

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E46283

**COMMUNITIES OF AMMONIA-OXIDIZING BACTERIA AND ARCHAEA IN
FULL-SCALE WASTEWATER TREATMENT PLANTS IN THAILAND**

MISS PUNTIPAR SONTHIPHAND

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE PROGRAM IN ENVIRONMENTAL MANAGEMENT
(INTERDISCIPLINARY PROGRAM)
GRADUATE SCHOOL
CHULALONGKORN UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2008
COPYRIGHT OF CHULALONGKORN UNIVERSITY**

b00256119

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E46283

COMMUNITIES OF AMMONIA-OXIDIZING BACTERIA AND ARCHAEA IN
FULL-SCALE WASTEWATER TREATMENT PLANTS IN THAILAND



Miss Puntipar Sonthiphand

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Environmental Management

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University



5 0 8 7 5 2 9 5 2 0

กลุ่มประชากรแอมโมเนียออกไซด์ซึ่งแบคทีเรียและอาศัยในระบบบำบัดน้ำเสียในประเทศไทย



นางสาวพันธุ์ทิพา สนธิพันธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พันธุ์ทิพา สนธิพันธ์: กลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งแบคทีเรียและอาร์เคียในระบบบำบัดน้ำเสียในประเทศไทย. (COMMUNITIES OF AMMONIA-OXIDIZING BACTERIA AND ARCHAEA IN FULL-SCALE WASTEWATER TREATMENT PLANTS IN THAILAND) อ.ที่ปริกษาวิทยานินพนธ์หลัก : อ. ดร.ตะวัน ลิ้มปียากร, 105 หน้า.

E46283

จากความเชื่อในอดีตที่ว่าแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งแบคทีเรีย (AOB) เป็นจุลชีพที่มีบทบาทหลักในการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนโตรเจน ในปัจจุบันมีการค้นพบว่านอกจากแบคทีเรียแล้วจุลชีพกลุ่มอาร์เคีย (Archaea) ก็สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนโตรเจนได้ จากหลักฐานการมีอยู่ของยีน *amoA* ของแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งอาร์เคีย (AOA) ในทะเลและดิน นอกจากนี้ยังมีการแยกอาร์เคียจากทะเลได้เป็นครั้งแรกชื่อ *Nitrosopumilus maritimus* และจากเทคนิค real-time PCR พบว่า มีปริมาณยีน *amoA* ของอาร์เคียมากกว่าแบคทีเรีย จึงเกิดคำถามว่า AOA เป็นจุลชีพหลักในการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนโตรเจนหรือไม่ งานวิจัยนี้มุ่งศึกษากลุ่มประชากร AOB และ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสีย 10 แห่ง (โรงบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรม 4 แห่ง และโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน 6 แห่ง) ที่มีลักษณะน้ำเสีย, องค์ประกอบของระบบ, และการควบคุมระบบที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังศึกษาลักษณะของปริมาณแอมโมเนียต่อกลุ่มประชากร AOB และ AOA ในไนโตรไฟอิงแอคทีเวเตดสลัดจ์ (NAS) โดยนำเชื้อจากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนมาเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ 3 ถัง โดยอาหารอนินทรีย์ที่มีปริมาณแอมโมเนียต่างกัน 2mM, 10mM, และ 30 mM NH₄⁺-N (NAS2, NAS10, และ NAS30 ตามลำดับ) ทำการศึกษาจุลชีพประชากร AOB โดยใช้เทคนิค specific PCR amplification ตามด้วย DGGE และอ่านลำดับรหัสพันธุกรรมของ AOB 16S rRNA ยีน ส่วนกลุ่มประชากร AOA ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค specific PCR amplification ตามด้วย clone libraries และอ่านลำดับรหัสพันธุกรรมของ AOA *amoA* ยีน จากผลการทดลองพบว่ากลุ่มประชากร AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมมีความหลากหลายมากกว่าในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน AOB ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมตกอยู่ใน 4 คลัสเตอร์ ดังนี้ unknown *Nitrosomonas* cluster, *N. europaea*-*Nc. mobilis* cluster, *N. communis* cluster, และ *N. oligotropha* cluster ส่วน AOB ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนตกอยู่ใน *N. communis* cluster และ *N. oligotropha* cluster จะเห็นว่าความแตกต่างของลักษณะน้ำเสีย (ความเข้มข้นของแอมโมเนีย) อาจเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดรูปแบบการกระจายของกลุ่มประชากร AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียทั้ง 2 แบบ ระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนเกือบทั้งหมดเป็นแอคทีเวเตดสลัดจ์ (activated sludge process) ยกเว้นเพียงหนึ่งโรงบำบัดเป็นบ่อเติมอากาศ (aerated lagoon system) พบว่ากลุ่มประชากร AOB จากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนทุกแห่งเหมือนกัน จะเห็นว่องประกอบและการควบคุมระบบมีความสำคัญน้อยกว่าลักษณะน้ำเสีย ในส่วนของ AOA สามารถแยกได้ 72 โคลน จากแปดในสิบบระบบบำบัดน้ำเสีย และสามารถแบ่งได้เป็น 38 OTUs กระจายใน 12 คลัสเตอร์ สิ่งต่างจาก AOB คือ กลุ่มประชากร AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมมีความหลากหลายน้อยกว่าในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน จากระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมพบ AOA จาก 2 แห่ง เท่านั้น คือจากระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมที่รับภาระแอมโมเนียปานกลาง (40 -70 mg-N/l) พบ AOA อยู่ใน คลัสเตอร์ G และ K แต่ไม่พบ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมที่รับภาระแอมโมเนียต่ำ (13 mg-N/l) และสูง (422 mg-N/l) ในทางตรงกันข้ามพบ AOA จากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนทั้งหมดทั้งที่รับภาระแอมโมเนียต่ำ (5 - 13 mg-N/l) พบ AOA อยู่ใน คลัสเตอร์ A, B, C, E, F, G, I, J, K, L, M, และ N นอกจากนี้ยังพบว่าจากตัวอย่างที่มาจากระบบบำบัดแบบแอคทีเวเตดสลัดจ์ AOA จะกระจายอยู่ใน 1 - 3 คลัสเตอร์ แต่ตัวอย่างที่มาจากบ่อเติมอากาศพบว่า AOA จะกระจายอยู่ใน 6 คลัสเตอร์ ดังนั้นในกรณีของ AOA องค์ประกอบและการควบคุมระบบมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการกระจายของกลุ่มประชากร AOA จากการทำสไลด์จากรบบบำบัดน้ำเสียชุมชนมาเพาะเลี้ยงใน NAS พบว่า กลุ่มประชากร AOB มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ กลุ่มประชากร AOB จากสลัดจ์ตกอยู่ในกลุ่ม *N. communis* cluster และ *N. oligotropha* cluster หลังจากเลี้ยงในหลายความเข้มข้นแอมโมเนีย *N. communis* cluster หายไปจากทุก NAS พบ AOB ที่มี affinity ต่อแอมโมเนียสูงใน NAS 2 (*N. oligotropha* cluster), พบ AOB ที่มี affinity ต่อแอมโมเนียต่ำใน NAS 30 (*N. europaea* cluster), และพบ AOB ทั้งสองชนิดใน NAS 10 (unknown *Nitrosomonas* cluster and *N. europaea* cluster) ตรงข้ามกับ AOB เกือบทุกโคลนของ AOA จาก NAS 2 (19 จาก 21), NAS10 (23 จาก 26), และ NAS 30 (30 จาก 30) ตกในคลัสเตอร์ K อีกทั้งกลุ่มประชากร AOA ใน NAS 2 และ NAS10 มีความหลากหลายมากกว่าใน NAS 30 ซึ่งให้เห็นว่าปริมาณแอมโมเนียมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อกลุ่มประชากร AOB แต่ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อกลุ่มประชากร AOA ในทุก NAS

สาขาวิชา การจัดการสิ่งแวดล้อม

ลายมือชื่อนิสิต

พันธุ์ทิพา สนธิพันธ์

ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานินพนธ์หลัก

ตะวัน -

#508 75295 20: MAJOR ENRONMENTAL MANAGEMENT

KEYWORDS : AMMONIA-OXIDIZING BACTERIA/ AMMONIA-OXIDIZING ARCHAEA/ *amoA* GENE/ 16S rRNA GENE/ MICROBIAL COMMUNITY/ WASTEWATER TREATMENT PLANT

PUNTIPAR SONTHIPHAND: COMMUNITIES OF AMONIA-OXIDIZING BACTERIA AND ARCHAEA IN FULL-SCALE WASTEWATER TREATMENT PLANTS IN THAILAND. ADVISOR: TAWAN LIMPIYAKORN, PH.D , 105 PP.

E46283

For several decades, it had been believed that ammonia-oxidizing bacteria (AOB) is the only microorganisms that are responsible for the oxidation of ammonia to nitrite in the global nitrogen cycle. Recently, a few evidences have shown that autotrophic ammonia oxidation is not only restricted to the domain *Bacteria*, but also the domain *Archaea*. The presence of an ammonia monooxygenase (*amoA*) genes of ammonia-oxidizing archaea (AOA) has been revealed in a few marine and soil environments; in addition, the first AOA, *Nitrosopumilus maritimus*, has been isolated from sea water. Abundances of *amoA* genes of AOA over those of AOB have been found in few studies using quantitative real-time PCR technique. As results, AOA is questionable of the major environmental microorganisms that oxidize ammonia to nitrite. In this study, communities of AOB and AOA in ten full-scale wastewater treatment plants (WWTPs) (four industrial WWTPs and six municipal WWTPs) that are different in influent characteristics, system configuration and system operation were observed. In addition, effect of ammonium loads on AOB and AOA communities was investigated by enriching sludge taken from a municipal WWTP with inorganic medium containing different ammonium concentrations of 2, 10, and 30 mM NH₄⁺-N (NAS2, NAS10, and NAS30, respectively). The communities of AOB and AOA were analyzed using specific PCR amplification followed by DGGE and sequencing of AOB 16S rRNA genes and specific PCR simplification followed by clone libraries and sequencing of AOA *amoA* genes, respectively. Results from full-scale WWTPs showed that AOB communities in four industrial WWTPs were more diverse than those in the six municipal WWTPs. AOB found in industrial WWTPs fell into 4 clusters that are unknown *Nitrosomonas* cluster, *N. europaea-Nc. mobilis* cluster, *N. communis* cluster, and *N. oligotropha* cluster, while AOB found in municipal WWTPs were restricted to only *N. communis* cluster and *N. oligotropha* cluster. The difference of influent wastewater characteristic (ammonium concentration) might be the key factor causing distinct distribution patterns of AOB communities in both types of WWTPs. Almost all municipal WWTPs in this study were activated sludge processes with exception for one plant that was aerated lagoon system. The communities of AOB in all municipal WWTPs were similar. As results, system configuration and system operation were less significant than influent wastewater characteristics. A total 72 AOA *amoA* sequences, recovered from eight out of ten WWTPs, could be categorized into 38 OTUs, and distributed in 12 clusters. Unlike AOB, communities of AOA in the industrial WWTPs were less diverse than those in the municipal WWTPs. Only 2 industrial WWTPs with moderate ammonium loads (40 -70 mg-N/l), contained AOA (clusters G and K). Negative PCR amplification occurred with another two industrial WWTPs with low (13 mg-N/l) and high (422 mg-N/l) ammonium loads. In contrast, all six municipal WWTPs, that received low ammonium loads of 5 – 13 mg-N/l, possessed AOA (cluster A, B, C, E, F, G, I, J, K, L, M, and N). Five out of the six municipal WWTPs were activated sludge processes, whereas another was an aerated lagoon system. For each sample of activated sludge processes, only 1 – 3 clusters of AOA were observed, while in the sample from an aerated lagoon system much more AOA clusters of 6 were found. Therefore, system configuration and system operation might be significant for the distribution of AOA in WWTPs. Results from enriched NASs suggested that AOB communities obviously shifted from seed sludge to enriched NASs and in each enriched NAS, communities of AOB varied particularly. Sludge taken from a municipal WWTP used as a seed for all reactors contained members of *N. communis* cluster and *N. oligotropha* cluster. After it was enriched under various ammonium loads, members of *N. communis* cluster disappeared from all enriched NASs. AOB with high affinity to ammonia presented in NAS 2 (*N. oligotropha* cluster), AOB with low affinity to ammonia presented in NAS 30 (*N. europaea* cluster), and both types of AOB survived in NAS 10 (unknown *Nitrosomonas* cluster and *N. europaea* cluster). In contrast to AOB, almost all AOA clones from NAS2 (19 out of 21), NAS10 (23 out of 26), and NAS30 (30 out of 30) fell in the same cluster (cluster K). AOA communities in NAS2 and NAS10 were more diverse than those of NAS30. These demonstrated that ammonium load significantly influenced AOB communities, but not AOA communities in enriched NASs.

Field of Study : Environmental Management

Student's Signature : พันธุ์ทิพย์ สอนทิพย์

Academic Year : 2008

Advisor's Signature : ท.อ.อ. ~

ACKNOWLEDGEMENTS

I do wish to express my graceful appreciation to Dr. Tawan Limpiyakorn who is my thesis advisor for his guidance and support during the entire of my study and for his time, patience and suggestions and comments, I am deeply indebted.

Moreover, I would like to express my appreciation and sincere gratitude to Dr. Manaskorn Rachakornkij who is a chairman of my thesis committee, Assistant Professor Ekawan Luepromchai, Associate Professor Alissara Reungsang, and Dr. Sorawit Powtongsook who are committee members for their suggestions and recommendations throughout my research work.

In addition, I would like to thank the National Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management (NCE-EHWM) for the full scholarship, funding and supporting facilities for my study.

I also would like to thank the Bangkok Metropolitan Administration (BMA) for providing municipal wastewater samples and their information for this study.

Special thanks to Miss Chantana Intim who is a Laboratory supervisor and all staffs at NCE-EHWM program for their helps especially in the analytical works.

I thank to my fellow all students at NCE-EHWM for making the time enjoyable in the lab.

Last but definite not least, I would like to express my deep appreciation to my family. They always support and encourage in any time.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES	xi
LIST OF FIGURES	xii
CHAPTER I : INTRODUCTION	1
1.1 Background and motivation.....	1
1.2 Objectives.....	4
1.3 Hypothesis.....	5
1.4 Scope of the study.....	5
CHAPTER II : LITERATURE REVIEWS	6
2.1 Microbial nitrification	6
2.2 Ammonia-oxidizing bacteria (AOB).....	7
2.2.1 Phylogeny of ammonia-oxidizing bacteria.....	7
2.2.2 Factors influencing communities of ammonia-oxidizing bacteria.....	13
2.2.3 Dominant populations of ammonia-oxidizing bacteria in wastewater treatment plant.....	15
2.2.4 Co-metabolism of organic compounds by ammonia- oxidizing bacteria.....	15
2.3 Ammonia-oxidizing archaea (AOA).....	17
2.3.1 Phylogeny of AOA.....	19
2.3.2 Factors influencing communities of ammonia-oxidizing archaea.....	20

	Page
2.4 Molecular technique.....	23
CHAPTER III : METHODOLOGY.....	25
3.1 Experimental framework	25
3.2 Measurement ammonia, nitrite, and nitrate.....	26
3.2.1 Measurement of ammonium.....	26
3.2.2 Measurement of nitrite.....	26
3.2.3 Measurement of nitrate.....	27
3.3 Analysis of communities of ammonia-oxidizing bacteria and archaea.....	27
3.3.1 Sample preparation and DNA extraction.....	27
3.3.2 Analysis of ammonia-oxidizing bacteria communities.....	28
3.3.3 Analysis of ammonia-oxidizing archaea communities.....	30
3.4 Experiment Part I and II : Analysis of communities of ammonia- oxidizing bacteria and archaea in full-scale wastewater treatment plants (WWTPs).....	32
3.4.1 Sample collection and description.....	32
3.4.2 Analysis of communities of ammonia-oxidizing bacteria in full-scale WWTPs.....	32
3.4.3 Analysis of communities of ammonia-oxidizing archaea in full-scale WWTPs.....	32
3.5 Experiment Part III : Effect of ammonium concentrations on communities of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in enriched nitrifying activated sludge (NAS).....	34
3.5.1 Seed sludge.....	35
3.5.2 Medium for enriching nitrifying activated sludge.....	35
3.5.3 Enrichment of nitrifying activated sludge by inorganic medium containing different ammonium concentrations (2, 10, and 30 mM).....	35
3.5.4 Analysis of communities of ammonia-oxidizing bacteria in seed sludge and enriched NAS.....	36

	Page
3.5.5 Analysis of communities of ammonia-oxidizing archaea in seed sludge and enriched NAS.....	36
CHAPTER IV : RESULTS AND DISCUSSION.....	37
4.1 Communities of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in full-scale wastewater treatment plants (WWTPs).....	37
4.1.1 Description of full-scale WWTPs.....	37
4.1.2 Communities of ammonia-oxidizing bacteria in full-scale wastewater treatment plants.....	39
4.1.3 Communities of ammonia-oxidizing archaea in full-scale wastewater treatment plants.....	44
4.2 Effect of ammonium concentrations on communities of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in enriched nitrifying activated sludge.....	54
4.2.1 Enrichment of nitrifying activated sludge by inorganic medium containing different ammonium concentrations of 2, 10, and 30 mM NH_4^+ -N (NAS 2, NAS 10, and NAS 30).....	54
4.2.2 Communities of ammonia-oxidizing bacteria in seed sludge and enriched NAS.....	55
4.2.3 Communities of ammonia-oxidizing archaea in seed sludge and enriched NAS.....	59
CHAPTER V : CONCLUSIONS AND SUGGESTIONS FOR FUTURE WORKS.....	68
5.1 Conclusions.....	68
5.1.1 Communities of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in full-scale wastewater treatment plants.....	68
5.1.2 Effect of ammonia concentrations on communities of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in seed sludge and enriched NAS.....	69
5.2 Suggestions for future works.....	70

	Page
REFERENCES.....	71
APPENDICES.....	83
APPENDIX A.....	84
APPENDIX B.....	87
APPENDIX C.....	95
APPENDIX D.....	98
VITAE	105

LIST OF TABLES

Table		Page
2.1	Characteristics and preferred habitats of described species of the ammonia-oxidizing bacteria.....	14
2.2	Specific primer targeting 16S rRNA and <i>amoA</i> gene of AOB and AOA.....	24
3.1	Specific primers for AOB used in this study.....	29
3.2	Specific primers of AOA used in this study.....	31
3.3	Influent and effluent characteristics, system configuration, and system operation of WWTPs.....	33
4.1	Description of wastewater treatment plants.....	38
4.2	Closely related sequences of AOB 16S rRNA gene fragments.....	39
4.3	Summary of AOB found in full-scale WWTPs.....	40
4.4	Closely related sequences of AOA <i>amoA</i> gene fragments.....	45
4.5	Summary of AOA communities in full-scale WWTPs.....	47
4.6	Closely related sequences of AOB 16S rRNA gene fragments.....	56
4.7	Summary of AOB found in seed sludge and enriched NAS.....	56
4.8	Closely related sequences of AOA <i>amoA</i> gene fragments.....	60
4.9	Summary of AOA communities in seed sludge and enriched NAS.....	61

LIST OF FIGURES

Figure		Page
2.1	Autotrophic ammonia-oxidation during nitrification.....	6
2.2	16S rRNA based phylogenetic tree of the nitrosomonads.....	10
2.3	16S rRNA-based phylogenetic tree of the highly related genera <i>Nitrosospira</i> , <i>Nitrosolobus</i> , and <i>Nitrosovibrio</i>	11
2.4	AmoA-based phylogenetic tree of the betaproteobacterial AOB.....	12
2.5	Co-metabolism of ethylene by AOB.....	16
2.6	Phylogenetic tree of AOA.....	20
3.1	Experimental framework.....	25
3.2	Experimental framework for analysis of ammonia-oxidizing bacteria communities.....	28
3.3	Experimental framework for analysis of ammonia oxidizing archaea communities.....	30
3.4	Experimental framework for analyzing the effect of ammonium concentrations on communities of AOB and AOA in enriched NAS...	34
4.1	Phylogenetic tree showing 16S rRNA genes of AOB belonging to Betaproteobacterial with addition of 400-bp sequences from full-scale WWTPs into the distance tree that was previously based on comparison of 1000-bp sequences of described AOB.....	42
4.2	Neighbor joining tree of AOA <i>amoA</i> sequences from full-scale WWTPs.....	48
4.3	Distance matrix tree of AOA <i>amoA</i> sequences from full-scale WWTPs.....	49
4.4	Maximum parsimony tree of AOA <i>amoA</i> sequences from full-scale WWTPs.....	50
4.5	Maximum likelihood tree of AOA <i>amoA</i> sequences from full-scale WWTPs.....	51
4.6	Concentrations of ammonium, nitrite, and nitrate during enrichment of nitrifying activated sludge by inorganic medium containing different ammonium concentrations.....	54

Figure		Page
4.7	Phylogenetic tree showing 16S rRNA genes of AOB belonging to Betaproteobacterial with addition of 400-bp sequences from seed sludge and enriched NAS into the distance tree that was previously based on comparison of 1000-bp sequences of described AOB.....	57
4.8	Neighbor joining tree of AOA <i>amoA</i> sequences from seed sludge and enriched NAS.....	62
4.9	Distance matrix tree of AOA <i>amoA</i> sequences from seed sludge and enriched NAS.....	63
4.10	Maximum parsimony tree of AOA <i>amoA</i> sequences from seed sludge and enriched NAS.....	64
4.11	Maximum likelihood tree of AOA <i>amoA</i> sequences from seed sludge and enriched NAS.....	65