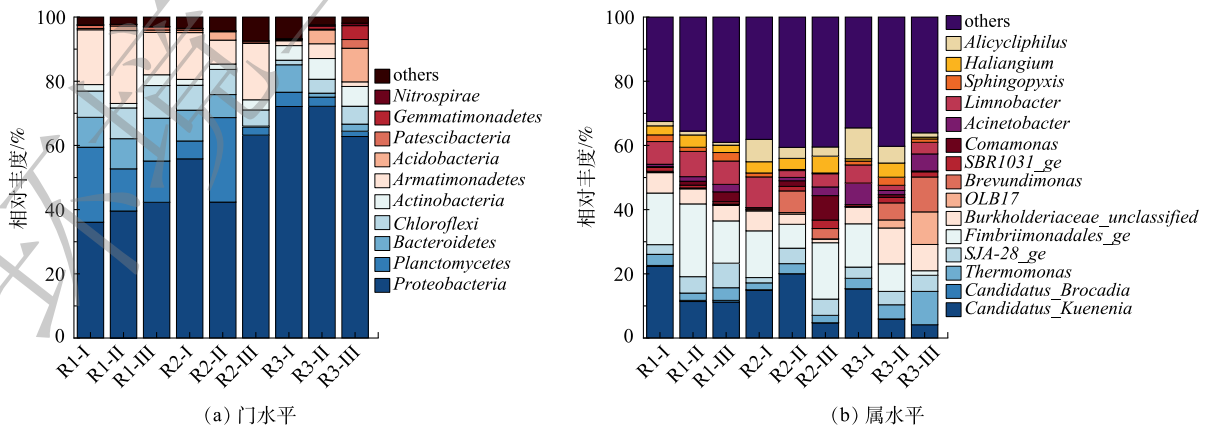


图 7 不同运行阶段的微生物群落结构变化

Fig. 7 Microbial community structure at different stages

Actinobacteria 等菌门之间对底物的竞争增大, 降低了 AnAOB 的占比, 破坏脱氮系统的稳定性。

图 7(b) 反映了各反应器在不同运行阶段, 相对丰度占比在前 15 的主要菌属。样品中均检测出 2 种属水平 AnAOB, *Candidatus_Kuenenia* 和 *Candidatus_Brocadia*, 其中以 *Candidatus_Kuenenia* 为主。对照组 R1 在整个运行周期内 *Candidatus_Kuenenia* 一直维持在较高水平 (11.18%~22.37%), 即使在阶段 II 略有下降但仍占主导地位。对比阶段 III 和阶段 I, R2 和 R3 中 *Candidatus_Kuenenia* 所占比例分别下降了 64% 和 61%, 表明长期添加微量 N_2H_4 会使 AnAOB 相对丰度降低, 这与反应器运行过程中系统脱氮效率降低的现象一致。*Fimbriimonadales* 在对照组 R1 中的相对丰度较高, 为 13.18%~22.68%。有研究^[45]表明, *Fimbriimonadales* 是一种异养菌, 也可以利用 NH_4^+-N 和 NO_2^--N 生成 N_2 。本研究中 *Fimbriimonadales* 可能与 AnAOB 共存于反应器中协同脱氮。对照组 R1 中 *Burkholderiaceae* 一直维持在 4.89%~6.37%, R3 中 *Burkholderiaceae* 的相对丰度从阶段 I 的 5.16% 上升到阶段 II 的 11.17%。*Burkholderiaceae* 属于反硝化细菌, 具有还原 NO_3^--N 或 NO_2^--N 的能力^[31]。可见, N_2H_4 的长期加入促进了 *Burkholderiaceae* 的生长, 加大了对底物 NO_2^--N 的竞争, 抑制了 AnAOB 生长。有研究^[46]表明, *Limnobacter* 可与 AnAOB 共生, 这可以保护 AnAOB 免受不利环境的影响。对照组中 *Limnobacter* 的丰度稳定在 7% 左右, 但该菌属在 R2 中的丰度由 9.55% 降至 2.12%, R3 中由 5.64% 降至 1.62%。 N_2H_4 会破坏这种保护平衡, 令 AnAOB 暴露在不利环境中, 从而降低其活性。综上所述, N_2H_4 不仅直接降低 *Candidatus_Kuenenia* 的丰度, 还对与 AnAOB 菌属协同脱氮的其它菌属起到抑制作用, 从而降低反应器整体功能菌属的活性, 进而影响脱氮效果。

3 结论

1) 在进水 NH_4^+-N 质量浓度在 $(50.9 \pm 3.6) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NO_2^--N 质量浓度在 $(55.5 \pm 3.2) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下, 加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 N_2H_4 可以使 NRR 短暂增长, 但长期运行后 NRR 分别下降了 53% 和 64%。 N_2H_4 的长期加入会对生物膜产生生物毒性, 抑制脱氮过程。

2) $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 N_2H_4 使生物膜的 EPS 分泌量提高, 触发生物膜保护机制, 解除 N_2H_4 抑制后, EPS 浓度恢复, 但生物膜变得松散, 易脱落, 导致污泥流失。 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 N_2H_4 抑制了生物膜中 AnAOB 的活性, EPS 和血红素含量均明显下降, 解除 N_2H_4 抑制后, 生物膜脱氮活性也难以恢复。

3) 长期添加微量 N_2H_4 会降低厌氧氨氧化生物膜脱氮系统中 *Planctomycetes* 和 *Candidatus_Kuenenia* 的丰度。

参考文献

- [1] JIA Z, YUAN Q, ROOTS P, et al. Partial Nitrification/Anammox and biological phosphorus removal integration in a single bioreactor under mainstream conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 373: 128714.
- [2] YUAN Q, JIA Z, ROOTS P, et al. A strategy for fast anammox biofilm formation under mainstream conditions[J]. *Chemosphere*, 2023, 318: 137955.
- [3] 卢帅宇, 由昆, 周伟伟, 等. MBBR 厌氧氨氧化工艺污水脱氮的研究进展[J]. *能源环境保护*, 2022, 36(6): 22-31.
- [4] XU Y, XU Y, LI T, et al. Two-step partial nitrification-anammox process for treating thermal-hydrolysis anaerobic digester effluent: Start-up and microbial characterisation[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 252: 119784.
- [5] TRINH H P, LEE S H, JEONG G, et al. Recent developments of the mainstream anammox processes: Challenges and opportunities[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2021, 9(4): 105583.
- [6] MA J, WEI J, KONG Q, et al. Synergy between autotrophic denitrification and Anammox driven by FeS in a fluidized bed bioreactor for advanced nitrogen removal[J]. *Chemosphere*, 2021, 280: 130726.
- [7] ZHANG S, ZHANG L, YAO H, et al. Responses of anammox process to elevated Fe(III) stress: Reactor performance, microbial community and functional genes[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 414: 125051.
- [8] WANG Z, LIU X, NI S Q, et al. Nano zero-valent iron improves anammox activity by promoting the activity of quorum sensing system[J]. *Water Research*, 2021, 202: 117491.
- [9] LIU W, SHEN C, LIU C, et al. Achieving stable mainstream nitrogen

- and phosphorus removal assisted by hydroxylamine addition in a continuous partial nitrification/anammox process from real sewage[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 794: 148478.
- [10] GANESAN S, VADIVELU V M. Effect of external hydrazine addition on anammox reactor start-up time[J]. *Chemosphere*, 2019, 223: 668-674.
- [11] YIN X, QIAO S, ZHOU J, et al. Fast start-up of the anammox process with addition of reduced graphene oxides[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2016, 283: 160-166.
- [12] ADAMS M, XIE J, CHANG Y, et al. Start-up of Anammox systems with different biochar amendment: Process characteristics and microbial community[J]. *Science of The Total Environment*, 2021, 790: 148242.
- [13] ZEKKER I, KROON K, RIKMANN E, et al. Accelerating effect of hydroxylamine and hydrazine on nitrogen removal rate in moving bed biofilm reactor[J]. *Biodegradation*, 2012, 23(5): 739-749.
- [14] XIANG T, GAO D. Comparing two hydrazine addition strategies to stabilize mainstream deammonification: Performance and microbial community analysis[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 289: 121710.
- [15] WEN R, WEI Y, ZHANG W. Recovery of nitrogen removal by N_2H_4 after nitrite inhibited anammox reaction[J]. *Global NEST Journal*, 2021, 23: 249-256.
- [16] YAO Z B, CAI Q, ZHANG D J, et al. The enhancement of completely autotrophic nitrogen removal over nitrite (CANON) by N_2H_4 addition[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 146: 591-596.
- [17] YAO Z, ZHANG D, XIAO P, et al. Long-term addition of micro-amounts of hydrazine enhances nitrogen removal and reduces NO and NO_3^- production in a SBR performing Anammox: Long-term addition of micro-amount hydrazine enhanced Anammox[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2016, 91(2): 514-521.
- [18] MIODŃSKI S, MUSZYŃSKI-HUHAJŁO M, ZIĘBA B, et al. Fast start-up of anammox process with hydrazine addition[J]. *SN Applied Sciences*, 2019, 1(6): 523.
- [19] 蔡庆, 黄阳全, 罗乐, 等. 厌氧氨氧化颗粒污泥的培养及影响因素[J]. *工业安全与环保*, 2016, 42(11): 68-71.
- [20] XIANG T, GAO D, WANG X. Performance and microbial community analysis of two sludge type reactors in achieving mainstream deammonification with hydrazine addition[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 715: 136377.
- [21] YUAN Q, ZHANG Y, XUE X, et al. Morphological, kinetic, and microbial community characterization of anammox bacteria with different inoculations and biofilm types for low-ammonium wastewater treatment[J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2022, 47: 102748.
- [22] YUAN Q, HE B, QIAN L, et al. Role of air scouring in anaerobic/anoxic tanks providing nitrogen removal by mainstream anammox conversion in a hybrid biofilm/suspended growth full-scale WWTP in China[J]. *Water Environment Research*, 2021, 93(10): 2198-2209.
- [23] VAN DE GRAAF A, DE BRUIJN P, ROBERTSON L A, et al. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor[J]. *Microbiology*, 1996, 142(8): 2187-2196.
- [24] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [25] CROSBY N T. Determination of ammonia by the Nessler method in waters containing hydrazine[J]. *The Analyst*, 1968, 93(1107): 406-408.
- [26] WATT G W, CHRISP J D. Spectrophotometric method for determination of hydrazine[J]. *Analytical Chemistry*, 1952, 24(12): 2006-2008.
- [27] GEORGE M, NAGARAJA K S, BALASUBRAMANIAN N. Spectrophotometric determination of hydrazine[J]. *Talanta*, 2008, 75(1): 27-31.
- [28] YU G H, HE P J, SHAO L M. Characteristics of extracellular polymeric substances (EPS) fractions from excess sludges and their effects on bioflocculability[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(13): 3193-3198.
- [29] MA H, ZHANG Y, XUE Y, et al. Relationship of heme c, nitrogen loading capacity and temperature in anammox reactor[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 659: 568-577.
- [30] BERRY E A, TRUMPOWER B L. Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra[J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 161(1): 1-15.
- [31] XIAO R, ZHU W, ZHENG Y, et al. Active assimilators of soluble microbial products produced by wastewater anammox bacteria and their roles revealed by DNA-SIP coupled to metagenomics[J]. *Environment International*, 2022, 164: 107265.
- [32] SCHALK J, OUSTAD H, KUENEN J G, et al. The anaerobic oxidation of hydrazine: A novel reaction in microbial nitrogen metabolism[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 158(1): 61-67.
- [33] ZHOU S, CHEN Z, WANG J, et al. Recovery of anaerobic ammonium oxidation *via* hydrazine following sulfate inhibition[J]. *Environmental Science:Water Research & Technology*, 2022, 8(7): 1458-1465.
- [34] DI BIASE A, KOWALSKI M S, DEVLIN T R, et al. Moving bed biofilm reactor technology in municipal wastewater treatment: A review[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 247: 849-866.
- [35] STROUS M, HEIJNEN J J, KUENEN J G, et al. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 50(5): 589-596.
- [36] XIANG T, LIANG H, GAO D. Effect of exogenous hydrazine on metabolic process of anammox bacteria[J]. *Journal of Environmental Management*, 2022, 317: 115398.
- [37] TANG B, YU C, BIN L, et al. Essential factors of an integrated moving bed biofilm reactor—membrane bioreactor: Adhesion characteristics and microbial community of the biofilm[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 211: 574-583.

- [38] SHENG G P, YU H Q, LI X Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 882-894.
- [39] ZHANG M, GAO J, FAN Y, et al. Combined effects of volume ratio and nitrate recycling ratio on nutrient removal, sludge characteristic and microbial evolution for DPR optimization[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2021, 104: 69-83.
- [40] 杨明明, 党超军, 张爱余, 等. 厌氧氨氧化颗粒污泥胞外聚合物金属元素特性[J]. *中国环境科学*, 2020, 40(11): 4728-4734.
- [41] CHEN J, HAI Y, ZHANG W, et al. Insights into deterioration and reactivation of a mainstream anammox biofilm reactor response to C/N ratio[J]. *Journal of Environmental Management*, 2022, 320: 115780.
- [42] KANG D, LI Y, XU D, et al. Deciphering correlation between chromaticity and activity of anammox sludge[J]. *Water Research*, 2020, 185: 116184.
- [43] LIU W, YANG D, CHEN W, et al. High-throughput sequencing-based microbial characterization of size fractionated biomass in an anoxic anammox reactor for low-strength wastewater at low temperatures[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 231: 45-52.
- [44] 杨瑞丽, 王晓君, 吴俊斌, 等. 厌氧氨氧化工艺快速启动策略及其微生物特性[J]. *环境工程学报*, 2018, 12(12): 3341-3350.
- [45] HUANG D Q, WANG Y, WU Q, et al. Anammox sludge preservation: Preservative agents, temperature and substrate[J]. *Journal of Environmental Management*, 2022, 311: 114860.
- [46] WANG C, LIU S, XU X, et al. Achieving mainstream nitrogen removal through simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification process in an integrated fixed film activated sludge reactor[J]. *Chemosphere*, 2018, 203: 457-466.
- (责任编辑: 曲娜)

Effects of trace hydrazine on long-term operation of anammox biofilm

LOU Yuqing¹, YUAN Quan¹, WANG Chun¹, WANG Tiejian², SUN Yingxue^{1,*}, LYU Weibo², CHEN Yun³, QIAN Liang³, HE Beiping³

1. School of Ecology and Environment, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2. Tangshan Caofeidian City Drainage Co. Ltd., Tangshan 063200, China; 3. Thunip Corp., Ltd., Beijing 100084, China

*Corresponding author, E-mail: sunyx@th.btbu.edu.cn

Abstract The long-term effect of trace N_2H_4 on the anammox biofilm was investigated in moving bed biofilm reactors (MBBR) treating wastewater with low ammonia nitrogen concentration of $(50.9 \pm 3.6) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. After adding $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (control group, R1), $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (R2) and $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (R3) of N_2H_4 for 35 days, the effect of N_2H_4 on the total nitrogen removal rate (TNRR), biomass, extracellular polymeric substances (EPS), and heme in the MBBR systems were evaluated. The results showed that compared with R1, the NRR decreased by 53% and 64% at the end of the operation period in R2 and R3, respectively. $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} N_2H_4$ could trigger the protective mechanism of the biofilm and increased EPS secretion from it. $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} N_2H_4$ resulted in the obvious decrease of EPS and heme content, and N_2H_4 inhibited the activity of anammox in biofilms. Meanwhile, long-term addition of trace N_2H_4 reduced the abundance of *Planctomycetes* at phylum level and reduced that of *Candidatus Kuenenia* at genus level. It can be seen that the addition of N_2H_4 initially increased the NRR, but the long-term addition produced biological toxicity and inhibit the activity of AnAOB. Overall, the addition of $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} N_2H_4$ could not lead to a stably and efficiently long-term operation of MBBR, but result in a more significant negative effect on the anammox biofilm.

Keywords exogenous N_2H_4 ; Anammox; MBBR; EPS; heme