

Abschlußbericht

Max-Buchner-Forschungsstipendium, Kennziffer 2851

Titel: Halophile Nitrifikation von Abwässern aus der Speisegelatineherstellung

Antragsteller: PD Dr. Claudia Gallert

Stipendiat: Sudarno U.

Institut für Ingenieurbiologie und Biotechnologie des Abwassers (IBA)

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Am Fasanengarten Geb. 50.31, 76131 Karlsruhe

Projektlaufzeit: 01.07.2009-30.06.2011

1. Kurzfassung

Um salzhaltige Abwässer biologisch zu reinigen ist eine speziell an den Salzgehalt adaptierte Biomasse oder aus einem halophilen Milieu angereicherte Biomasse erforderlich. Um einen stabilen Reinigungsprozess zu realisieren, werden bevorzugt Biofilm-basierte Reaktoren wie z.B. Festbett- oder Wirbelbettreaktoren verwendet, die bei Stoßbelastungen oder bei inhibitorischen Bedingungen die Biomasse zurückhalten oder einen gewissen Schutz gewährleisten. Die in organisch belasteten Abwässern anfallende Stickstofffracht muss über die biologischen Prozesse der Nitrifikation (Oxidation von Ammonium zu Nitrit und Nitrat) und der Denitrifikation (Reduktion von Nitrat zu molekularem Stickstoff) eliminiert werden. Eine Kombination beider Prozesse zur N-Elimination ist Stand-der Technik bei der kommunalen Abwasserreinigung. Als Verfahrensalternative könnte eine Prozesskombination aus verkürzter Nitrifikation (Unterdrückung der Nitratation durch Hemmung der Nitrit-oxidierenden Bakterien) und anschließender Denitrifikation (Nitritreduktion) eingesetzt werden was zur Einsparung von Belüftungskosten und von externer Kohlenstoffquelle führt. Ziel der geförderten Arbeit war es, eine stabile Nitrifikation unter halophilen Bedingungen in einem FBR zu etablieren und Betriebsbedingungen zu finden, die eine selektive Unterdrückung der Nitrit-oxidierenden Bakterien gewährleisten um die Nitrifikation beim Nitrit zu stoppen.

2. Einleitung

Salzhaltige Abwässer fallen bei vielen Produktionsprozessen an, z.B. Abwässer aus der lebensmittelverarbeitenden Industrie (Gelatineherstellung, Pökeleien, Konserven, Fischverarbeitung, eingelegte Früchte oder Gemüse), Abwässer aus der Lederverarbeitung, Abwässer aus der Rohölförderung/-verarbeitung, Deponiesickerwässer oder bei Verwendung von Meerwasser zur Toilettenspülung. Saline Abwässer haben einen Salzgehalt bis 3,5 % (ähnlich wie Meerwasser). Als hypersalin werden Abwässer bezeichnet, die mehr als 3,5 % gelöste Feststoffe (=Salze) enthalten (Woolard and Irvine 1994). Die oben genannten Abwässer weisen neben dem hohen Salzgehalt auch eine große organische Fracht und einen hohen Nährstoffgehalt (idR Ammonium) auf. Um den Anforderungen an den Gewässerschutz zu genügen, ist daher eine mehrstufige biologische Reinigung mit Kohlenstoffabbau, Nitrifikation und Denitrifikation erforderlich.

Der hohe osmotische Druck in einem salinen Milieu erfordert die Verwendung von speziell an den Salzgehalt angepassten Mikroorganismen. Entweder es werden halophile Bakterien aus entsprechenden natürlichen oder technischen Ökosystemen

als Inokulum verwendet oder aber die Bakterien werden schrittweise an hohe Salzkonzentrationen adaptiert. Ähnlich wie bei allen biologischen Reinigungsverfahren sollte die Abwasserzusammensetzung konstant sein wobei besonders Schwankungen im Salzgehalt ausgeglichen werden müssen. Bei Verdünnung mit nicht salzhaltigen Abwasser-Teilströmen treten hypoosmotische Bedingungen auf und die Zellen platzen. Im umgekehrten Fall bei Stoßbelastungen lysieren die Zellen auf Grund des hyperosmotischen Schocks (Gallert und Winter 2009).

Um die beim Abbau organischer Verschmutzung entstehende Ammonium-Belastung zu eliminieren muss nitrifiziert und anschließend denitrifiziert werden. Bei der zweitstufigen Nitrifikation oxidieren Ammonium-oxidierende Bakterien (AOB) Ammonium zu Nitrit welches von Nitrit-oxidierenden Bakterien (NOB) weiter zu Nitrat oxidiert wird. AOB und NOB unterscheiden sich hinsichtlich der Wachstumsraten und der Sensitivität gegenüber Schwankungen im pH-Wert, der Temperatur, des Salzgehaltes und des gelösten Sauerstoffgehalts (Windey et al. 2005, Fontenot et al. 2007). Das bei der Nitrifikation entstandene Nitrat wird im biologischen Prozess der Denitrifikation zu molekularem Stickstoff reduziert. Im Vergleich zu den autotrophen Nitrifikanten benötigen denitrifizierende Bakterien eine organische Kohlenstoffquelle. Die bei der Oxidation der C-Quelle entstandenen Elektronen werden zur Reduktion von Nitrat zu N_2 benötigt. Nitrat wird als alternativer Elektronenakzeptor verwendet d.h. Nitrat wird nur bei Abwesenheit von Sauerstoff reduziert. Deswegen müssen die Prozesse der Nitrifikation (aerobe Bedingungen) und der Denitrifikation (anoxische Bedingungen) getrennt voneinander ablaufen.

3. Material und Methoden

Wasser-Sediment-Proben von der Nordseeküste wurden in batch-Ansätzen auf ihre jeweilige Nitrifikationsleistung überprüft. Neben der Umsatzgeschwindigkeit spielte auch die natürliche Pufferkapazität der Proben eine Rolle. Die am besten geeignete Probe wurde angereichert und als Inokulum für verschiedene Festbettreaktoren verwendet. Als Nährmedium wurde artifizielles Meerwasser mit einer Ammoniumkonzentration von idR $100 \text{ mg NH}_4^+\text{-N}$ pro Liter verwendet.

In Abbildung 1 ist der schematische Aufbau der Festbettreaktoren dargestellt. Als Aufwuchsmaterialien wurden poröse Keramikringe, Polyethylen/Blähton Sinterlamellen, Bambusringe und Kunststofffüllkörper verwendet. Die Reaktoren wurden im up-flow Modus betrieben und mittels einer Fritte belüftet ($2,5 \text{ L h}^{-1}$) um einen DO-Gehalt von 5 mg/l zu gewährleisten. Für die Bestimmung der Ammonium- und Nitrit-Oxidationsraten (AOR und NOR) wurden die kontinuierlich betriebenen Reaktoren kurzzeitig im batch-Modus betrieben. Zur Bestimmung des Einflusses von Temperatur, Salzgehalt und Substratkonzentration wurden bewachsenen Trägermaterialien aus den jeweiligen Festbettreaktoren entnommen und in kleine kontinuierliche Reaktoren überführt. Nach einer kurzen Adaptationsphase wurde dann die AOR und NOR bei den jeweiligen Bedingungen ermittelt.

Um die nitrifizierende Population näher zu charakterisieren, wurde zu bestimmten Zeitpunkten Trägermaterial aus dem Reaktor entnommen. Die darauf festsitzende Biomasse wurde abgelöst und sowohl molekularbiologisch als auch mikroskopisch untersucht. Nähere Details zum Reaktoraufbau, zur Betriebsweise und zur Probenaufbereitung für die Populationsanalyse (Bedingungen für die PCR, DGGE) sind in Sudarno et al. (2010) beschrieben.

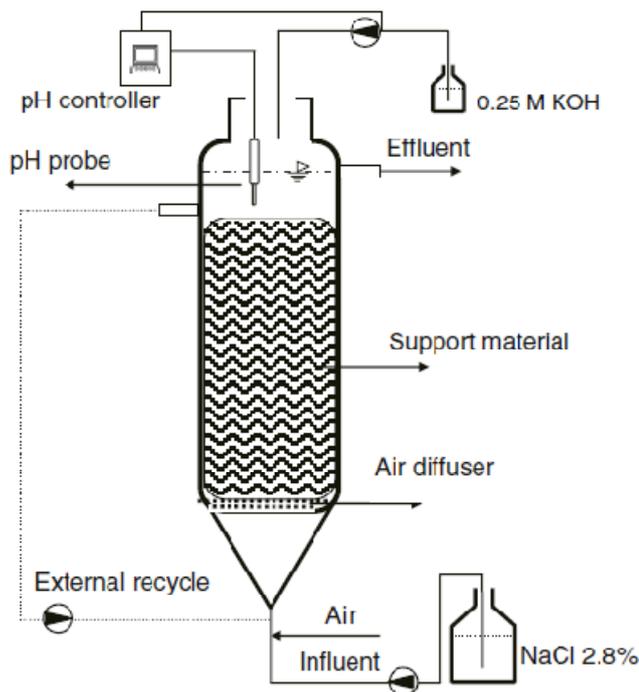


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der verwendeten Festbettreaktoren FBR (Sudarno et al. 2010).

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Kontinuierlicher Reaktorbetrieb und Nitrifikationsleistung

Meerwasser aus dem Büsser Hafen mit einer Nitrifikations-Aktivität von 11.5 mg N pro Tag wurde als Inokulum für die verschiedenen Festbettreaktoren ausgewählt. In Abbildung 2 ist der kontinuierliche Reaktorbetrieb des Festbettreaktors mit porösen Keramikringen über einen Zeitraum von 305 Tagen dargestellt. In Phase a (0-55 Tage) betrug die hydraulische Aufenthaltszeit (HRT) 1,25 d und die Ammonium-Raumbelastung (ALR) lag bei 83 mg NH_4^+ -N pro Liter und Tag. In Phase b (56-155) wurde die HRT auf 1 Tag verkürzt und die ALR auf 103 mg NH_4^+ -N pro Liter und Tag erhöht. In Phase c (156-215) wurde die ALR weiter auf 130 mg NH_4^+ -N pro Liter und Tag erhöht. Da es während dieser Betriebsphase zu pH-Schwankungen trotz der pH-Korrektur kam, wurde das Puffersystem geändert. In Phase d (215-305) wurde zusätzlich eine interne Rezirkulation des Reaktorinhalts installiert.

Während der Phase a wird Ammonium vollständig zu Nitrat oxidiert und es findet keine Nitritakkumulation statt (Abb. 2A). Bei Absinken oder Anstieg des pH-Wertes auf Grund von Problemen mit der pH-Kontrolle wird Ammonium nicht vollständig oxidiert. In Phase b nach Erhöhung der ALR und Verkürzung der HRT erfolgt immer noch eine vollständige Ammonium-Oxidation zu Nitrat ohne Nitrit-Akkumulation (Abb. 2B). Dieser stabile Reaktorbetrieb setzt sich auch nach erneuter Erhöhung der ALR in Phase c fort wobei ab Tag 180 keine vollständige Ammonium-Oxidation zu beobachten ist und sich nachfolgend Nitrit anreichert (Abb 2C). Nach Änderung des pH-Korrekturmittels (keine Änderung der schlechten Ablaufqualität) und Neu-Installation des pH-Korrektursystems mit KOH zeigte sich eine leichte Verbesserung der Nitrifikationsleistung. In Phase d wurde der Reaktorinhalt mittels einer Umwälzpumpe rezirkuliert. Diese Maßnahme führte zu einer vollständigen Ammonium-Oxidation ohne Nitritanreicherung (bis Tag 235, Abb. 2D). Danach verschlechterte sich die Nitrifikationsleistung erneut bedingt durch die hohe Scherbeanspruchung und es kam zur Biofilmbabspülung.

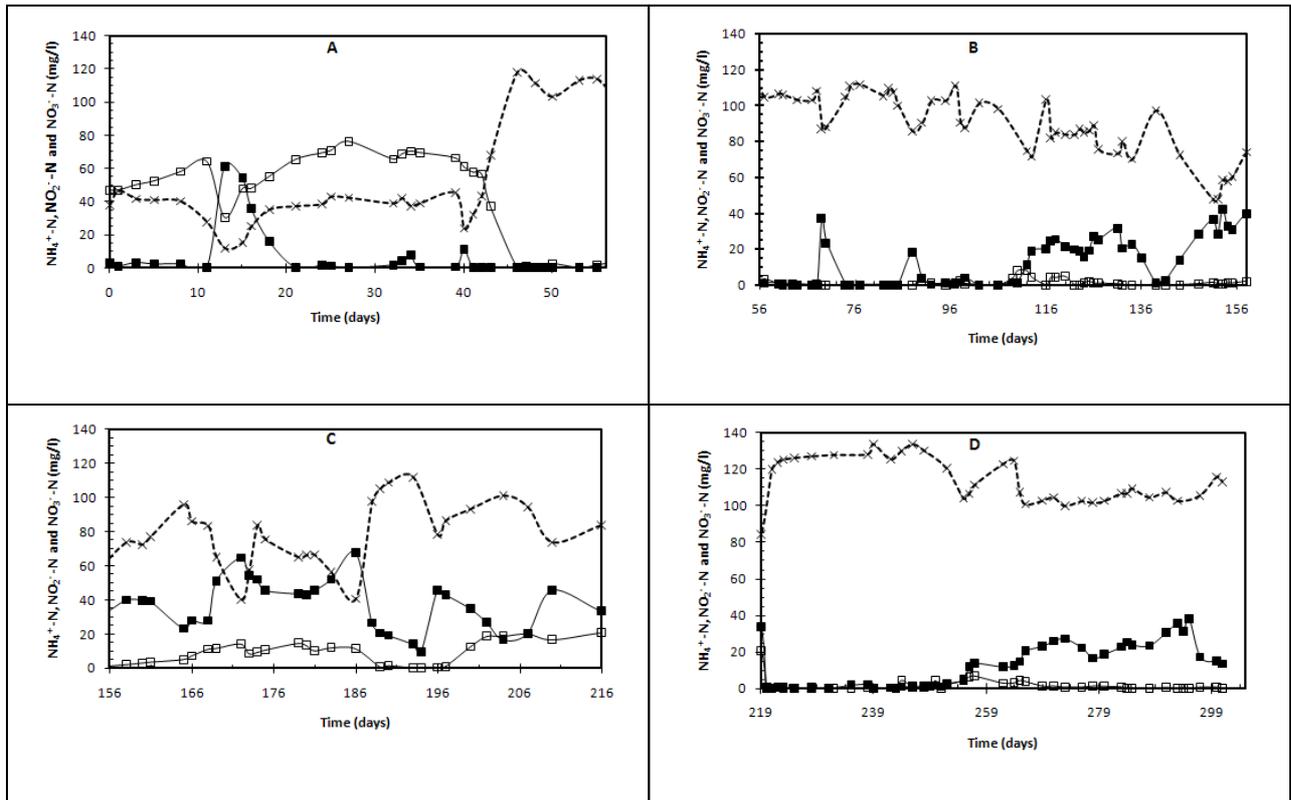


Abbildung 2: Verlauf der Ammonium-, Nitrit- und Nitratkonzentration im FBR mit porösen Keramikringen während unterschiedlicher Betriebsphasen. Abb. 2A: Phase a 0–55 d, Abb. 2B: Phase b 55–155 d, Abb. 2C: Phase c 155–215 d, Abb. 2D: Phase d: 215–305 d.

Verwendete Symbole: Ausgefüllte Quadrate = Ammonium, offene Quadrate = Nitrit, X = Nitrat. Inkubationstemperatur 22,5 °C, Belüftungsrate 2,5 Liter pro Stunde (Sudarno et al. 2010).

Während der unterschiedlichen Betriebsphasen wurde die Ammonium- und Nitrit-Oxidationsrate AOR und NOR bestimmt. In Phase b betrug die AOR 156 und die NOR 226 mg N pro m² Festbettoberfläche und Tag. Am Ende der Phase c erhöhte sich die AOR auf 197 mg N pro m² und Tag, allerdings verringerte sich die NOR auf 181 mg N pro m² und Tag und es kommt zu einer Nitritakkumulation. In Phase d nach dem Abschneiden der Biomasse kommt es zu einer Verringerung der AOR auf 112 mg N pro m² und Tag wobei sich die NOR leicht verbessert und mit 210 mg N pro m² und Tag etwas besser ist als in Phase c. Am Ende der Phase d verringert sich die AOR erneut auf 82 mg N pro m² und Tag, die NOR bleibt stabil bei 214 mg N pro m² und Tag und es kommt zu keiner Nitritanreicherung im Reaktorauslauf (Abb. 2D). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die AOB als äußere Schicht auf den porösen Keramikringen siedeln und bei Abschneidung zuerst ausgewaschen werden.

4.2 Bestimmung der AOR und NOR bei unterschiedlichem Salzgehalt, verschiedenen Temperaturen und steigenden Ammonium- bzw. Nitritkonzentrationen

Um die Einflussgrößen Salzgehalt, Temperatur und Substratkonzentration auf die Nitrifikationsleistung zu testen, wurden bewachsenen poröse Keramikringe aus dem FBR entnommen und in kleinere Reaktoren, die kontinuierlich betrieben wurden gefüllt und an die jeweiligen Bedingungen angepasst. Nach einer Adaptationszeit wurde die AOR und NOR unter den neuen Betriebsbedingungen ermittelt. Ziel dieser Versuche war es, Bedingungen zu finden, die eine selektive Unterdrückung der NOB, also der Nitrifikation hervorrufen.

In Abb. 3 ist der Einfluss der Salzkonzentration auf die AOR und NOR dargestellt. Ausgehend von 3,5 % Salzgehalt wurde zuerst der Salzgehalt schrittweise auf 0,034 % erniedrigt und danach auf 9 % erhöht. Bei allen Variationen im Salzgehalt war die AOR immer niedriger als die NOR. Der Einfluss der Erniedrigung des Salzgehaltes auf die AOB war deutlich geringer als auf die NOB, dennoch lag die NOR immer noch höher als die AOB d.h. die NOB waren trotz verringerter Leistung aktiv bzw. schneller als die AOB. Bei Erhöhung des Salzgehaltes bis auf 9 % zeigten sowohl AOB als auch NOB die gleiche Verringerung der AOR und NOR, aber nach einer Erholung bei dem ursprünglichen Salzgehalt von 3,5 % war bei AOB und NOB die ursprüngliche Aktivität messbar. Durch die Variation im Salzgehalt konnte also keine Unterdrückung der NOB erreicht werden.

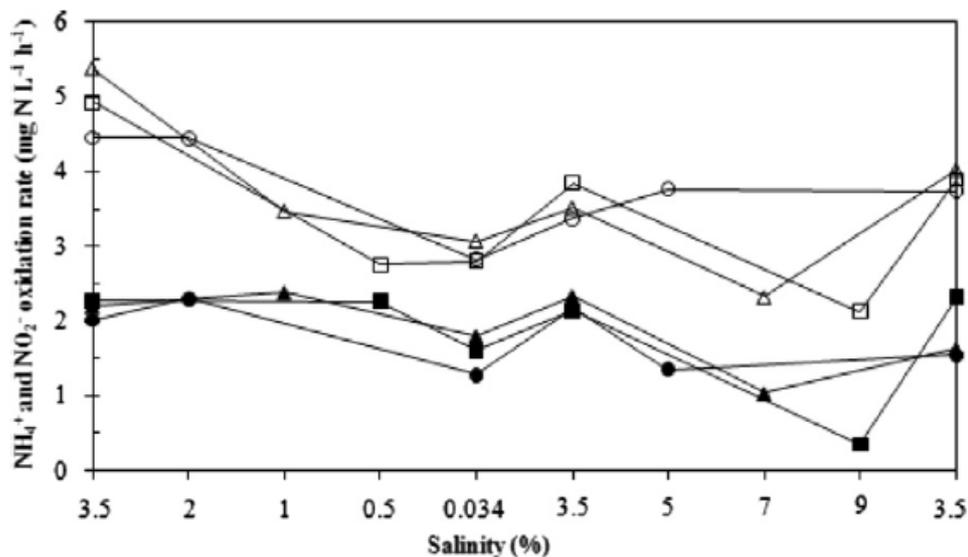


Abbildung 3: Einfluss des Salzgehaltes auf die Ammoniumoxidationsrate AOR (ausgefüllte Symbole) und die Nitritoxidationsrate NOR (offene Symbole) in mg N pro Liter und Stunde (Sudarmo et al. 2011).

Im nächsten Versuchsansatz wurden die kontinuierlichen Reaktoren bei unterschiedlichen Temperaturen betrieben wobei es sich um Kurzzeit-Experimente handelt d.h. die Zeitdauer für die Temperaturänderung war deutlich kürzer als die Generationszeit von Nitrifikanten. Die unterschiedlichen Festbettreaktoren wurden zuerst bei Raumtemperatur (22,5 °C) adaptiert und anschließend wurde die Temperatur auf 17,5, 12,5 und 6 °C verringert bzw. auf 27,5, 32,5, 40 auf 50 °C erhöht. In Abb. 4 ist der Einfluss der Temperatur auf die AOR und NOR dargestellt. Sowohl die Ammonium- als auch die Nitritoxidationsrate erhöhte sich mit steigender Temperatur bis zu einem Maximum bei 40 °C. Wie auch bei den Versuchen mit der Variation des Salzgehaltes lag die NOR immer deutlich höher als die AOR (Abb. 4). Bei 6 °C und bei 50 °C zeigte sich eine deutlich reduzierte Aktivität wobei nach erneuter Inkubation des Reaktors von 6 °C auf 22,5 °C eine Erholung der Nitrifikationsleistung beobachtbar war (gepunkteter Balken AOR, gestreifter Balken NOR; Einzelpfeil in Abb. 4). Die Nitrifikationsaktivität wurde nach Inkubation bei 50 °C irreversibel gehemmt, es konnte keine Erholung nach Inkubation des Reaktors bei 50 °C durch Temperaturabsenkung auf 22,5 °C gemessen werden (Abb. 4, Doppelpfeil). Auch eine Variation in der Betriebstemperatur führte nicht zu einer selektiven Unterdrückung oder Hemmung der NOB.

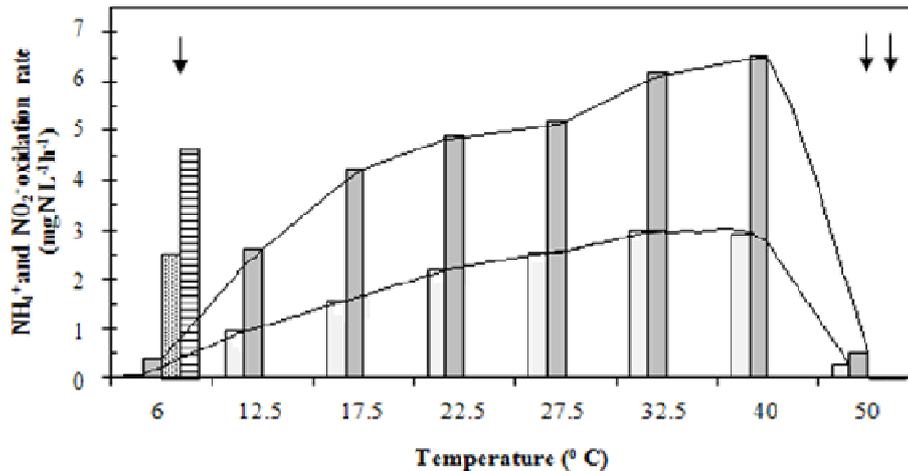


Abbildung 4: Einfluss der Temperatur auf die Ammoniumoxidationsrate AOR (helle Balken) und die Nitritoxidationsrate NOR (dunkle Balken) in mg N pro Liter und Stunde. Der gepunktete Balken zeigt die Wiederherstellung der AOR und der gestreifte Balken die Wiederherstellung der NOR bei einer Erhöhung der Temperatur von 6 °C auf 22,5 °C an (↓). Eine Erholung der AOR und NOR bei Erniedrigung der Temperatur von 50 °C auf 22,5 °C (↓↓) konnte nicht erreicht werden (Sudarno et al. 2011).

Ammonium (NH_4^+) und Nitrit (NO_2^-) liegt je nach pH-Wert und Temperatur in nicht dissoziierter Form als Ammoniak FA (NH_3) oder salpetrige Säure FNA (HNO_2) vor. Dieser Zusammenhang wurde von Anthonisen et al. (1976) beschrieben. FA und FNA können wegen der fehlenden Ladung leichter in das Zellinnere der Nitrifikanten diffundieren und dort die Zelle inhibieren. Mit zunehmender Konzentration von Ammonium und Nitrit nimmt der Anteil des undissoziierten FA und FNA zu und damit auch der toxische Effekt dieser Substrate. In Abb. 5 und 6 ist der Einfluss steigender Ammonium- und Nitritkonzentration auf die AOR und NOR dargestellt. Mit steigender Ammoniumkonzentration, dem Substrat der AOB verringert sich die AOR deutlich wohingegen der Einfluss auf die NOR geringer war. Der IC_{50} -Wert, also die Ammoniumkonzentration, bei der die AOR um 50% inhibiert wird, beträgt für die AOB 1 g $\text{NH}_4^+\text{-N/l}$, für die NOB 5 g $\text{NH}_4^+\text{-N/l}$ (Abb. 5). Steigende Nitritkonzentrationen zeigten keinen inhibitorischen Effekt auf die NOB und bis 10 g $\text{NO}_2\text{-N/l}$ war immer noch keine Hemmung der NOB und ein Einfluss auf die NOR sichtbar. In Abb. 6 ist deswegen auch nur der Einfluss steigender Nitritkonzentrationen auf die AOR dargestellt. Schon geringe Mengen an Nitrit inhibieren die AOB und der IC_{50} -Wert beträgt 27 mg $\text{NO}_2\text{-N/l}$ (Abb. 6). Der hemmende Effekt von FA und FNA ist aber in beiden Fällen reversibel d.h. nach Austausch des Mediums mit den entsprechend hohen Ammonium- und Nitrit-Konzentrationen konnte wieder die ursprüngliche AOR und NOR detektiert werden (gepunktete und schraffierte Balken in Abb. 5 und 6). Auch in diesem Versuch haben sich die NOB als widerstandsfähiger als die AOB erwiesen. Hohe Substrat-Konzentrationen hatten einen stärkeren Einfluss auf die AOR.

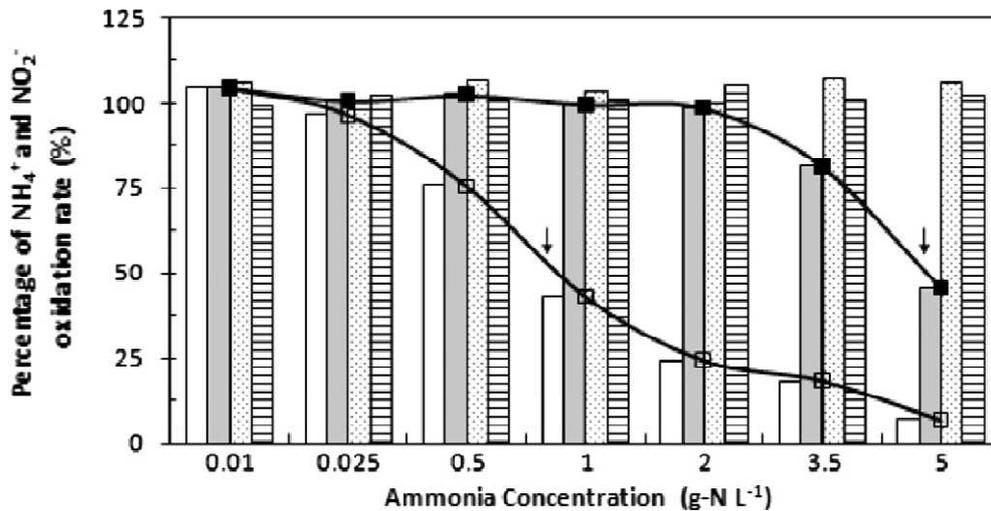


Abbildung 5: Einfluss steigender Ammonium-Konzentration auf die Ammoniumoxidationsrate AOR (helle Balken) und die Nitritoxidationsrate NOR (dunkle Balken) in mg N pro Liter und Stunde. Die gepunkteten Balken zeigen die Wiederherstellung der AOR und der gestreifte Balken die Wiederherstellung der NOR bei Austausch des Ammonium-haltigen Mediums an. Der IC₅₀-Wert für die AOR beträgt 1 g NH₄⁺-N/l (↓), der IC₅₀-Wert für die NOR beträgt 5 g NH₄⁺-N/l (↓↓) (Sudarno et al. 2011).

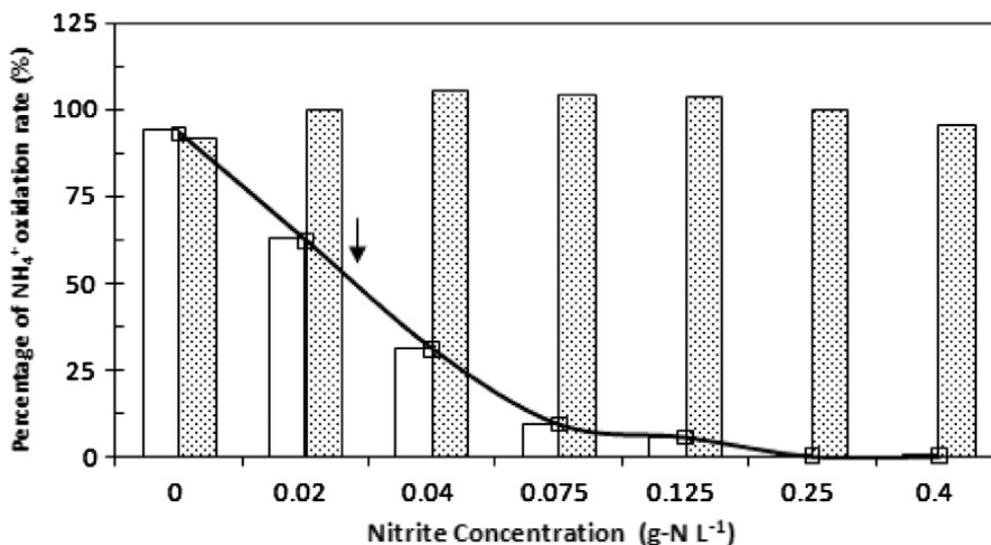


Abbildung 6: Einfluss steigender Nitrit-Konzentration auf die Ammoniumoxidationsrate AOR (helle Balken) in mg N pro Liter und Stunde. Die gepunkteten Balken zeigen die Wiederherstellung der AOR bei Austausch des Nitrit-haltigen Mediums an. Der IC₅₀-Wert für die AOR beträgt 27 mg NO₂⁻-N/l (↓) (Sudarno et al. 2011).

4.3 Identifikation der dominanten AOB und NOB in FBR mit porösen Keramikringen

Bewachsene poröse Keramikringe wurden zu bestimmten Zeitintervallen (127d, 160d und 210) dem FBR entnommen, die Biomasse wurde von dem Trägermaterial herunter gewaschen und die DNA wurde extrahiert. Zum Nachweis spezifischer Gruppen wurden für die PCR Primerpaare verwendet, die spezifisch für alle Bacteria,

für die β -subclass der Ammonium-Oxidierer, für *Nitrospira*- und *Nitrobacter*-Spezies und für archaeelle Ammonium-Oxidierer waren (Sudarno et al. 2010). In einer zweiten PCR (nested PCR) wurde ein Primerpaar verwendet (341f-GC/518r), um die Amplifikate in einer denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese DGGE sichtbar machen zu können. Einzelne Banden wurden nach Klonierung sequenziert um die Gattung/Spezies identifizieren zu können. In Abb. 7 ist ein DGGE-Gel nach Silberfärbung dargestellt. Bei den NOB (*Nitrospira*) gibt es nur eine dominante Bande die über die Reaktorbetriebszeit sich auch nicht verändert. Bei den AOB sind nach den beiden ersten Beprobungszeiten 3 Banden sichtbar, wobei Bande B nach Erhöhung der ALR zugunsten Bande D verschwindet. Es wurden keine spezifischen PCR-Produkte (Banden) von archaeellen Ammonium-Oxidierern und von *Nitrobacter* im DGGE-Gel detektiert. Nach Sequenzierung wurden alle vier Banden bei den Ammonium-Oxidierern halophilen oder Salz-toleranten Spezies von *Nitrosomonas* zugeordnet. Bande A und B sind nah verwandt mit *N. aestuarii*, Bande D gehört auf Grund seiner Sequenzhomologie in die *Nitrosomonas aestuarii/Nitrospira marina* Gruppe. Die dominante Bande bei den NOB kann *Nitrospira marina* zugeordnet werden.

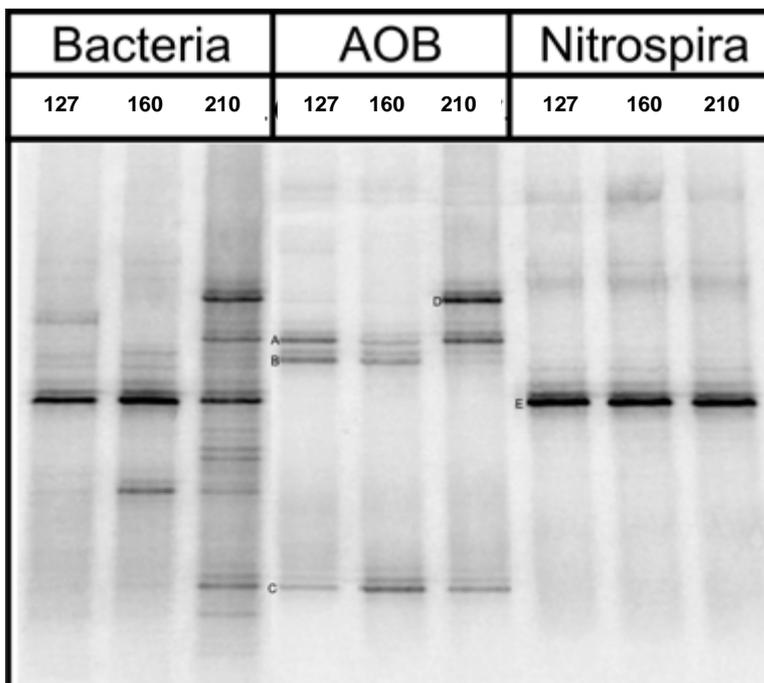


Abbildung 7: Photographie eines mit Silber gefärbten DGGE-Gels von Biomasse-Proben aus einem FBR. DGGE-Profile spezifisch für Bacteria, Ammonium-oxidierende Bakterien und *Nitrospira*-Spezies nach 127, 160 und 210 Tagen Betriebszeit (Sudarno et al. 2010).

5. Fazit

Die hier dargestellten Arbeiten sind auszugsweise aus 2 Veröffentlichungen (Sudarno et al. 2010 und Sudarno et al. 2011) sowie der Dissertation von Herrn Sudarno (<http://digbib.ubka.uni-karlsruhe.de/volltexte/1000023593>) entnommen. Mit einem halophilem Inokulum von der deutschen Nordseeküste konnte eine stabile Nitrifikation in Festbettreaktoren erreicht werden. Mit einer Ammonium-Raumbelastung von 130 mg Ammonium-N pro Liter und Tag bei einer HRT von 1 Tag konnte in einem FBR mit porösen Keramikringen eine stabile Nitrifikation etabliert werden. Als dominante AOB haben sich Spezies von *Nitrosomonas aestuarii* etabliert, bei den NOB *Nitrospira marina*, beide halophile bzw. halotolerante Spezies. Entgegen den meisten Literaturberichten (die sich allerdings nicht mit halophilen

Nitrifikanten beschäftigt haben) waren die halophilen NOB deutlich toleranter gegenüber Schwankungen im Salzgehalt, Temperatureinflüssen und Hemmeffekten der undissoziierten Substrate FA und FNA. Für die untersuchten Betriebsbedingungen konnte keine Unterdrückung oder Inhibierung der NOB erreicht werden. Somit konnte keine verkürzte Nitrifikation etabliert werden.

6. Literatur

- Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S., Srinath, E.G., 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Control Fed.* 48 (5), 852-853.
- Fontenot, Q., Bonvillain, C., Kilgen, M., Boopathy, R., 2007. Effects of temperature, salinity, and carbon: nitrogen ratio on sequencing batch reactor treating shrimp aquaculture wastewater. *Bioresour. Technol.* 98, 1700-1703.
- Gallert, C. und Winter, J., 2009. Biologische Abwasserreinigung unter Hochsalzbedingungen. *Industrietage Wassertechnik. Gemeinschaftsveranstaltung der DECHEMA und der DWA, Fulda, 30.11./01.12.09. DWA proceedings „Management und Behandlung industrieller Prozess- und Abwässer, p44-58.*
- Sudarno 2011. Nitrification in Fixed Bed Reactors Treating Saline Wastewater. Dissertation am Institut für Ingenieurbiologie und Biotechnologie des Abwassers, Karlsruher Institut für Technologie, <http://digbib.ubka.uni-karlsruhe.de/volltexte/1000023593>.
- Sudarno, U., Bathe, S., Winter, J., Gallert, C., 2010. Nitrification in fixed-bed reactors treating saline wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 2017-2030.
- Sudarno, Winter, J., Gallert, C., 2011. Effects of varying salinity, temperature, ammonia and nitrous acid concentrations on nitrification of saline wastewater in fixed-bed reactors. *Biores. Technol.* 102, 5665-5673.
- Windey, K., Bo, I.D., Verstraete, W., 2005. Oxygen-limited autotrophic nitrification–denitrification (OLAND) in a rotating biological contactor treating high-salinity wastewater. *Water Res.* 39, 4512-4520.
- Woolard, C. R., Irvine, R. L., 1995. Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor. *Water Research*, 29, 1159-1168.