



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ กลุ่มประชากรแอมโมเนียออกไซด์ซึ่งแบคทีเรียและอาศัยในระบบบำบัดน้ำเสียในประเทศไทย

โดย ดร.ตะวัน ลิ้มปียากร

มีนาคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ กลุ่มประชากรแอมโมเนียออกไซด์ซึ่งแบคทีเรียและอาศัยในระบบบำบัดน้ำเสียในประเทศไทย

ดร.ตะวัน ทิมปิยากร

ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

มีความเชื่อมาตลอดหลายสิบปีว่าแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย (AOB) เป็นจุลินทรีย์เพียงกลุ่มเดียวที่มีบทบาทสำคัญในการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนโตรเจนในวัฏจักรไนโตรเจน อย่างไรก็ตามเมื่อ 6 ปีที่ผ่านมาได้มีการค้นพบว่านอกจากแบคทีเรียแล้ว ยังมีจุลินทรีย์อีกจำพวกหนึ่งคืออาร์เคียที่สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนเตรทได้เช่นกัน การค้นพบนี้ได้เปลี่ยนแปลงแนวความคิดและองค์ความรู้ว่าด้วยการออกซิไดซ์แอมโมเนียในวัฏจักรไนโตรเจน จึงเกิดคำถามขึ้นว่าในระบบสิ่งแวดล้อมแบบต่างๆแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงอาร์เคีย (AOA) เป็นจุลินทรีย์หลักในการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนโตรเจนหรือไม่ งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษากลุ่มประชากร AOB และ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสีย 10 แห่ง (โรงบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรม 4 แห่ง และ โรงบำบัดน้ำเสียชุมชน 6 แห่ง) ที่มีลักษณะน้ำเสีย, องค์ประกอบ, และการควบคุมระบบที่แตกต่างกัน ทำการศึกษาากลุ่มประชากร AOB โดยใช้เทคนิค specific PCR amplification ตามด้วย DGGE และอ่านลำดับเบสของ AOB 16S rRNA ขึ้น และกลุ่มประชากร AOA โดยใช้เทคนิค specific PCR simplification ตามด้วย clone libraries และอ่านลำดับเบสของ AOA *amoA* ขึ้น จากผลการทดลองพบว่ากลุ่มประชากร AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมมีความหลากหลายมากกว่าในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน AOB ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมตกอยู่ใน 4 คริสเตอร์ ดังนี้คือ unknown *Nitrosomonas* cluster, *N. europaea*-*Nc. mobilis* cluster, *N. communis* cluster, และ *N. oligotropha* cluster ส่วน AOB ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนตกอยู่ในกลุ่ม *N. communis* cluster และ *N. oligotropha* cluster ความแตกต่างของลักษณะน้ำเสีย (ความเข้มข้นของแอมโมเนีย) อาจเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดรูปแบบการกระจายของกลุ่มประชากร AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียทั้ง 2 แบบ ในส่วนของ AOA พบ AOA 8 ใน 10 ของระบบบำบัดน้ำเสียที่ทำการศึกษา โดยสามารถแบ่ง AOA 72 โคลนที่พบได้เป็น 38 OTUs กระจายใน 12 คริสเตอร์ ซึ่งมีความแตกต่างจาก AOB คือ กลุ่มประชากร AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมมีความหลากหลายน้อยกว่าในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน จากระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมพบ AOA จาก 2 โรงบำบัดเท่านั้น คือ จากระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมที่รับภาระแอมโมเนียปานกลาง (40 -70 mg-N/l) โดย AOA อยู่ใน คริสเตอร์ G และ K ในทางตรงกันข้ามพบ AOA จากทั้ง 6 ระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนซึ่งรับภาระแอมโมเนียต่ำ (5 – 13 mg-N/l) โดยอยู่ใน คริสเตอร์ A, B, C, E, F, I, J, K, L, M, และ N สำหรับระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนที่เป็นระบบตะกอนเร่ง พบ AOA เพียง 1-3 คริสเตอร์ในแต่ละระบบบำบัดเท่านั้น ในขณะที่พบ AOA ถึง 6 คริสเตอร์ ในระบบที่เป็นบ่อเติมอากาศ (Aerated lagoon) ดังนั้น องค์ประกอบและการควบคุมระบบน่าจะส่งผลต่อการกระจายตัวของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสีย ผลการทดลองแสดงความเป็นไปได้ที่ AOA จะเป็นจุลินทรีย์หลักที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนโตรเจนในระบบบำบัดน้ำเสีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน

คำสำคัญ: แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย, แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงอาร์เคีย, ยีน *amoA*, ตะกอนเร่ง ระบบบำบัดน้ำเสีย

Abstract

For several decades, ammonia-oxidizing bacteria (AOB) had been believed to be the only microorganisms playing a key role in ammonia oxidation in global nitrogen cycle. However, a few evidence recently suggested that autotrophic ammonia oxidation is not only restrict to the domain *Bacteria*, but also occur in the domain *Archaea*. The occurrence of ammonia monooxygenase (*amoA*) genes of ammonia-oxidizing archaea (AOA) has been reported in a variety of natural environments; in addition, the first and the only available thus far AOA isolate, *Nitrosopumilus maritimus*, has been retrieved from marine system. As results, it is suspected that in the environments AOA are the major 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. 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 amplification followed by clone libraries and sequencing of AOA *amoA* genes, respectively. The results showed that AOB communities in four industrial WWTPs were more diverse than those in the six municipal WWTPs. AOB found in the 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 the municipal WWTPs were restricted to only *N. communis* cluster and *N. oligotropha* cluster. The difference of influent wastewater characteristic (ammonia concentration) might be the key factor causing distinct distribution patterns of AOB communities in both types of WWTPs. In spite most of the municipal WWTPs in this study were the activated sludge processes with an exception of one plant that was an 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 8 out of 10 WWTPs, could be categorized into 38 OTUs, and distributed in 12 clusters. Unlike AOB, the 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). 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, I, J, K, L, M, and N). For each sample of activated sludge processes, only 1 – 3 clusters of AOA were observed, while in the sample of an aerated lagoon system much more AOA clusters of 6 were found. Therefore, in the case of AOA system configuration and system operation are significant for the distribution of AOA in WWTPs.

Keywords : Activated sludge, Ammonia-oxidizing archaea, Ammonia-oxidizing bacteria, *amoA* gene, Wastewater treatment plant

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
เนื้อหา	
1. ความเป็นมาและจุดประสงค์	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	4
2. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
3. ขอบเขตของการวิจัย	8
4. ระเบียบวิธีการวิจัย	
4.1 ศึกษาและรวบรวมข้อมูลเพื่อคัดเลือกระบบบำบัดน้ำเสียที่จะใช้ในการศึกษากลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งแบคทีเรียและอาศัย	8
4.2 ตัวอย่างของระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน	8
4.3 วิธีการวิเคราะห์	
4.3.1 วิธีการวิเคราะห์ปัจจัยสิ่งแวดล้อม	11
4.3.1.1 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของแอมโมเนีย	11
4.3.1.2 วิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรท	11
4.3.1.3 วิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนเตรท	11
4.3.2 การวิเคราะห์กลุ่มประชากร AOB และ AOA ในตัวอย่างตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียโดยใช้เทคนิคในระดับโมเลกุล	11
4.3.2.1 การรวบรวมลำดับพันธุกรรมของ AOB อ้างอิงและที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียจากงานวิจัยในอดีตเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ (Primer) ที่เหมาะสมสำหรับกลุ่มประชากร AOB	11

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.2.2 การรวบรวมลำดับพันธุกรรมของ AOA อ้างอิง เพื่อคัดเลือก ไพรเมอร์ (Primer) ที่เหมาะสมสำหรับกลุ่มประชากร AOA	12
4.3.2.2 การวิเคราะห์กลุ่มประชากร AOB และ AOA ในตัวอย่าง ตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียโดยใช้เทคนิคในระดับโมเลกุล	12
5. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย	
5.1 ผลการวิเคราะห์ปัจจัยสิ่งแวดล้อม	14
5.2 การบ่งชี้รหัสพันธุกรรมที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย	
5.2.1 กลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียจากระบบบำบัดน้ำเสีย	16
5.2.2 กลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคียในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน	20
6. ประโยชน์ที่ได้รับ	27
7. เอกสารอ้างอิง	29
7. ภาคผนวก	33

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	พารามิเตอร์ในการควบคุมระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนภายใต้การควบคุม ของกรุงเทพมหานคร	10
ตารางที่ 2	Nucleotide sequence ของไพรเมอร์สำหรับ 16s RNA gene และ <i>amoA</i> gene ของ AOB	12
ตารางที่ 3	ผลการวิเคราะห์ค่า MLSS ของตะกอนในถังบำบัดในโตรเจนและความเข้มข้น แอมโมเนีย, ไนโตรท, และไนเตรทในน้ำเข้าและน้ำออกจากระบบบำบัด น้ำเสียและถังบำบัดในโตรเจน	14
ตารางที่ 4	ความเหมือนของรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างจากแต่ละระบบบำบัดน้ำเสีย และฐานข้อมูล	16
ตารางที่ 5	สรุปการกระจายตัวของกลุ่ม AOB ในแต่ละตัวอย่างระบบบำบัดน้ำเสีย	18
ตารางที่ 6	ความเหมือนของรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างจากแต่ละระบบบำบัดน้ำเสีย และฐานข้อมูล	21
ตารางที่ 7	สรุปการกระจายตัวของกลุ่ม AOA ในแต่ละระบบบำบัด	26

		หน้า
ภาพที่ 1	Schematic 16S rRNA-based phylogenetic classification of the beta-subclass AOB	7
ภาพที่ 2	เครื่อง Thermo cycler สำหรับ polymerase chain reaction และ เครื่อง denaturing gradient gel electrophoresis	13
ภาพที่ 3	Phylogenetic tree สร้างโดยเพิ่มรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างจากระบบบำบัดน้ำเสียทั้งหมด (ความยาวประมาณ 400 bp) โดยใช้วิธี parsimony method ลงใน phylogenetic ที่สร้างมาจาก รหัสพันธุกรรมของ AOB ทั้งหมด (ที่มีความยาวมากกว่า 1000 bp) โดยใช้วิธี neighbor joining (distance matrix)	17
ภาพที่ 4	Phylogenetic tree สร้างโดยใช้วิธี neighbor joining โดยใช้รหัสพันธุกรรมที่พบในอดีต (Park <i>et al.</i> , 2005) ร่วมกับรหัสพันธุกรรมจากแต่ละตัวแทนของแต่ละกลุ่ม (OUT)	25

เนื้อหางานวิจัย

1. ความเป็นมาและวัตถุประสงค์

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การทิ้งน้ำเสียที่ไม่ได้รับการบำบัดอย่างมีประสิทธิภาพจากโรงบำบัดน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ก่อให้เกิดผลกระทบต่อมนุษย์ สัตว์น้ำ หรือแม้กระทั่งจุลชีพที่มีอยู่ตามธรรมชาติอย่างประเมินค่าไม่ได้ ปริมาณแอมโมเนียที่มากเกินไปจะย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติโดยวัฏจักรไนโตรเจน จะเป็นพิษต่อสัตว์น้ำที่อาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำธรรมชาติ นอกจากนี้ปริมาณแอมโมเนียที่สูงเกินไปยังทำให้เกิดการเจริญเติบโตของวัชพืชมากเกินไปทำให้แหล่งน้ำขาดออกซิเจนส่งผลให้ธรรมชาติขาดความสมดุลและเกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมา

กระบวนการกำจัดไนโตรเจนในระบบบำบัดน้ำเสียประกอบด้วยกระบวนการไนตริฟิเคชันซึ่งเกิดขึ้นก่อนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน และกระบวนการดีไนตริฟิเคชันซึ่งเกิดขึ้นภายหลังภายใต้สภาวะที่ไร้ออกซิเจน ในกระบวนการไนตริฟิเคชันแอมโมเนียออกไซด์ซึ่งแบคทีเรีย (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB) จะออกซิไดซ์ของเสียไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ จากนั้นไนไตรท์ออกไซด์ซึ่งแบคทีเรีย (Nitrite-oxidizing bacteria, NOB) จะออกซิไดซ์ไนไตรท์ไปเป็นไนเตรท หลังจากนั้นแบคทีเรียในกระบวนการดีไนตริฟิเคชันจะรีดิวส์ไนเตรทไปเป็นก๊าซไนโตรเจนปล่อยออกสู่บรรยากาศ ระบบบำบัดน้ำเสียที่ได้รับความนิยมและใช้กันอย่างแพร่หลายในนานาประเทศคือระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง (Activated sludge) ระบบบำบัดแบบนี้มีต้นทุนในการควบคุมระบบต่ำแต่ให้ประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียสูง ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งกระบวนการไนตริฟิเคชันจะเป็นขั้นตอนที่มีผลกับการจำกัดอัตรา (Rate limiting step) และเกิดความล้มเหลวระหว่างการดำเนินระบบ (Nitrification failure) เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวเป็นแบคทีเรียเฉพาะกลุ่มที่มีอัตราการเจริญเติบโตช้ามาก และมีความอ่อนไหวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมสูง ดังนั้นการออกแบบและการควบคุมระบบที่ไม่เหมาะสม อาทิเช่น การออกแบบค่าระยะเวลาเก็บน้ำ (Hydraulic retention time, HRT) และระยะเวลาเก็บตะกอน (Solid residence time, SRT) ที่สั้นเกินไปจะส่งผลให้เกิดการชะ AOB ออกจากระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งใช้เวลานานในการทำให้ AOB กลับมาในระบบได้ดังเดิม โดยเมื่อไม่นานมานี้มีการพบว่าระบบบำบัดน้ำเสียที่ไม่มีเสถียรภาพมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกลุ่มประชากรของจุลชีพในระบบบำบัดน้ำเสีย นั่นๆอย่างมีนัยสำคัญ (LIU Xin-chun et al., 2007)

โดยในช่วงเกือบ 8 ปีที่ผ่านมา ได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคในระดับโมเลกุล (Molecular technique) ในการวิเคราะห์กลุ่มประชากร (Community) จุลชีพที่มีบทบาทสำคัญในระบบสิ่งแวดล้อม ข้อดีของเทคนิคดังกล่าวอยู่ที่การสามารถศึกษาแบคทีเรียในระบบสิ่งแวดล้อมได้โดยตรงโดยไม่จำเป็นต้องทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture-dependent technique) ซึ่งโดยมากแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจะไม่ใช่

แบคทีเรียที่มีอยู่จริงในระบบสิ่งแวดล้อมนั้นๆเนื่องจากเป็นไปได้ยากที่จะจำลองสภาวะระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการให้เหมือนกับสภาวะที่เกิดขึ้นจริงในระบบสิ่งแวดล้อมนั้นๆได้ทุกประการ โดยในช่วง 10 ปีที่ผ่านมางานวิจัยส่วนใหญ่มุ่งเน้นไปที่การศึกษา AOB ซึ่งเชื่อกันว่าเป็นจุลชีพสำคัญในการย่อยสลายแอมโมเนียในวัฏจักรไนโตรเจน อย่างไรก็ตามเมื่อ 6 ปีที่แล้วได้มีการค้นพบว่านอกจากแบคทีเรียแล้ว อาเคียก็เป็นผู้สำคัญตัวหนึ่งในการย่อยสลายแอมโมเนียในวัฏจักรไนโตรเจนด้วย

ในส่วนของ AOB พบว่าในโรงบำบัดน้ำเสียที่แตกต่างกันจะมีกลุ่มประชากร AOB ในระดับสปีชีส์ที่แตกต่างกัน เช่น มีการพบ *Nitrosomonas europare-like* AOB เป็นกลุ่มประชากรหลักในระบบถังปฏิกรณ์แบบแผ่นฟิล์มใช้ในห้องทดลอง (lab-scale biofilm reactor) สำหรับบำบัดน้ำเสียชุมชน (Okabe et al., 1999) ในขณะที่มีการพบ *Nitrosospira-like* หรือ *Nitrosococcus mobilis-like* AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียทดลอง และระบบบำบัดน้ำเสียจริงในประเทศเยอรมัน ตามลำดับ (Schramm et al., 1998; Juretschko et al., 1998) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าลักษณะน้ำเสียและชนิดของระบบที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียมีผลต่อกลุ่มประชากร AOB อีกด้วย ยกตัวอย่างเช่น จะพบ AOB ในกลุ่ม *Nitrosomonas europaea* cluster ในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมที่รับภาระแอมโมเนียสูงๆ และ AOB ในกลุ่ม *Nitrosomonas oligotropha* cluster ในระบบบำบัดที่รับภาระแอมโมเนียต่ำ เช่นในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน สำหรับในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนจะพบ *Nitrosomonas oligotropha* cluster ในระบบบำบัดน้ำเสียทั้งแบบแอนแอโรบิก/แอนน็อกซิก/แอโรบิก, แอนแอโรบิก/แอโรบิก, และแบบตะกอนเร่งแบบปกติ ในขณะที่ *Nitrosomonas communis* cluster จะพบในระบบบำบัดน้ำเสียแบบแอนแอโรบิก/แอนน็อกซิก/แอโรบิกและแอนแอโรบิก/แอโรบิก แต่ไม่พบในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งแบบปกติ (Limpiyakorn et al., 2005) ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษากลุ่มประชากร AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียในงานวิจัยหลายชิ้นแล้วก็ตาม องค์ความรู้เกี่ยวกับกลุ่มประชากรดังกล่าวในระบบบำบัดน้ำเสียยังมีความไม่สมบูรณ์พอที่จะเชื่อมโยงกับลักษณะน้ำเสียและชนิดของระบบและพารามิเตอร์ที่ใช้ในการดำเนินการและการควบคุมระบบ อาทิเช่น HRT, SRT, Dissolved oxygen (DO), pH เป็นต้น เพื่อจะพัฒนาการกำจัดแอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสียที่ยั่งยืนต่อไป

นอกจาก AOB แล้ว เมื่อปี 2004 ได้มีการค้นพบยีนที่มีความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์แอมโมเนียโมโนออกซิเจเนสซึ่งเป็นเอ็นไซม์หลักในการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันในกลุ่มประชากรอาเคียเป็นครั้งแรกของโลก (Venter et al., 2004; Treusch et al., 2005) Konneke et al. (2005) ได้ทำการเพาะเลี้ยงและแยกเชื้อแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งอาเคีย (Ammonia-oxidizing archaea, AOA) ตัวแรกของโลกออกมา ซึ่งสามารถพิสูจน์ได้ว่า AOA มีความสามารถในการทำให้เกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันจริง จากนั้นได้มีรายงานว่า AOA เป็นกลุ่มประชากรที่มีจำนวนมากกว่า AOB ทั้งในมหาสมุทร และในดิน (Wuchter et al., 2006; Leininger et al., 2006) โดยในปี 2006 Park et al. ได้ตีพิมพ์งานวิจัยชิ้นแรกขึ้นยืนยันการมีอยู่จริงของเครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular marker) ของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งยืนยันการมีอยู่ของ

กลุ่มประชากร AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียจริง อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความหลากหลายและโครงสร้างของกลุ่มประชากร AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียแต่อย่างใด

นอกเหนือจากการย่อยสลายของเสียในโตรเจนในรูปแอมโมเนียในน้ำเสียแล้ว AOB ยังมีความสามารถอีกประการหนึ่งในการย่อยสลายสารไมโครโพลลูแตนท์ (Micropollutant) ที่มีความคงทนไม่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ อาทิเช่น สอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ หรือ 17-แอลฟาเอทิลีนเอสโตรไดออล (EE2), ไตรคลอโรเอทิลีน (TCE), ยาฆ่าแมลง (DDT), ปรอท เป็นต้น ไมโครโพลลูแตนท์เป็นสารเคมีที่สามารถมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตได้แม้ในปริมาณที่น้อยมากในระดับนาโนกรัมต่อลิตร โดยสารพวกนี้เมื่อปล่อยลงสู่แหล่งน้ำจะมีผลต่อระบบต่อมไร้ท่อ ระบบพันธุกรรมและวิวัฒนาการของมนุษย์ ยกตัวอย่างเช่น EE2 เป็นสอร์โมนเพศหญิงสังเคราะห์ใช้ในยาคุมกำเนิดโดยพบว่า ปริมาณ EE2 เพียง 1-10 นาโนกรัมต่อลิตรในน้ำมีผลทำให้เกิดการตอบสนองเอสโตรเจน (Estrogenic response) ในปลา (Purdum et al., 1994) ทำให้ปลาตัวผู้มีลักษณะคล้ายปลาตัวเมีย และยังทำลายลักษณะเพศของสัตว์น้ำอื่นๆ อีกด้วย (JEA, 1998; IUPAC, 2003) อย่างไรก็ตามในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งสามารถย่อยสลายเอสโตรเจนดังกล่าวได้ โดยในปี 2000 Vader et al. ได้ทำการทดลองพบว่า EE2 สามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยจุลชีพในกระบวนการไนตริฟิเคชัน ต่อมาในปี 2004 Shi et al. ทำการทดลองยืนยันว่า AOB เป็นจุลชีพสำคัญในการย่อยสลาย EE2 ได้ด้วยกระบวนการโคเมตาบอลิซึม ดังนั้นจะเห็นได้ว่าหากมีการควบคุมระบบบำบัดน้ำเสียให้ AOB และ AOA ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพแล้ว การกำจัดไนโตรเจนและการย่อยสลายสารไมโครโพลลูแตนท์ก็จะมีประสิทธิภาพด้วย

อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยสำคัญชิ้นใดทำการศึกษาของกลุ่มประชากร AOB และ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียจริงในประเทศไทย โดยงานวิจัยชิ้นนี้เป็นการเชื่อมโยงกลุ่มประชากร AOB และ AOA ที่ทำการศึกษาได้โดยใช้เทคนิคในระดับโมเลกุล (การสกัดดีเอ็นเอ การทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดย Polymerase chain reaction (PCR) amplification การแยกโดย Denaturing gel gradient electrophoresis (DGGE) หรือ cloning และการถอดรหัสพันธุกรรม (Sequencing)) กับลักษณะน้ำเสียและชนิดของระบบพารามิเตอร์ในการควบคุมระบบและประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของระบบบำบัด เพื่อวิเคราะห์หาปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมกลุ่มประชากรดังกล่าวที่มีประสิทธิภาพสูงให้อยู่ในระบบ เพื่อการกำจัดแอมโมเนียและสารไมโครโพลลูแตนท์อย่างมีประสิทธิภาพอย่างยั่งยืนต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อศึกษากลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย (AOB) ในระบบบำบัดน้ำเสียจริงในประเทศไทย
- 2) เพื่อศึกษากลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงอาเคีย (AOA) ในระบบบำบัดน้ำเสียจริงในประเทศไทย
- 3) วิเคราะห์ลักษณะน้ำเสียและชนิดของระบบและพารามิเตอร์ที่ใช้ในการควบคุมระบบที่มีผลต่อกลุ่มประชากร AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียจริงในประเทศไทย
- 4) วิเคราะห์ลักษณะน้ำเสียและชนิดของระบบและพารามิเตอร์ที่ใช้ในการควบคุมระบบที่มีผลต่อกลุ่มประชากร AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียจริงในประเทศไทย

2. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ดังกล่าวมาแล้วในข้างต้นมีจุลชีพ 2 กลุ่มอยู่ด้วยกันที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไนตริฟิเคชัน โดย แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย (AOB) และ แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงอาเคีย (AOA) เป็นจุลชีพที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียเป็นไนโตรท จากนั้นไนโตรทจะถูกออกซิไดซ์ต่อเป็นไนเตรทโดย NOB ปัญหาสำคัญในการนำจุลชีพ 2 กลุ่มนี้มาใช้งานคือระยะเวลาในการเริ่มต้นระบบ เนื่องจากจุลชีพ 2 กลุ่มนี้มีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำมาก ในช่วงหลายสิบปีที่ผ่านมา มีงานวิจัยหลายชิ้นทำการศึกษาจุลชีพ 2 กลุ่มนี้ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ อย่างไรก็ตามการศึกษาจุลชีพด้วยวิธีการดังกล่าวมีข้อด้อยที่สำคัญ คือ จุลชีพที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ มักจะไม่ใช่จุลชีพที่มีอยู่จริงในระบบสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ทั้งนี้เนื่องจากเป็นไปได้ยากที่จะจำลองสภาวะระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการให้เหมือนกับสภาวะที่เกิดขึ้นจริงในระบบสิ่งแวดล้อมนั้นๆทุกประการ จุลชีพที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจึงเป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตอย่างเหมาะสมกับสภาวะในการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ด้วยเหตุผลดังกล่าวในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา ได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคในระดับโมเลกุลในการศึกษาจุลชีพในระบบสิ่งแวดล้อมโดยตรงโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งโดยทั่วไปจะทำการศึกษาจุลชีพในระบบสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีการวิเคราะห์ 16S rRNA gene หรือ Functional gene ของจุลชีพกลุ่มที่ต้องการศึกษา ในปัจจุบันมีเทคนิคในการวิเคราะห์ยีนดังกล่าวมากมายตามแต่วัตถุประสงค์ ยกตัวอย่างเช่น การทำ Polymerase chain reaction (PCR) amplification การแยกโดย Denaturing gel gradient electrophoresis (DGGE) หรือ cloning และ การถอดรหัสพันธุกรรม (Sequencing) ซึ่งวิธีการดังกล่าวสามารถวิเคราะห์กลุ่มประชากรแบคทีเรียในเชิงคุณภาพได้ถึงระดับสปีชีส์ (Limpiyakorn et al., 2004; Limpiyakorn et al., 2005; Limpiyakorn et al., 2006(a); Limpiyakorn et al., 2006(b); Limpiyakorn et al., 2007) วิธีการนี้เหมาะสำหรับการศึกษาในกรณีที่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่ามีจุลชีพกลุ่มใดบ้างอยู่ในระบบสิ่งแวดล้อมที่ต้องการศึกษา Fluorescence in situ hybridization (FISH) เป็นเทคนิคที่ช่วยในการวิเคราะห์โครงสร้างกลุ่มประชากรจุลชีพ ซึ่งสามารถบอกได้ทั้งข้อมูลในเชิงคุณภาพและปริมาณ

(Wagner et al., 1995; Mobarry et al., 1996; Kowalchuck et al., 1997; Rotthauwe et al., 1997; Gieseke et al., 2001; Nicolaisen et al., 2002) ในช่วงปีหลังๆ ได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิค PCR ในการนับจำนวนแบคทีเรียในระบบสิ่งแวดล้อม ซึ่งเทคนิคที่ใช้กันมากได้แก่ Competitive PCR และ Real-time PCR (Hermansson et al., 2001; Dionisi et al., 2003; Harms et al., 2003; Limpiyakorn et al., 2006(a))

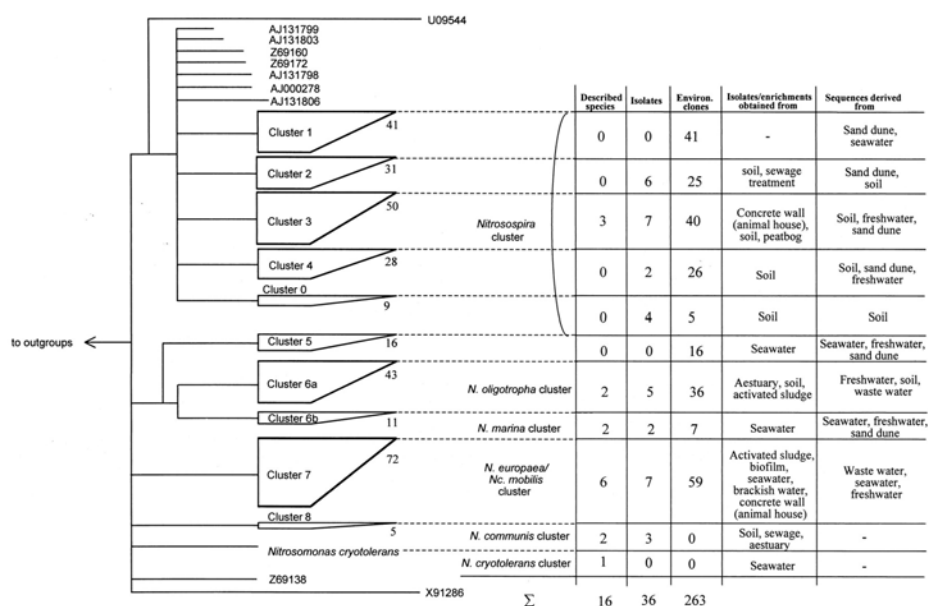
จากการเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมบน 16S rRNA gene และ *amoA* gene ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ AMO ที่มีความสำคัญในการย่อยสลายแอมโมเนีย พบว่า AOB สามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่ม Gamma-proteobacteria และ กลุ่ม Beta-proteobacteria โดยมี AOB เพียงไม่กี่สายพันธุ์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Gamma-proteobacteria อันได้แก่ *Nitrosococcus oceani* ในขณะที่ AOB ส่วนมากจะอยู่ในกลุ่มของ Beta-proteobacteria ซึ่งได้แก่ กลุ่มของ *Nitrosospira* และ *Nitrosomonas* ในพวก *Nitrosospira* จะประกอบไปด้วย AOB จากจีโนม *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* และ *Nitrosovibrio* ซึ่งแต่เดิมจีโนมของ AOB จะถูกแบ่งออกด้วยความแตกต่างของคุณสมบัติทางสรีรวิทยา (Physiological property) ของ AOB แต่ละสปีชีส์ แต่อย่างไรก็ตามหลังจากมีการศึกษาด้าน Phylogeny ของ AOB แต่ละสปีชีส์อย่างละเอียดแล้ว พบว่า วิธีการแบ่ง AOB ตามจีโนมข้างต้นไม่เหมาะสม ดังนั้นในปัจจุบันจึงไม่นิยมการแบ่ง AOB ตามจีโนมอีกต่อไป แต่ได้แบ่ง AOB ออกเป็นสายพันธุ์แทน โดยในกลุ่ม *Nitrosomonas* จะประกอบด้วย 6 สายพันธุ์หลักด้วยกัน ได้แก่ *Nitrosomonas* sp. Nm143, *Nitrosomonas cryotolerans*, *Nitrosomonas europaea* / *Nitrosococcus mobilis*, *Nitrosomonas communis*, *Nitrosomonas marina*, และ *Nitrosomonas oligotropha* ในขณะที่กลุ่ม *Nitrosospira* จะยังไม่ได้มีการแบ่งเป็นสายพันธุ์ที่ชัดเจน

คุณสมบัติทางสรีรวิทยาของ AOB ในแต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกัน แต่ในสายพันธุ์เดียวกันจะเหมือนกัน ซึ่งก็จะไม่เหมือนกันทั้งหมด (Koops and Pommerening – Roser, 2001) (ดังแสดงในภาพที่ 1) สำหรับคุณสมบัติด้านกายภาพที่แตกต่างกันของ AOB ได้แก่ ความเข้มข้นของแอมโมเนียที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ความทนทานต่อแอมโมเนียความเข้มข้นสูง ความทนทานต่อไนโตรเจนความเข้มข้นสูง ความสามารถในการใช้ยูเรียเป็นอาหารแทนแอมโมเนีย ความต้องการเกลือในการเจริญเติบโต ความทนทานต่อเกลือความเข้มข้นสูง และความทนต่อสภาวะที่มีพีเอชต่ำ ซึ่งความแตกต่างเหล่านี้จะมีผลทำให้การกระจายตัวของ AOB แต่ละสายพันธุ์ในสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน ขึ้นกับปัจจัยที่เป็นอยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ (Koops and Pommerening – Roser, 2001) ยกตัวอย่างเช่น ในทะเลจะพบ AOB สายพันธุ์ *Nitrosococcus oceani* และ *Nitrosomonas marina* lineage, ในแหล่งน้ำจืดจะพบ AOB สายพันธุ์ *Nitrosomonas oligotropha* lineage (Koops and Harms, 1985; Stehr et al., 1995a; Koops and Pommerening-Röser, 2001), ส่วนในแหล่งน้ำที่มีแอมโมเนียมากจะพบ AOB สายพันธุ์ *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosomonas eutropha*, และ *Nitrosomonas nitros* (Koops and Pommerening-Roser, 2001), ในดินที่มีค่า pH เป็นกลางโดยเฉพาะอย่างยิ่งดินที่ใช้ในการเพาะปลูกจะพบ AOB สายพันธุ์ *Nitrosomonas*

communis lineage และ *Nitrosolobus multififormis* (MacDonald, 1986; Koops and Pommerening-Röser, 2001), ส่วนในดินที่แห้งแล้งและมีค่า pH ประมาณ 6 จะพบ AOB สายพันธุ์ *Nitrosomonas oligotropha* lineage และ จีไนส์ *Nitrospira* หรือ *Nitrosovibrio* (Koops and Pommerening-Röser, 2001) เป็นต้น ในส่วนของกลุ่มประชากร AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียพบว่าลักษณะน้ำเสียและชนิดของระบบที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียมีผลต่อกลุ่มประชากร AOB อีกด้วย ยกตัวอย่างเช่น จะพบ AOB ในกลุ่ม *Nitrosomonas europaea* cluster ในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมที่รับภาระแอมโมเนียสูงๆ และ AOB ในกลุ่ม *Nitrosomonas oligotropha* cluster ในระบบบำบัดที่รับภาระแอมโมเนียต่ำ เช่นในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน สำหรับในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนจะพบ *Nitrosomonas oligotropha* ในระบบบำบัดน้ำเสียทั้งแบบแอนแอโรบิก/แอนน็อกซิก/แอโรบิก, แอนแอโรบิก/แอโรบิก, และแบบตะกอนเร่งแบบปกติ ในขณะที่ *Nitrosomonas communis* จะพบในระบบบำบัดน้ำเสียแบบแอนแอโรบิก/แอนน็อกซิก/แอโรบิกและแอนแอโรบิก/แอโรบิก แต่ไม่พบในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งแบบปกติ (Limpiyakorn et al., 2005)

นอกจาก AOB แล้วเมื่อปี 2004 ได้มีการค้นพบยีนที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์แอมโมเนียโมโนออกซิจีเนส (*amoA* gene) ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันในกลุ่มประชากรอาศัยเป็นครั้งแรกของโลก (Venter et al., 2004; Treusch et al., 2005) ในปี 2005 ได้มีการเพาะเลี้ยงและแยก AOA ออกมาได้เป็นครั้งแรกของโลก คือ *Nitrosopumilus maritimus* ซึ่งเจริญเติบโตโดยใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งให้พลังงานเพียงอย่างเดียว อีกทั้งยังมีอัตราการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงใกล้เคียง AOB และสามารถแอมพลิฟาย *amoA* gene ได้ครบทั้ง 3 หน่วยซึ่งเป็นการพิสูจน์ได้ว่า AOA มีความสามารถในการทำให้เกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันได้จริง (Konneke et al., 2005) ถึงแม้ว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงจุลชีพจะมีมานานแล้ว แต่ไม่เคยมีรายงานการเพาะเลี้ยง AOA ได้มาก่อน เป็นเพราะอาศัยต้องการวิตามินและธาตุอาหารรอง นอกเหนือจากสารอาหารปกติที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั่วไป (Konneke et al., 2005) มีหลักฐานทางโมเลกุล (Molecular marker) โดยการออกแบบไพรเมอร์ (Primer) ที่มีความจำเพาะกับ *amoA* gene ของอาศัย แสดงให้เห็นว่ามีการกระจายตัวของ AOA ไปทั่วบริเวณที่มีการเกิดวัฏจักรไนโตรเจนที่มีความสำคัญในมหาสมุทร อีกทั้งยังพบว่าความหลากหลายของกลุ่มประชากร AOA ในน้ำและตะกอนดินในมหาสมุทรขึ้นกับถิ่นที่อยู่และจุดเก็บตัวอย่าง (Francis et al., 2005) มีหลักฐาน 2 ชิ้นสำคัญแสดงให้เห็นว่ามี AOA มากกว่า AOB ในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ กล่าวคือ Wuchter et al., (2006) แสดงให้เห็นว่าในทะเลเหนือและมหาสมุทรแปซิฟิกมีปริมาณ *amoA* gene ของอาศัยมากกว่าแบคทีเรียประมาณ 10-1000 เท่า ทำให้เห็นว่าอาศัยน่าจะมีความสำคัญในวัฏจักรไนโตรเจน นอกจากนี้ Leininger et al. (2006) ทำการทดลองพบว่าปริมาณ *amoA* gene ของอาศัยมากกว่าแบคทีเรียถึงกว่า 3000 เท่าในดิน และตั้งสมมุติฐานว่า AOA อาจจะเป็นแอมโมเนียออกซิไดซ์เซอร์ที่มีมากที่สุดในระบบนิเวศดิน โดยในปี 2006 Park et al. ได้ตีพิมพ์งานวิจัยชิ้นแรกยืนยันการมีอยู่จริงของเครื่องหมายทางโมเลกุลของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งยืนยันการมีอยู่ของกลุ่มประชากร AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียจริง ผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจพบการ

มีอยู่ของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีการควบคุมแบบ aerated-anoxic process เช่น ระบบบำบัดแบบตะกอนเร่งที่สามารถกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสได้ Activated sludge process with vertical loop reactor ซึ่งเป็นระบบที่ถูกควบคุมให้มีค่า DO ต่ำ (น้อยกว่า 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ ระบบบำบัดน้ำเสียที่ถูกออกแบบให้มี ระยะเวลาพักเก็บน้ำ (Hydraulic retention time, HRT) และ ระยะเวลาพักเก็บตะกอน (Solid residence time, SRT) ยาวนาน (HRT มากกว่า 24 ชั่วโมง และ SRT มากกว่า 15 วัน) จึงมีความเป็นไปได้ว่าการควบคุมระบบให้มีระดับความเข้มข้นออกซิเจนละลาย (DO) ต่ำ และ HRT และ SRT ยาวนานจะช่วยให้ AOA เจริญเติบโตง่ายขึ้น อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ไม่ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความหลากหลายและโครงสร้างของกลุ่มประชากร AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียแต่อย่างใด เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเพียงชิ้นเดียวในขณะนี้ที่แสดงถึงการมีอยู่ของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียจริง อีกทั้งยังขาดองค์ความรู้พื้นฐานทางด้านสรีรวิทยา ชีววิทยา และชีวเคมี ของ AOA เพื่อจะนำมาเชื่อมโยงกับบทบาทและอัตราการย่อยสลายไนโตรเจน



ภาพที่ 1 Schematic 16S rRNA-based phylogenetic classification of the beta-subclass AOB (Purkhald et al., 2000)

3. ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษากลุ่มประชากร แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งแบคทีเรีย (AOB) และ แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งอาศัย (AOA) ในระบบบำบัดน้ำเสียจริงในประเทศไทย (เน้นระบบบำบัดน้ำเสียของกรุงเทพมหานคร)

2. ใช้เทคนิคในระดับโมเลกุล (Molecular technique) ในการวิเคราะห์กลุ่มประชากร AOB และ AOA ในระดับสปีชีส์ โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ (Primer) ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับกลุ่มประชากร AOB และ AOA

4. ระเบียบวิธีการวิจัย

4.1 การศึกษาและรวบรวมข้อมูลเพื่อคัดเลือกระบบบำบัดน้ำเสียที่จะใช้ในการศึกษากลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งแบคทีเรียและอาศัย

เนื่องจากคุณสมบัติด้านสรีรวิทยาของ AOB แต่ละสปีชีส์มีความแตกต่างกัน การกระจายตัวของประชากรของ AOB ในแต่ละระบบจึงแตกต่างกัน มีรายงานว่าลักษณะน้ำเสียและชนิดของระบบที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียมีผลต่อกลุ่มประชากร AOB โดยเฉพาะอย่างยิ่งความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเข้าระบบบำบัดมีผลต่อการคัดเลือกกลุ่มประชากร AOB ที่มีอยู่ในระบบ นอกจากนี้การออกแบบค่าระยะเวลาเก็บน้ำ (Hydraulic retention time, HRT) และ ระยะเวลาตกเก็บตะกอน (Solid residence time, SRT) ก็เป็นปัจจัยสำคัญต่อการมีอยู่ของกลุ่มประชากร AOB กล่าวคือ HRT และ SRT ที่สั้นเกินไปจะส่งผลให้เกิดการชะ AOB ออกจากระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งใช้เวลานานในการทำให้ AOB กลับมาในระบบได้ดังเดิม ดังนั้นหลักเกณฑ์ในการคัดเลือกระบบบำบัดน้ำเสียเพื่อมาทำการศึกษา คือ ลักษณะน้ำเสียที่เข้าและออกระบบองค์ประกอบของระบบและการควบคุมระบบที่แตกต่างกัน ซึ่งข้อมูลดังกล่าวของระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนภายใต้การควบคุมของกรุงเทพมหานครสามารถสืบค้นได้ทางอินเทอร์เน็ต (<http://dds.bangkok.go.th>)

4.2 ตัวอย่างของระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน

ระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ ระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนขนาดเล็ก และระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนขนาดใหญ่ โดยระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนขนาดเล็กถูกสร้างขึ้นภายใต้ข้อจำกัดทางด้านงบประมาณเพื่อเร่งแก้ไขปัญหาน้ำเสียเฉพาะจุดในระยะเวลาอันสั้น ประกอบด้วยโรงงานปรับปรุงคุณภาพน้ำขนาดเล็กที่ได้รับโอนจากการเคหะแห่งชาติ จำนวน 12 แห่ง ได้แก่

1. โรงควบคุมคุณภาพน้ำห้วยขวาง
2. โรงควบคุมคุณภาพน้ำบางนา
3. โรงควบคุมคุณภาพน้ำคลองจั่น
4. โรงควบคุมคุณภาพน้ำรามอินทรา
5. โรงควบคุมคุณภาพน้ำทุ่งสองห้อง 1

6. โรงควบคุมคุณภาพน้ำทุ่งสองห้อง 2
7. โรงควบคุมคุณภาพน้ำหัวหมาก
8. โรงควบคุมคุณภาพน้ำท่าทราย
9. โรงควบคุมคุณภาพน้ำคลองเตย
10. โรงควบคุมคุณภาพน้ำร่มเกล้า
11. โรงควบคุมคุณภาพน้ำบางบัว
12. โรงควบคุมคุณภาพน้ำบ่อนไก่

ส่วนระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนขนาดใหญ่ถูกสร้างขึ้น โดยใช้แผนหลักการบำบัดน้ำเสียของกรุงเทพมหานครเป็นแนวทางในการวางแผนปฏิบัติ โดยประยุกต์ให้เหมาะสมกับพื้นที่ที่เอื้ออำนวยให้มีการก่อสร้าง โดยจะรวบรวมน้ำเสียจากชุมชนเข้าสู่โรงบำบัดน้ำเสียก่อนปล่อยลงสู่คูคลอง และแม่น้ำเจ้าพระยา ในปัจจุบันกรุงเทพมหานครได้ดำเนินโครงการก่อสร้างระบบบำบัดน้ำเสียรวมทั้งสิ้นจำนวน 7 พื้นที่ 6 โครงการ ครอบคลุมพื้นที่รวม 191.7 ตารางกิโลเมตร สามารถบำบัดน้ำเสียโดยรวมได้ทั้งสิ้นประมาณ 992,000 ลูกบาศก์เมตรต่อวัน ได้แก่

1. โรงควบคุมคุณภาพน้ำสี่พระยา
2. โรงควบคุมคุณภาพน้ำรัตนโกสินทร์
3. โรงควบคุมคุณภาพน้ำดินแดง
4. โรงควบคุมคุณภาพน้ำช่องนนทรี
5. โรงควบคุมคุณภาพน้ำหนองแขม
6. โรงควบคุมคุณภาพน้ำทุ่งครุ
7. โรงควบคุมคุณภาพน้ำจตุจักร

หลังจากการเก็บรวบรวมข้อมูลเบื้องต้นเพื่อทำการคัดเลือกระบบบำบัดน้ำเสียที่ครอบคลุมพารามิเตอร์ที่มีผลต่อการมีอยู่ของกลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซ์เซอร์ตามหลักเกณฑ์ข้างต้น จึงได้ทำการเลือกระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนขนาดใหญ่ 5 แห่ง และขนาดเล็ก 4 แห่งเพื่อเก็บตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 พารามิเตอร์ในการควบคุมระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนภายใต้การควบคุมของกรุงเทพมหานคร

WWTP	Treatment Process	Design Flow (m ³ /d)	Actual flow (m ³ /d)	BOD in influent (mg/l)	BOD in effluent (mg/l)	NH ₃ in influent (mg/l)	NH ₃ in effluent (mg/l)	% NH ₃ removal	DO in effluent (mg/l)
LM1 ^b	CASS	200,000	124,282	35.20	6.6	8.75	1.41	83.89	6.33
LM2 ^b	Two stage AS	40,000	28,107	57.99	13.76	6.53	2.90	55.59	5.94
LM3 ^b	VLR	157,000	124,423	32.43	3.84	7.08	0.43	93.93	6.24
LM4 ^b	Contact stabilization AS	30,000	20,961	54.22	5.35	NA	NA	NA	3.27
LM5 ^b	AS with nutrients	350,000	197,595.12	31.65	3.69	10.53	0.22	97.91	6.91
SM1 ^b	septic & AS	800	600	116.82	5.50	NA	NA	NA	3.50
SM2 ^b	AS แบบ oxidation ditch	1,300	1,156	164.55	6.45	NA	NA	NA	3.08
SM3 ^b	Completely mixed AS	1,200	1,200	175.45	7.82	NA	NA	NA	2.92
SM4 ^b	Aerated lagoon	1,500	1,188	69.82	10.64	NA	NA	NA	1.35

AS, activated sludge process; NA, data not available

LM, ระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนขนาดใหญ่; SM, ระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนขนาดเล็ก

^bค่าเฉลี่ยในปี 2550 (<http://dds.bma.go.th>)

4.3 วิธีการวิเคราะห์

4.3.1 วิธีการวิเคราะห์ปัจจัยสิ่งแวดล้อม

4.3.1.1 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของแอมโมเนีย

ใช้ตัวอย่างที่ผ่านการเตรียม ปริมาตร 1 มล. เติมน้ำละลายฟีนอล 40 ไมโครลิตร ตามด้วย Sodium nitroprusside 40 ไมโครลิตร และสารOxidizing reagent 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ ทำการหมุนเหวี่ยงเพื่อให้สารผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 60 นาที แล้วนำมาตรวจวัดด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร (Strickland และคณะ, 1972)

4.3.1.2 วิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนไตรท

ใช้ตัวอย่างที่ผ่านการสกัด ปริมาตร 1 มล. เติมน้ำละลาย sulfanilamide 20 ไมโครลิตร ตามด้วยสารละลาย NED 20 ไมโครลิตร ทำการหมุนเหวี่ยงให้สารผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสีนาน 30 นาที แล้วนำมาตรวจวัดด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร (Strickland และคณะ, 1972)

4.3.1.3 วิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนเตรท

นำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดปริมาตร 1 มล. เติมน้ำละลายไฮโดรคลอริก 1 นอร์มัล เพื่อกำจัดสารรบกวนพวกไฮดรอกไซด์ หรือเติมคาร์บอนेटที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 1000 มก. ต่อลิตรแคลเซียมคาร์บอนेटต่อลิตร ตรวจวัดด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร และ 275 นาโนเมตร

4.3.2 การวิเคราะห์กลุ่มประชากร AOB และ AOA ในตัวอย่างตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย โดยใช้เทคนิคในระดับโมเลกุล

4.3.2.1 การรวบรวมลำดับพันธุกรรมของ AOB อ้างอิง และที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียจากงานวิจัยในอดีตเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ (Primer) ที่เหมาะสมสำหรับกลุ่มประชากร AOB

ในการศึกษากลุ่มประชากรของแบคทีเรียกลุ่ม AOB สามารถใช้ได้ทั้ง 16S rRNA gene และ *amoA* gene (ซึ่งเป็น functional gene ในการผลิตเอนไซม์ ammonia monooxygenase ที่ใช้ในการย่อยสลายแอมโมเนีย) จากนั้นทดสอบการครอบคลุมของไพรเมอร์ที่เลือกกับ AOB อ้างอิง และที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียจากงานวิจัยในอดีตโดยใช้โปรแกรม ARB program package สำหรับ 16S rRNA gene ไพรเมอร์ที่ดีที่สุดคือ CTO 189 A/Bf คู่กับ CTO 654r ส่วน *amoA* gene นั้นเป็นไพรเมอร์ *amoA* 1F คู่กับ *amoA* 2R ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Nucleotide sequence ของไพรเมอร์สำหรับ 16s RNA gene และ *amoA* gene ของ AOB

	Target gene	Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Reference
AOB	16s RNA gene	CTO 189A/Bf	GGAGRAAAGCAGGGGATCG	Kowalchuck <i>et al.</i> , 1997)
		CTO 189Cf	GGAGGAAAGTAGGGGATCG	Kowalchuck <i>et al.</i> , 1997)
		CTO 654r	CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC	Kowalchuck <i>et al.</i> , 1997)
	<i>amoA</i> gene	amoA 1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	Rotthauwe <i>et al.</i> , 1997
		amoA 2R	CCCCTCTGCAAAGCCTTCTTC	Rotthauwe <i>et al.</i> , 1997
AOA	<i>amoA</i> gene	Arch-amoAF	STAATGGTCTGGCTTAGACG	Francis <i>et al.</i> , 2005
		Arch-amoAR	GCGGCCATCCATCTGTATGT	Francis <i>et al.</i> , 2005

4.3.2.2 การรวบรวมลำดับพันธุกรรมของ AOA อ้างอิง เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ (Primer) ที่เหมาะสมสำหรับกลุ่มประชากร AOA

การศึกษากลุ่มประชากร AOA เลือกศึกษาโดยใช้ยีน *amoA* gene (ซึ่งเป็น functional gene ในการผลิตเอนไซม์ ammonia monooxygenase ที่ใช้ในการย่อยสลายแอมโมเนีย) จากทดสอบความครอบคลุมของไพรเมอร์ Arch-amoAF และ Arch-amoAR พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวมีความจำเพาะและครอบคลุมกับประชากร AOA โดยรายละเอียดของไพรเมอร์ดังกล่าวแสดงในตารางที่ 2

4.3.2.3 การวิเคราะห์กลุ่มประชากร AOB และ AOA ในตัวอย่างตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย โดยใช้เทคนิคในระดับโมเลกุล

การสกัด DNA

นำสัลดจ์ 0.5 g มาทำการสกัด ด้วย Fast-DNA SPIN kits for soil (QGiogene, Ohio, USA) ตามขั้นตอนในคู่มือการใช้งาน หลังจากนั้นทำการตรวจสอบ DNA ด้วยเครื่อง electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel (Bio-Rad, Spain) แล้วจึงนำ DNA ที่สกัดได้ไปทำการทำบริสุทธิ์ (purification) DNA โดยใช้ชุดทดลอง และการทำการเจือจาง (dilution) DNA ต่อไป

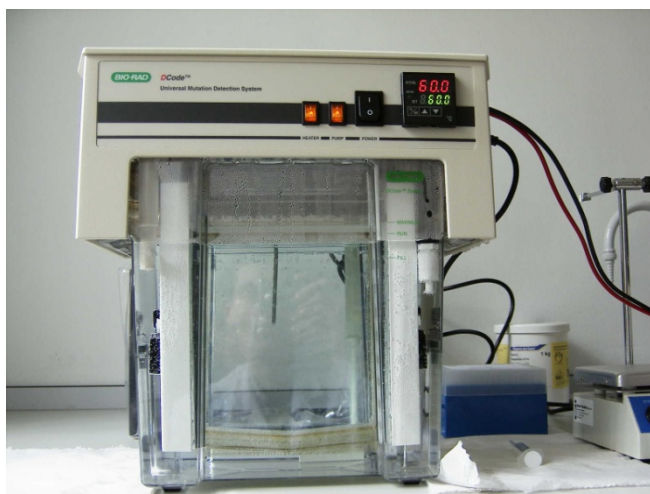
Polymerase Chain Reaction

ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ซึ่งในการศึกษากลุ่มประชากรของแบคทีเรียกลุ่ม AOB โดยใช้ไพรเมอร์ CTO189F-GC คู่กับ CTO654R (สำหรับการทำ DGGE) และ CTO189F คู่กับ CTO654R (สำหรับการทำ PCR ปกติ) และใช้ไพรเมอร์ Arch-amoAF และ Arch-amoAR เพื่อศึกษากลุ่มประชากร AOA สำหรับส่วนผสมต่อ 1 reaction ของไพรเมอร์ทั้งสาม (CTO189F+CTO654R CTO189F+CTO654R และ Arch-

amoAF+ Arch-amoAR) ในปริมาณทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย น้ำปราศจากDNA 21.375 ไมโครลิตร 10x PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร dNTP 0.5 ไมโครลิตร forward primer 2.5 ไมโครลิตร reverse primer 2.5 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase 0.25 ไมโครลิตร และ template DNA 1 ไมโครลิตร

Denaturing Gel Gradient Electrophoresis (สำหรับการศึกษากลุ่มประชากร AOB)

หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำการแยก DNA ด้วยเครื่อง DGGE ที่ความเข้มข้นเจล 30-60% 75 volt นาน 16 ชั่วโมง แล้วจึงนำเจลที่ได้ไปย้อมด้วย Ethidium bromide และส่องดูภายใต้แสง UV จากนั้นทำการตัดแถบ DNA ที่ได้ใส่ใน น้ำปราศจาก DNA แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วทำการ purification ก่อนนำไปทำ PCR เพื่อการทำ sequencing



ภาพที่ 2 เครื่อง Thermo cycler สำหรับ polymerase chain reaction และ เครื่อง denaturing gradient gel electrophoresis

Cloning (สำหรับการศึกษากลุ่มประชากร AOA)

หลังจากนั้นนำ PCR product (เพื่อศึกษากลุ่มประชากร AOA) เลือกใช้ pGEM-T Easy Vector System I kit (Promega, USA) และ XL1-Blue competent cells (Stratagene, USA) โดยสุ่ม 20-30 โคลโลนี /1 ตัวอย่าง

Sequencing

ส่งตัวอย่าง DNA ที่ได้ ไปทำการวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลี

5. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

5.1 ผลการวิเคราะห์ปัจจัยสิ่งแวดล้อม

ผลการวิเคราะห์ปัจจัยสิ่งแวดล้อม ได้แก่ MLSS ของตะกอนในถังบำบัดไนโตรเจนและความเข้มข้นแอมโมเนีย ในไทรท และไนเตรทในน้ำเข้าและน้ำออกจากระบบบำบัดน้ำเสียและถังบำบัดไนโตรเจน ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ค่า MLSS ของตะกอนในถังบำบัดไนโตรเจนและความเข้มข้นแอมโมเนีย, ไนไตรท์, และไนเตรทในน้ำเข้าและน้ำออกจากระบบบำบัดน้ำเสียและถังบำบัดไนโตรเจน

WWTP	Treatment process	Flow (m ³ /d)	ammonia (mg-N/l)		nitrite (mg-N/l)		nitrate (mg-N/l)		BOD (mg/l)		COD (mg/l)		DO (mg/l)	MLSS (mg/l)	HRT (hr)	SRT (day)
			Inf.	Eff.	Inf.	Eff.	Inf.	Eff.	Inf.	Eff.	Inf.	Eff.	Eff.			
LM1	CASS	102,132.61	8.12	4.22	0.02	0.33	0.81	3.95	27.31	7.04	63.1	21.68	6.5	12,067	4	10
LM2	Two stage AS	27,634	5.54	5.05	0.03	0.18	0.79	1.80	49.16	12.47	85.63	45.38	5.74	NA	2.17	22
LM3	VLR	133,986	5.74	7.30x10 ⁻³	ND	0.03	0.78	7.23	27.07	3.21	NA	NA	6.12	7,960	4.27	11.04
LM4	Contact stabilization AS	16,596	0.03	0.06	0.08	ND	3.56	12.32	57.42	5.45	106.85	19.42	NA	5,006	63.60	30
LM5	AS with nutrients	171,237	9.81	0.19	0.11	12.3	0.02	0.03	30.06	3.07	NA	NA	6.80	3,933	6.5	34
SM1	septic & AS	600	13.87	2.35x10 ⁻³	0.01	0.02	2.27	18.15	102	2	433	20	NA	6,790	43.20	21
SM2	AS แบบ oxidation ditch	1,195	21.13	0.49	0.03	0.07	0.61	24.09	117	60	287	18	3.2	2,100	2.2	15
SM3	Completely mixed AS	1,000	33.06	14.99	0.01	ND	2.74	0.73	84	5	174	18	3.1	2,520	11.27	12
SM4	Aerated lagoon	1,442	5.68	4.53	ND	0.23	0.94	1.33	75	5	185	15	1.58	105	67.24	> 1year

ND, not detected; NA, data not available

AS, activated sludge process; HRT, hydraulic retention time; SRT, solid retention time; MLSS, mixed liquor suspended solid

LM, ระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนขนาดใหญ่; SM, ระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนขนาดเล็ก

5.2 การบ่งชี้รหัสพันธุกรรมที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย

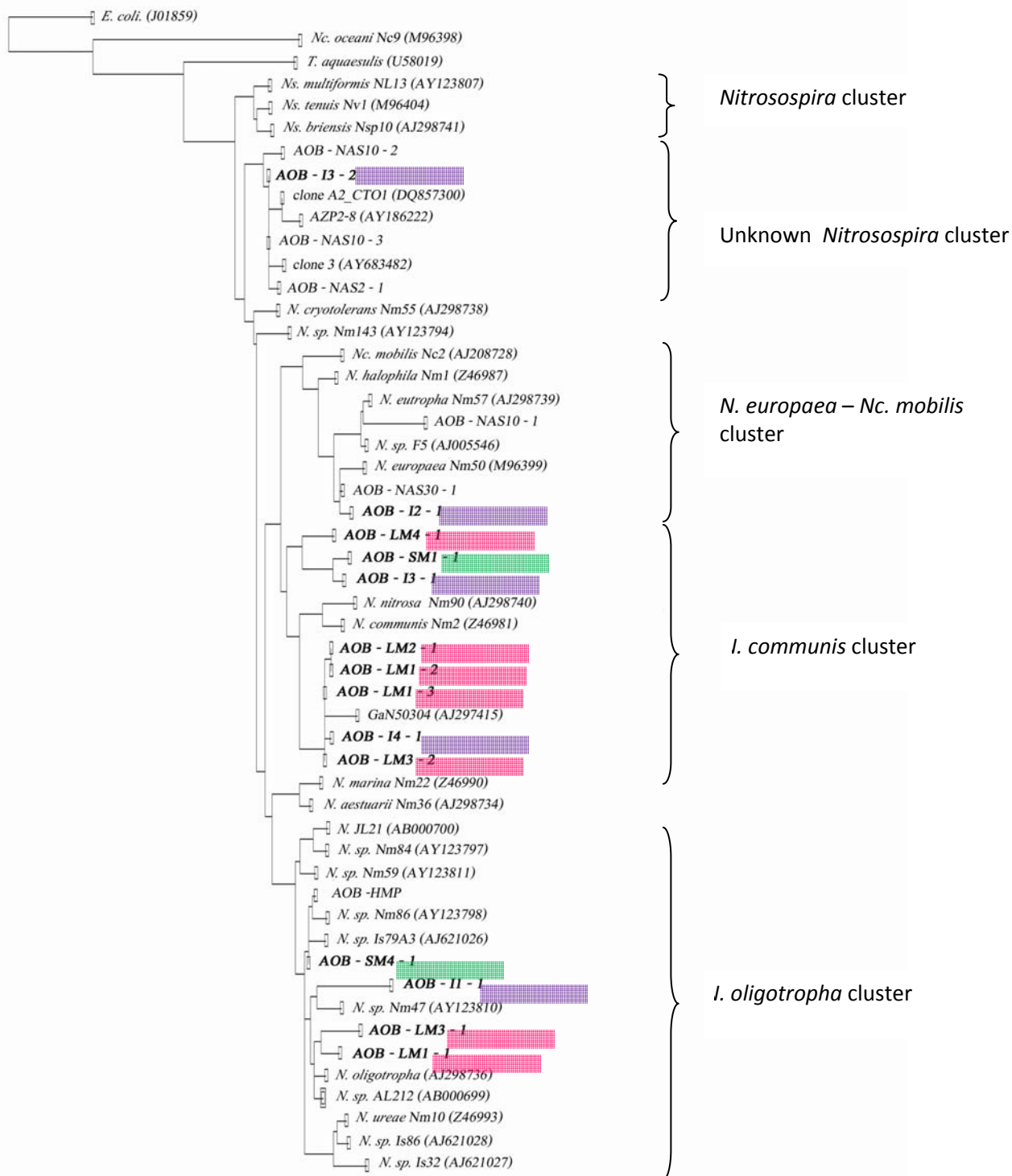
5.2.1 กลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียจากระบบบำบัดน้ำเสีย

การศึกษาของกลุ่มประชากร AOB ในตัวอย่างตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียใช้วิธี PCR amplification-DGGE-sequencing ได้แบน DGGE ทั้งหมด 14 แบน หลังจากนั้นนำรหัสพันธุกรรมที่ได้จากการจากการถอดรหัสพันธุกรรมมาทำการวิเคราะห์ Homology Search ด้วยโปรแกรม Blast ดังแสดงในตารางที่ 5 ผลจากการทำ Homology Search พบว่ารหัสพันธุกรรมที่ได้มีความใกล้เคียงกับรหัสพันธุกรรมของกลุ่มประชากร AOB ในระบบฐานข้อมูล ซึ่งแสดงว่าไพรเมอร์นี้มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว โดยมีความใกล้เคียงกับกลุ่มประชากร AOB ในฐานข้อมูลในช่วง 95-100%

ตารางที่ 4 ความเหมือนของรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างจากแต่ละระบบบำบัดน้ำเสียและฐานข้อมูล

Sample	Band	Sscore	Percent Identity	Gap	Accession No. of closely related sequence	closely related sequence
I1	AOB-I1-1	619	2/383 (0%)	367/383 (95%)	AY123811	<i>Nitrosomonas</i> sp. Nm59
I2	AOB-I2-1	667	0/364 (0%)	363/364 (99%)	AL954747	<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718
I3	AOB-I3-1	662	0/364 (0%)	362/364 (99%),	AB176858	DGGE A-W-3
	AOB-I3-2	699	0/378 (0%)	378/378 (100%),	FM997803	Clone LEQUIA_R0CTO43
I4	AOB-I4-1	397	2/215 (0%)	212/215 (98%)	AJ297415	Clone GaN50304
LM1	AOB-LM1-1	787	1/443 (0%)	436/443 (98%)	AB222811	DGGE ONO2c-3
	AOB-LM1-2	806	0/444 (0%)	441/444 (99%)	AJ297415	Clone GaN50304
	AOB-LM1-3	811	0/442 (0%)	441/442 (99%)	AJ297415	Clone GaN50304
LM2	AOB-LM2-1	623	3/357 (0%)	351/357 (98%)	EU224365	Clone 9R-27
LM3	AOB-LM3-1	577	2/349 (0%)	337/349 (96%)	EF016119	<i>Nitrosomonas oligotropha</i>
	AOB-LM3-2	401	2/227 (0%)	224/227 (98%)	AJ297415	Clone GaN50304
LM4	AOB-LM4-1	577	2/349 (0%)	337/349 (96%),	AB176858	DGGE A-W-3
SM1	AOB-SM1-1	630	0/347 (0%)	345/347 (99%)	AB176858	DGGE A-W-3
SM4	AOB-SM2-1	462	1/263 (0%)	259/263 (98%)	FM997808	Clone LEQUIA_R0CTO49

หลังจากนั้นนำรหัสพันธุกรรมที่ได้พร้อมกับรหัสพันธุกรรมของ AOB ที่เคยพบในอดีตมาสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธีการคำนวณสามแบบ (Distance matrix, Maximum Parsimony และ Maximum Likelihood) เพื่อเปรียบเทียบกัน พบว่าการจัดกลุ่ม AOB จาก Phylogenetic tree ที่ได้จากวิธีการคำนวณทั้งสามแบบให้ผลการจัดกลุ่มเหมือนกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ารหัสพันธุกรรมที่ทำการวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือ และไม่ว่าจะใช้วิธีการคำนวณแบบใดก็ให้ผลเหมือนกัน จากภาพที่ 3 แสดง phylogenetic tree สร้างโดยเพิ่มรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียทั้งหมด (ความยาวประมาณ 400 bp) โดยใช้วิธี parsimony method ลงใน phylogenetic ที่สร้างมาจาก รหัสพันธุกรรมของ AOB ทั้งหมด (ที่มีความยาวมากกว่า 1000 bp) โดยใช้วิธี neighbor joining (distance matrix) และสรุปการกระจายตัวของกลุ่มประชากร AOB ในแต่ละระบบบำบัดน้ำเสีย ดังแสดงในตารางที่ 5



ภาพที่ 3 Phylogenetic tree สร้างโดยเพิ่มรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างจากระบบบำบัดน้ำเสียทั้งหมด (ความยาวประมาณ 400 bp) โดยใช้วิธี parsimony method ลงใน phylogenetic ที่สร้างมาจาก รหัสพันธุกรรมของ AOB ทั้งหมด (ที่มีความยาวมากกว่า 1000 bp) โดยใช้วิธี neighbor joining (distance matrix)

ตารางที่ 5 สรุปการกระจายตัวของกลุ่ม AOB ในแต่ละตัวอย่างระบบบำบัดน้ำเสีย

AOB Cluster	I1	I2	I3	I4	LM1	LM2	LM3	LM4	SM1	SM4
<i>Nitrosospira</i> cluster										
unknown <i>Nitrosomonas</i> cluster			✓							
<i>Nitrosomonas cryototerans</i> cluster										
<i>Nitrosomonas europaea-Nitrosococcus mobilis</i> cluster		✓								
<i>Nitrosomonas communis</i> cluster			✓	✓	✓✓	✓	✓	✓	✓	
<i>Nitrosomonas marina</i> cluster										
<i>Nitrosomonas oligotropha</i> cluster	✓				✓		✓			✓

✓ จำนวน band จากแต่ละตัวอย่างที่พบในแต่ละกลุ่ม

จากตารางที่ 6 พบว่าตัวอย่างตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมมีการกระจายตัวของกลุ่มประชากร AOB มากกว่าตัวอย่างจากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน คือ ในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรม (I1 - I4) มีการกระจายตัวของกลุ่มประชากร AOB ใน 4 กลุ่ม คือ *Nitrosomonas* cluster, *N. europaea-Nc. mobilis* cluster, *N. communis* cluster และ *N. oligotropha* cluster ในขณะที่ระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนมีการกระจายตัวของกลุ่มประชากรดังกล่าวใน 2 กลุ่มคือ *N. communis* cluster และ *N. oligotropha* cluster

เนื่องจากน้ำเสียจากทั้งสองระบบมีลักษณะสมบัติแตกต่างกัน คือระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมมีค่า BOD และปริมาณแอมโมเนียสูงกว่าระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน คือในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมมีค่า BOD ประมาณ 192-1400 มิลลิกรัมต่อลิตรและปริมาณแอมโมเนียอยู่ในช่วง 13 – 420 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนมีค่า BOD ประมาณ 27 – 102 มิลลิกรัมต่อลิตรและปริมาณแอมโมเนียอยู่ในช่วง 5 – 14 มิลลิกรัมต่อลิตร จากลักษณะสมบัติของน้ำเสียจากระบบทั้งสอง จะเห็นได้ว่าปัจจัยที่น่าจะมีผลต่อการกระจายตัวของกลุ่มประชากร AOB ได้แก่ ปริมาณแอมโมเนีย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Suwa *et al.*, 1994; Stehr *et al.*, 1995a; Koops และ Pommerening-Roser, 2001.

ในการทดลองนี้พบว่า ระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมรับน้ำเสียที่มีปริมาณแอมโมเนียสูงประมาณ 400 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ได้แก่ I2 พบว่ามีการกระจายตัวของ AOB ในสองกลุ่ม คือ *Nitrosococcus mobilis* และ *Nitrosomonas europaea* ซึ่ง AOB กลุ่ม *Nitrosococcus mobilis* สามารถเจริญเติบโตในสภาวะแวดล้อมที่มีแอมโมเนียสูง (ประมาณ 50–100 ไมโครโมลาร์) พบ AOB กลุ่มนี้ได้ในพื้นที่สิ่งแวดล้อมที่สามารถเกิดกระบวนการยูโทรฟิเคชันได้อย่างดี เช่นในบึง (Koops *et al.*, 2003) ในขณะที่ AOB กลุ่ม *Nitrosomonas europaea* นั้น พบได้โดยทั่วไปในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน ซึ่งรับน้ำเสียที่มีปริมาณแอมโมเนียสูง (Limpiyakorn *et al.*, 2007) ในตัวอย่างจากระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรม I3 และ I4 รับน้ำเสียที่มีปริมาณแอมโมเนียปานกลาง (ประมาณ 30–70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) พบว่ามี

การกระจายตัวของ AOB ในสองกลุ่มได้แก่ unknown *Nitrosomonas* cluster และ *N. communis* cluster เนื่องจากว่าในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษา AOB กลุ่ม unknown *Nitrosomonas* cluster จาก pure culture ทำให้ข้อมูลส่วนนี้ยังถูกจำกัด แต่พบว่าตำแหน่งของ AOB กลุ่มนี้นั้นบนแผ่นเจลที่ได้จากการทำ DGGE มีตำแหน่งเดียวกับตัวอย่างตะกอนจากระบบตะกอนเร่งและแผ่นฟิล์มชีวภาพในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ ซึ่งจากตัวอย่างทั้งสองเป็นตัวอย่างที่มีปริมาณแอมโมเนียปานกลาง ซึ่งอาจจะกล่าวได้ว่า AOB กลุ่มนี้สามารถเจริญเติบโตในสภาวะแวดล้อมที่มีแอมโมเนียปานกลาง เช่นเดียวกับ กลุ่ม *N. communis* สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีปริมาณแอมโมเนีย ประมาณ 14 – 43 ไมโครโมลาร์ พบแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ดิน ตะกอนเร่งและระบบแผ่นฟิล์มชีวภาพ (Purkhold *et al.*, 2000; Gieseke *et al.*, 2001) ในขณะที่ตัวอย่างจากระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรม II รับน้ำเสียที่มีปริมาณแอมโมเนียต่ำ ประมาณ 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร พบ AOB กลุ่ม *N. oligotropha* ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตในสภาวะแวดล้อมที่มีแอมโมเนียต่ำ (1.9 – 4.2 ไมโครโมลาร์) พบได้ในแหล่งน้ำจืด ดินที่ยังไม่มีการใส่ปุ๋ย ระบบบำบัดน้ำเสียซึ่งรับน้ำเสียที่มีปริมาณแอมโมเนียต่ำ (Koops and Pommerening-Roser 2001; Limpiyakorn *et al.*, 2005) ส่วนในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน (LM1-4 SM1 และ SM4) รับน้ำเสียที่มีปริมาณแอมโมเนียน้อย ประมาณ 5-13 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร พบการกระจายของ AOB กลุ่ม *N. communis* และ *N. oligotropha* ซึ่งเป็นกลุ่มที่พบโดยทั่วไปในระบบบำบัดน้ำเสียที่รับน้ำเสียที่มีปริมาณแอมโมเนียต่ำๆ (Limpiyakorn *et al.*, 2007; Siripong and Rittmann 2007) โดยพบการกระจายตัวของกลุ่ม *N. communis* จากตัวอย่าง 5 ตัวอย่างจากทั้งหมด 6 ตัวอย่าง ได้แก่ LM1-4 SM1 ยกเว้น SM4 พบการกระจายตัวในกลุ่ม *N. oligotropha* จะเห็นได้ว่า *N. communis* น่าจะมีความสำคัญกว่า *N. oligotropha* ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Limpiyakorn *et al.*, 2007 ทำการศึกษากลุ่มประชากร AOB จากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนเมืองโตเกียว พบว่าจำนวน *N. oligotropha* มีจำนวนมากกว่า *N. communis* cluster

นอกจากนี้ปริมาณแอมโมเนียจะมีผลต่อกลุ่มประชากร AOB แล้ว ยังมีระยะกักเก็บตะกอน (SRT) ที่มีผลต่อกลุ่มประชากรดังกล่าว คือ SM4 ใช้ระบบบ่อเติมอากาศ (aerated lagoon) ซึ่งมีระยะการเก็บตะกอนนานกว่าระบบตะกอนเร่ง (activated sludge)

5.2.2 กลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคียในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน

การศึกษากลุ่มประชากรแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย (AOA) ในตัวอย่างจากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนใช้วิธี PCR amplification-cloning แล้วทำการสุ่มตัวอย่างละ 10 โคลนนี้ต่อตัวอย่าง เพื่อทำการอ่านรหัสพันธุกรรม เมื่อนำรหัสพันธุกรรมที่ได้จากการจากการถอดรหัสพันธุกรรม มาทำการวิเคราะห์ Homology Search ด้วยโปรแกรม Blast ดังแสดงในตารางที่ 6 ผลจากการทำ Homology Search พบว่ารหัสพันธุกรรมที่ได้มีความใกล้เคียงกับรหัสพันธุกรรมของกลุ่มประชากร AOA ในระบบฐานข้อมูล ซึ่งแสดงว่าไพรเมอร์นี้มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว โดยมีความใกล้เคียงกับกลุ่มประชากร AOA ใน

ฐานข้อมูลในช่วง 93 – 99 % หลังจากนั้นทำการจัดกลุ่มตามความเหมือนของรหัสพันธุกรรมในตัวอย่างจากระบบบำบัดน้ำเสีย จำนวนทั้งสิ้น 72 รหัสพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม DOTUR program (Scholoss *et al.*, 2005) โดยในแต่ละกลุ่มมีความเหมือนของรหัสพันธุกรรมเท่ากับ 100% พบว่าสามารถแบ่งออกได้ทั้งหมด 38 กลุ่ม (ดังแสดงในตารางที่ 6) ซึ่งในแต่ละกลุ่มจะเลือกตัวแทนมา 1 ตัวอย่าง เพื่อใช้สร้าง phylogenetic tree

ตารางที่ 6 ความเหมือนของรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างจากแต่ละระบบบำบัดน้ำเสียและฐานข้อมูล

Plant	Clone	Score	Identity	Gap	Accession No.	related sequence	Source
I3	AOA-I3-1 (6)	1070	585/588 (99%)	0/588 (0%)	EU590198	Clone BGA-661	Soil
	AOA-I3-2 (1)	1050	579/584 (99%)	1/584 (0%)	EU590198	Clone BGA-661	Soil
	AOA-I3-3 (1)	1046	579/585 (98%)	2/585 (0%)	EU590198	Clone BGA-661	Soil
	AOA-I3-4 (1)	1048	580/586 (98%)	1/586 (0%)	EU590198	Clone BGA-661	Soil
	AOA-I3-5 (1)	1053	579/583 (99%)	1/583 (0%)	EU590198	Clone BGA-661	Soil
I4	AOA-I4-1 (1)	979	553/564 (98%)	2/564 (0%)	EU239976	Clone MamSp.H08	Mammoth Hot Spring sediment
LM1	AOA-LM1-1 (2)	1029	566/570 (99%)	1/570 (0%)	EU651295	Clone SF05-BG30-E01	Estuary sediments
	AOA-LM1-2 (3)	924	543/564 (96%)	1/564 (0%)	DQ278527	Clone DI-20	WWTP operated with low dissolved oxygen levels and long retention times
	AOA-LM1-3 (1)	985	558/570 (97%)	1/570 (0%)	EU239976	Clone MamSp.H08	Mammoth Hot Spring sediment
	AOA-LM1-4 (2)	996	560/570 (98%)	1/570 (0%)	EU239976	Clone MamSp.H08	Mammoth Hot Spring sediment
	AOA-LM1-5 (1)	1003	560/568 (98%)	1/568 (0%)	EU239976	Clone MamSp.H08	Mammoth Hot Spring sediment
	AOA-LM1-6 (1)	981	540/544 (99%)	1/544 (0%)	EU651295	Clone SF05-BG30-E01	Estuary sediments
LM2	AOA-LM2-1 (7)	1064	587/592 (99%)	1/592 (0%)	DQ304863	Clone 2	Trrestrial archaea
	AOA-LM2-2 (1)	1046	581/588 (98%)	2/588 (0%)	DQ304863	Clone 2	Terrestrial archaea
	AOA-LM2-3 (1)	1035	578/586 (98%)	3/586 (0%)	DQ304863	Clone 2	Terrestrial archaea
	AOA-LM2-4 (1)	1042	581/589 (98%)	3/589 (0%)	DQ304863	Clone 2	Terrestrial archaea
LM3	AOA-LM3-1 (2)	963	546/558 (97%)	2/558 (0%)	EU239976	Clone MamSp.H08	Mammoth Hot Spring sediment
	AOA-LM3-2 (1)	977	553/564 (98%)	3/564 (0%)	EU239976	Clone MamSp.H08	Mammoth Hot Spring sediment
	AOA-LM3-3 (1)	826	526/565 (93%)	2/565 (0%)	FJ227760	Clone WBM050405_45P2A1	Sediment
	AOA-LM3-4 (2)	841	530/567 (93%)	1/567 (0%)	FJ227760	Clone WBM050405_45P2A1	Sediment
	AOA-LM3-5 (2)	854	535/571 (93%)	1/571 (0%)	FJ227760	Clone WBM050405_45P2A1	Sediment
	AOA-LM3-6 (1)	990	557/567 (98%)	1/567 (0%)	EU239976	Clone MamSp.H08	Mammoth Hot Spring sediment
	AOA-LM3-7 (1)	965	567/589 (96%)	1/589 (0%)	EU852665	Clone PLANTC AR RSF-I OTU1	Water sampled
	AOA-LM3-8 (1)	979	555/567 (97%)	1/567 (0%)	EU239976	Clone MamSp.H08	Mammoth Hot Spring sediment

ตารางที่ 6 ความเหมือนของรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างจากแต่ละระบบบำบัดน้ำเสียและฐานข้อมูล

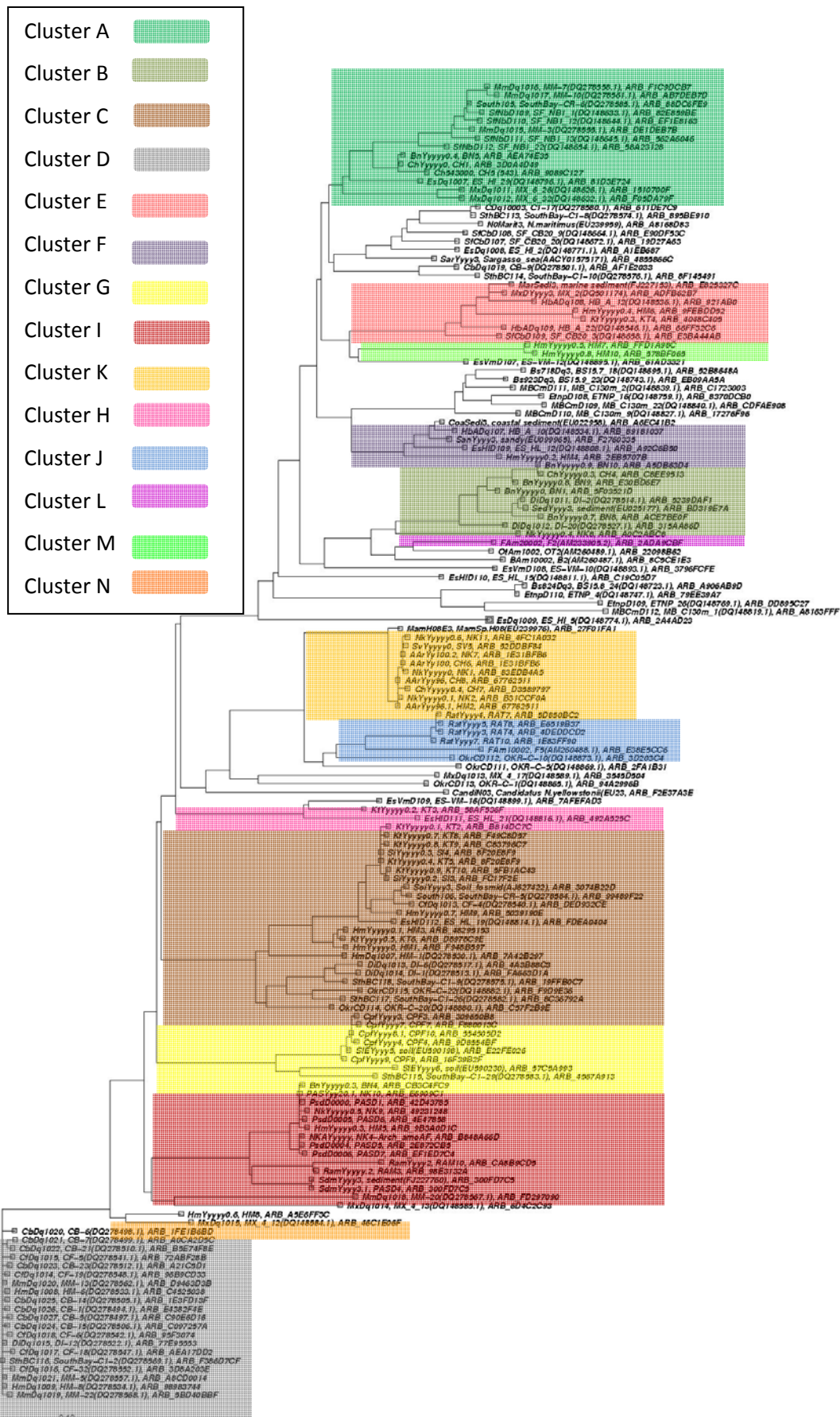
Plant	Clone	Score	Identity	Gap	Accession No.	related sequence	Source
LM4	AOA-LM4-1 (9)	1013	573/585 (97%)	1/585 (0%)	EU885673	Clone 3063-A-04	Deep-sea sediments
	AOA-LM4-2 (1)	1009	568/579 (98%)	0/579 (0%)	EU885673	Clone 3063-A-04	Deep-sea sediments
SM1	AOA-SM1-1 (9)	981	554/565 (98%)	3/565 (0%)	FJ755701	Clone AOA-10	Sediment
	AOA-SM1-2 (1)	904	546/571 (95%)	15/571 (2%)	FJ755701	Clone AOA-10	Sediment
SM4	AOA-SM4-1 (1)	1057	586/592 (98%)	4/592 (0%)	EU885647	Clone 3057-A-16	Deep-sea sediments
	AOA-SM4-2 (1)	994	557/566 (98%)	1/566 (0%)	EU239976	Clone MamSp.H08	Mammoth Hot Spring sediment
	AOA-SM4-3 (1)	1018	576/588 (97%)	2/588 (0%)	EU885647	Clone 3057-A-16	Deep-sea sediments
	AOA-SM4-4 (1)	771	502/544 (92%)	2/544 (0%)	EU022958	Clone HB_C_0604_C02	Coastal sediments
	AOA-SM4-5 (1)	828	527/566 (93%)	1/566 (0%)	FJ227760	Clone WBM050405_45P2A1	Sediment
	AOA-SM4-6 (1)	924	553/579 (95%)	2/579 (0%)	FJ601561	Clone MS_26B4	Tropical marine estuary sediment
	AOA-SM4-7 (1)	948	550/567 (97%)	5/567 (0%)	EF382617	Clone PA6-23	Coral colony
	AOA-SM4-8 (1)	1044	576/581 (99%)	1/581 (0%)	EU590435	Clone SGX-123	Soil
	AOA-SM4-9 (1)	1018	563/569 (98%)	0/569 (0%)	DQ501096	Clone MX_5_JAN_6	Estuarine sediments
	AOA-SM4-10 (1)	922	542/562 (96%)	5/562 (0%)	EF382617	Clone PA6-23	Coral colony

เนื่องจากข้อมูลและการจัดเรียงกลุ่ม AOA ใน phylogenetic tree มีจำนวนจำกัด ดังนั้นการสร้าง phylogenetic tree จะคำนวณสามแบบ (Distance metrix, Maximum Parsimony และ Maximum Likelihood) เพื่อเปรียบเทียบกัน พบว่าการจัดกลุ่ม AOA จาก Phylogenetic tree ที่ได้จากวิธีการคำนวณทั้งสามแบบ ให้ผลการจัดกลุ่มเหมือนกัน รูปที่ 4 phylogenetic tree สร้างโดยใช้วิธี neighbor joining โดยใช้รหัสพันธุกรรมที่พบในออคิตร่วมกับรหัสพันธุกรรมจากแต่ละตัวแทนของแต่ละกลุ่ม (OUT) และสรุปการกระจายตัวของ AOA ดังแสดงในตารางที่ 7

จากตารางที่ 8 พบว่ากลุ่มประชากร AOA จากระบบตะกอนเร่งกระจายอยู่ใน 4 กลุ่ม (cluster) ได้แก่ A, B, 1C, c และ D ซึ่งใน cluster D มีจำนวน AOA อยู่เป็นจำนวนมาก จึงคาดว่า AOA กลุ่มดังกล่าวเป็นกลุ่มเด่นในระบบตะกอนเร่ง ในขณะที่งานวิจัยของ Park *et al.* (2005) ทำการศึกษาตะกอนเร่งจากระบบบำบัดน้ำเสีย โดยใช้เทคนิคระดับโมเลกุล ซึ่งเป็นงานวิจัยเดียวที่ทำการศึกษา AOA ในระบบบำบัดน้ำเสีย พบว่า มีการกระจายตัวของ AOA ในหลายกลุ่ม โดยเฉพาะ cluster K นอกจาก AOA จะพบในระบบบำบัดน้ำเสียแล้ว (ในการทดลองนี้) ยังพบได้ในดิน ตะกอนจากแหล่งน้ำเค็ม ตะกอนปากแม่น้ำ ตะกอนใต้ทะเลลึก และตะกอนจากบ่อน้ำร้อน จะเห็นว่าจากสถานที่พบกลุ่มประชากร AOA มีปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เช่น ความเค็ม ความร้อน และความเข้มข้นของแอมโมเนีย ดังนั้นกลุ่ม AOA เป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่สามารถปรับตัวให้อยู่รอดในสิ่งแวดล้อมแบบต่างๆ ได้

กลุ่มประชากร AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมมีความหลากหลายน้อยกว่าระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน I3 และ I4 เป็นเพียงสองตัวอย่างจากสี่ตัวอย่าง (I1, I2, I3 และ I4) ที่พบการกระจายตัวของ AOA ซึ่งทั้งสองตัวอย่างดังกล่าว เป็นตัวแทนของระบบที่รับน้ำเสียที่มีปริมาณแอมโมเนียปานกลาง ประมาณ 40 – 70 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) พบการกระจายตัวในกลุ่มแตกต่างกัน คือในระบบ I3 พบการกระจายตัวของ AOA ในกลุ่ม G และในระบบ I4 พบการกระจายในกลุ่ม K ในขณะที่ในระบบ I1 และ I2 เป็นระบบซึ่งรับน้ำเสียที่มีปริมาณแอมโมเนียต่ำ (13 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) และแอมโมเนียสูง (422 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ตามลำดับ จากปริมาณแอมโมเนียที่กล่าวไปข้างต้น พบว่าสาเหตุที่ทำให้ไม่พบ AOA ในระบบ I2 เพราะวาระบบดังกล่าวรับน้ำเสียที่มีปริมาณแอมโมเนียสูง ส่วนในระบบ I1 รับน้ำเสียที่มีปริมาณแอมโมเนียต่ำนั้น ยังหาสาเหตุไม่ได้ว่าทำไมไม่พบการกระจายตัวของ AOA เพราะวาระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน ซึ่งรับน้ำเสียที่มีปริมาณแอมโมเนียประมาณ 5 – 13 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ยังพบการกระจายตัวของ AOA และจากตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่าการกระจายของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน มีการกระจายตัวมากกว่าระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรม

นอกจากปริมาณแอมโมเนียที่มีผลต่อการกระจายตัวของ AOA แล้ว ระบบการบำบัดที่ใช้ อาจจะมีผลต่อกลุ่มประชากรดังกล่าวได้ คือในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรม (I1-I4) และระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน (LM1, LM2, LM3, LM4, และ SM1) ใช้ระบบการบำบัดแบบตะกอนเร่ง (activated sludge) แต่ในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน (SM4) ใช้ระบบบำบัดแบบบ่อเติมอากาศ (aerated lagoon) ซึ่งจากตัวอย่างที่ใช้ ระบบบำบัดแบบตะกอนเร่ง มีการกระจายตัวของ AOA เพียง 1 – 3 กลุ่ม เท่านั้น ในขณะที่ตัวอย่างที่ใช้ ระบบบำบัดแบบบ่อเติมอากาศพบการกระจายตัวของ AOA ถึง 6 กลุ่ม เนื่องจากระยะเวลาการเก็บตะกอน ในระบบบ่อเติมอากาศนั้นใช้เวลานานกว่าระบบบำบัดแบบตะกอนเร่ง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Park et al (2006) พบว่าระบบบำบัดน้ำเสียที่มีระยะเวลาการพักน้ำนาน (ระยะเวลาการเก็บตะกอนมากกว่า 15 วัน และ ระยะเวลาเก็บน้ำมากกว่า 24 ชั่วโมง) จะพบกลุ่มประชากร AOA ในขณะที่ระบบบำบัดน้ำเสียที่มีระยะเวลาการพักน้ำสั้นจะไม่พบกลุ่มประชากร AOA ดังนั้นระบบที่ใช้ในการบำบัดและวิธีการทำงานเป็นปัจจัยสำคัญ ที่มีผลต่อกลุ่มประชากร AOA



ภาพที่ 4 Phylogenetic tree สร้างโดยใช้วิธี neighbor joining โดยใช้รหัสพันธุกรรมที่พบในอดีต (Park *et al.*, 2005) ร่วมกับรหัสพันธุกรรมจากแต่ละตัวแทนของแต่ละกลุ่ม (OUT)

ตารางที่ 7 สรุปการกระจายตัวของกลุ่ม AOA ในแต่ละระบบบำบัด

Cluster	I1	I2	I3	I4	LM1	LM2	LM3	LM4	SM1	SM4
B					✓					
E										✓
A					✓✓					
F										✓
C								✓✓		✓✓✓
G			✓✓✓✓✓							
N										✓
D										
I							✓✓✓		✓✓	✓
J							✓✓✓✓			
K				✓	✓✓✓		✓✓✓✓			✓
L							✓			
M										✓✓

✓ จำนวนAOA ในแต่ละ OTU

6. ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ความหลากหลายและโครงสร้างของกลุ่มประชากร AOB ที่มีอยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียจริงในประเทศไทย
2. ความเชื่อมโยงกลุ่มประชากร AOB กับลักษณะน้ำเสียและชนิดของระบบและพารามิเตอร์ในการควบคุมระบบและประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของระบบบำบัดน้ำเสีย
3. ความหลากหลายและโครงสร้างของกลุ่มประชากร AOA ที่มีอยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียจริงในประเทศไทย
4. ความเชื่อมโยงกลุ่มประชากร AOA กับลักษณะน้ำเสียและชนิดของระบบและพารามิเตอร์ในการควบคุมระบบและประสิทธิภาพการกำจัดแอมโมเนียของระบบบำบัดน้ำเสีย
5. องค์กรความรู้เกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสีย
6. แนวทางการพัฒนากลุ่มประชากร AOB และ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสีย เพื่อการกำจัดแอมโมเนียและสารไมโครโพลูแตนท์อย่างมีประสิทธิภาพอย่างยั่งยืนต่อไป
7. ผลงานทางวิชาการ 3 เรื่อง ได้แก่

ช่วงเวลา (ปี)	ชื่อผลงานวิจัย	วารสารที่ตีพิมพ์
ปี 2554	Abundance of <i>amoA</i> genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in activated sludge of full-scale wastewater treatment plants	Bioresource Technology ปี 2011 ฉบับที่ 102 หน้า 3694–3701 (IF2009: 4.253)
ปี 2554	Change in ammonia-oxidizing microorganisms in enriched nitrifying activated sludge	Applied Microbiology and Biotechnology ปี 2011 ฉบับที่ 89 หน้า 843–853 (IF2009: 2.896)
ปี 2554	ARCHAEAL <i>amoA</i> GENES OUTNUMBER BACTERIAL <i>amoA</i> GENES IN MUNICIPAL WASTEWATER TREATMENT PLANTS IN BANGKOK	Microbial Ecology (รอกการตีพิมพ์) (IF2009: 3.251)

7. เอกสารอ้างอิง

Dionisi H.M., Layton A.C., Harms G., Gregory I.R., Robinson K.G. and Sayler G.S.. 2002. Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*-like ammonia-oxidizing bacteria and *Nitrospira* spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (1): 245–253.

Francis C.A., Roberts K.J., Beman J.M., Santoro A.E., and Oakley B.B. 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 14683–14688.

Gieseke A., Purkhold U., Wagner M., Amann R., and Schramm S. 2001. Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (3): 1351–1362.

Harms G., Layton A.C., Dionisi H.M., Gregory I.R., Garrett V.M., Hawkins S.A., Robinson K.G. and Sayler G.S. 2003. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 37: 343-351.

Hermansson A., and Lindgren P.E. 2001. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in Arable soil by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2): 972-976.

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2003. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 75(5), 631–681.

Japan Environment Agency (JEA), 1998. SPEED '98/JEA, Strategic Programs on Environmental Endocrine Disrupters '98.

Juretschko S., Timmermann G., Schemid M., Schleifer K.H., Pommering-Röser A., Koops H.P. and Wagner M.. 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3042-3051.

Konneke M., Bernhard A.E., de la Torre J.R., Walker C.B., Waterbury .JB. and Stahl D.A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437: 543–546.

Koops H.P. and Pommerening-Roser A. 2001. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiol. Ecol.* 37: 1-9

Koops H. P., Harms H. and Wehrmann H.. 1976. Isolation of a moderate halophilic ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosococcus mobilis* nov. sp. *Arch. Microbiol.* 10: 277-282.

Kowalchuck G.A., Stephen J.R., De Boer W., Prosser J.I., Embley T.M. and Woldendorp J.M. 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (4): 1489–1497.

Leininger S., Urich T., Schloter M., Schwark L., Qi J. and Nicol G.W. 2006 Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature.* 442: 806-809.

Limpiyakorn T., Kurisu F., and Yagi O. 2006. Development and application of real-time PCR for quantification of specific ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of sewage treatment systems. *App. Microbiol. Biotechnol.* (In press).

Limpiyakorn T., Kurisu F., and Yagi O. 2006 Quantification of Ammonia-Oxidizing Bacteria Populations in Full-Scale Sewage Activated Sludge Systems and Assessment of System Variables Affecting their Performance. *Wat. Sci. Tech.* (In press).

Limpiyakorn T., Sakamoto Y., Kurisu F. and Yagi O. 2007. Effect of Ammonia and Nitrite Concentrations on Communities and Populations of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Laboratory-Scale Continuous-Flow Reactors. *FEMS Microbiol. ecol.* (in press)

Limpiyakorn T., Shinohara Y., Kurisu F. and Yagi O. 2004. Distribution of ammonia-oxidizing bacteria in sewage activated sludge: analysis based on 16S rDNA sequence. *Wat. Sci. Tech.* 50 (8): 9–14.

Limpiyakorn T., Shinohara Y., Kurisu F. and Yagi O. 2005. communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo, *FEMS Microbiol. ecol.* 54 (2): 205-217.

Liu X-C., Zhang Y., Yang M., Wang Z-Y. and LV Wen-zhou. 2007. Analysis of bacterial community structures in two sewage treatment plants with different sludge properties and treatment performance by nested PCR-DGGE method. *Journal of Environmental Sciences*, 19 :60-66

MacDonald R.M. 1986. Nitrification in soil: a introductory history In: J.I. Prosser (Eds.), *Nitrification*, IRL Press, Oxford, UK. pp. 1-16.

Mobarry B.K., Wagner M., Urbain V., Rittmann B.E. and Stahl D.A. 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (6): 2156–2162.

Nicolaisen M.H. and Ramsing N.B. 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *J. Microbiol. Meth.* 50: 189–203.

Okabe, S., Satoh H. and Watanabe Y.. 1999. In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3182-3191.

Park H-D., Wells G.F., Bae H., Criddle C.S. and Francis C.A.. 2006. Occurrence of ammonia-oxidizing Archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Appl. Environ Microbiol.* 72: 5643–5647.

Purdom C.E., Hardiman P.A., Bye V.J., Eno N.C., Tyler C.R. and Sumpter J.P. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem Ecol* , 8:275–285.

Rotthauwe J.H., Witzel K. P. and Liesack W. 1997. The ammonia monooxygenase structure gene *amoA* as a function marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (12): 4704–4712.

Schramm A., De Beer D., Wagner M., and Amann R.. 1998. Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3480-3485.

Shi J., Fujisawa S., Nakai, S. and Hosomi M. 2004. Biodegradation of natural and synthetic estrogen by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitromonas europaea*. *Water Res.* 38 (9): 2323-2330.

Stehr G., Böttcher B., Dittberner P., Rath G. and Koops H. P. 1995a. The ammonia-oxidizing nitrifying population of the River Elbe estuary. *FEMS Microbiol. Ecol.* 17:177-186.

Treusch AH., Leininger S., Kletzin A., Schuster S.C., Klenk H-P. and Schleper C. 2005. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol*, 7: 1985–1995.

Vader J., van Ginkel C., Sperling F., de Jong F., de Boer W., de Graaf J., van der Most M. and Stokman P. G. W. 2000. Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge. *Chemosphere*, 41 (8): 1239-1243.

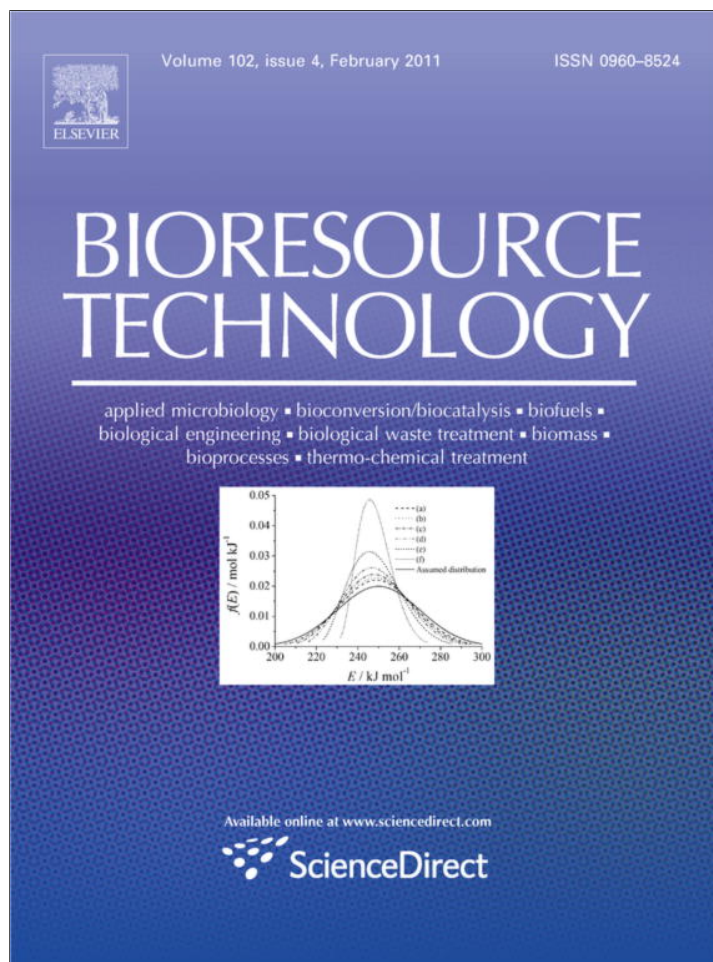
Venter J.C., Remington K., Heidelberg J.F., Halpern A.L., Rusch D., Eisen J.A. . 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66–74.

Wagner, M., Rath G., Amann R., Koops H.P., and Schleifer K.H. 1995. *In situ* identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 18: 251–264.

Wuchter C., Abbas B., Coolen M.J.L., Herfort L., van Bleijswijk J. and Timmers P. 2006. Archaeal nitrification in the ocean. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 12317–12322.

ภาคผนวก
บทความตีพิมพ์ระดับนานาชาติ

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech

Abundance of *amoA* genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in activated sludge of full-scale wastewater treatment plants

Tawan Limpiyakorn^{a,b,*}, Puntipar Sonthiphand^{b,c}, Chaiwat Rongsayamanont^{b,c}, Chongrak Polprasert^d

^a Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

^b National Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

^c International Postgraduate Programs in Environmental Management, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

^d School of Bio-Chemical Engineering and Technology, Sirindhorn International Institute of Technology, Thammasat University, Pathumthani, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 September 2010
Received in revised form 18 November 2010
Accepted 19 November 2010
Available online 25 November 2010

Keywords:

Ammonia-oxidizing archaea
Ammonia-oxidizing bacteria
amoA gene
Activated sludge
Wastewater treatment plant

ABSTRACT

In this study, the abundance and sequences of *amoA* genes of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB) were determined in seven wastewater treatment plants (WWTPs) whose ammonium concentrations in influent and effluent wastewaters varied considerably (5.6–422.3 mgN l⁻¹ and 0.2–29.2 mgN l⁻¹, respectively). Quantitative real-time PCR showed that the comparative abundance of AOA and AOB *amoA* genes differed among the WWTPs. In all three industrial WWTPs, where the influent and effluent contained the higher levels of ammonium (36.1–422.3 mgN l⁻¹ and 5.3–29.2 mgN l⁻¹, respectively), more than four orders of magnitude higher numbers of AOB *amoA* genes than AOA *amoA* genes arose (with less than the limit of detection of AOA *amoA* genes). In contrast, significant numbers of AOA *amoA* genes occurred in all municipal WWTPs (with ammonium levels in the influent and effluent of 5.6–11.0 mgN l⁻¹ and 0.2–3.0 mgN l⁻¹, respectively). Statistical analysis suggested that compared to other plants' parameters, the ammonium levels in the plants' effluent showed correlation with the highest *p* value to the abundance of AOA *amoA* genes.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

For a few decades, it had been believed that autotrophic ammonia oxidation only occurred in members of the domain *Bacteria* (e.g., aerobic ammonia-oxidizing bacteria, AOB and anaerobic ammonia-oxidizing bacteria, Anammox). This understanding has been changed by recent molecular and culture-dependent evidence showing that autotrophic ammonia oxidation also occurs in the domain *Archaea*. The use of molecular tools led to the discovery of an archaeal ammonia monooxygenase (*amo*) gene that encoded ammonia monooxygenase (AMO), a key enzyme for ammonia oxidation, in marine and terrestrial system environments (Venter et al., 2004; Treusch et al., 2005). The first and the only available ammonia-oxidizing archaea (AOA) isolate, "*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*", was obtained from a marine aquarium tank (Konneke et al., 2005). This AOA isolate acquires energy for growth by aerobically oxidizing ammonia to nitrite. Like AOB, it contains putative genes for all three subunits of AMO

(i.e., *amoA*, *amoB*, and *amoC*). Later, thermophilic and moderately thermophilic enriched AOA cultures, "*Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii*" and "*Candidatus Nitrososphaera gargensis*," were cultivated from hot spring systems (De La Torre et al., 2008; Hatzenpichler et al., 2008). Quantitative real-time PCR analysis has been applied to several environmental samples to reveal the comparative abundance of AOA and AOB. In many cases, such as in seawater, estuarine sediments, and soil, the archaeal *amoA* gene outnumbered that of AOB (Wuchter et al., 2006; Caffrey et al., 2007).

In Wastewater treatment plants (WWTPs), AOA was found for the first time to occur in five out of nine activated sludge bioreactors in the US (Park et al., 2006) and, later, in two WWTPs in Hong Kong (Zhang et al., 2009). This suggests the widespread presence of AOA in WWTPs and their potential role in removing nitrogen from wastewater. Nonetheless, the comparative abundance of AOA and AOB had not been investigated in both studies. Erguder et al. (2009) reviewed and provided a conclusive discussion on the factors influencing the presence or/and dominance of AOA in different environments. AOA is proposed to be the possible major ammonia oxidizer in environments low in ammonium (Erguder et al., 2009). Evidence from culture-dependent studies corresponds to this hypothesis (Hatzenpichler et al., 2008; Martens-Habbena et al., 2009). It must be noted that, in WWTPs, the ammonium concentra-

* Corresponding author. Address: Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand. Tel.: +66 2 218 6668; fax: +66 2 218 6667.

E-mail addresses: tawan.l@chula.ac.th, miketawan@yahoo.com (T. Limpiyakorn).

tions in influent wastewater entering the aeration tanks, where ammonia oxidation occurs, varied considerably, from one to several thousands of mgN L^{-1} depending on the nature of the source. And, depending on the plants' treatment efficiencies, the ammonium levels in effluent wastewater can be diverged. The question therefore remains as to what the potential ammonia oxidizer in WWTPs is. In this study, the abundance and communities of AOA and AOB were determined in seven WWTPs (three industrial WWTPs and four municipal WWTPs) where ammonium concentrations in the influent and effluent varied significantly between 5.6 and 422.3 mgN l^{-1} and 0.2 and 29.2 mgN l^{-1} , respectively. The abundance of archaeal and bacterial *amoA* genes was examined using real-time PCR quantification, and AOA and AOB communities were investigated by specific PCR amplification, followed by the cloning and sequencing of the archaeal and bacterial *amoA* genes.

2. Methods

2.1. Description of wastewater treatment plants

Samples of activated sludge were taken from seven full-scale WWTPs in Thailand (Table 1). Plants IP1, IP2, and IP3 are industrial WWTPs, and plants MP1, MP2, MP3, and MP4 are municipal WWTPs. The seven WWTPs differed mainly due to their influent characteristics, especially their ammonium concentrations in the influent, which varied from 36.1 to 422.3 mgN l^{-1} for the industrial WWTPs and between 5.6 and 11.0 for the municipal WWTPs. Ammonium removal efficiencies varied between 51.7% and 95.7%. The ranges of the ammonium levels in the effluent were from 5.3 to 29.2 mgN l^{-1} for the industrial WWTPs and between 0.2 and 3.0 mgN l^{-1} for the municipal WWTPs. Influent biological oxygen demand (BOD) concentrations were in the range of 23.4–1410.0 mg l^{-1} and the BOD removal efficiencies were between 72.1% and 99.5%.

2.2. Preparation of the samples and DNA extraction

Two milligram of mixed liquor suspended solid (MLSS) from the sludge was transferred to a 1.7 ml tube and centrifuged at 14,000 rpm for 10 min. The supernatant was removed and the pellet was kept at -20°C . DNA was extracted from the samples using Fast-DNA SPIN kits for soil (QBiogene, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.3. Real-time PCR quantification

For each sample, quantitative real-time PCR was performed with duplicate sets of extracted DNA. Each set of extracted DNA was prepared by pooling the DNA extracted in triplicate, then diluted for four different 10-fold dilutions. For each dilution, quantitative real-time PCR was carried out in duplicate with a Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene, USA) in an Mx3005P instrument (Stratagene, USA). Archaeal *amoA* genes were quantified using the primers Arch-amoAF (5'-STAATGGTCTGGCTTAGACG-3') and Arch-amoAR (5'-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3') (Francis et al., 2005). The PCR mixture with a volume of 25 μl contained 12.5 μl of the QPCR master mix, 1 μl of each primer (0.4 μM), and 1 μl of each sample. The PCR condition was 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 60 s at 95°C , 60 s at 56°C , 30 s at 72°C , with data capture for each cycle at 78°C for 15 s. The standard DNA was the pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) inserted with the *amoA* gene fragment of the archaea *amoA* clone AOA-S-4 (with an accession number of GQ390338) prepared in the range of 2.7×10^1 – 2.7×10^7 copies. The quantification of bacterial *amoA* genes was performed using the primers amoA 1F (5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3') and amoA 2R (5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3') (Rotthauwe et al., 1997). The PCR mixture and condition were identical to those used for the archaeal *amoA* genes. The standard DNA used was the pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) possessing the *amoA* gene fragment of the clone AOB-NAS10-360-4 (with an accession number of GU980134) prepared in the range of 4×10^1 – 4×10^7 copies. The AOB 16S rRNA gene was quantified using the primers CTO 189A/Bf (5'-GGAGRAAAGCAGGGGATCG-3'), CTO189Cf (5'-GGAGGAAAGTAGGGGATCG-3'), and CTO 654r (5'-CTAGCYTTGTAGTTCAAACGC-3') (Kowalchuck et al., 1997). The PCR mixture and condition were the same as the mixtures and conditions used for the archaeal and bacterial *amoA* genes. The standard DNA was prepared using the pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) containing the 16S rRNA gene fragment of *Nitrosospora multiformis* (with an accession number of X90822) in the range of 7.2×10^1 – 7.2×10^7 copies. To confirm the single target fragment of the PCR amplified products, dissociation curves were analyzed and plotted at the end of every quantitative real-time PCR reaction. To verify the correct amplification of the target microorganisms' DNA, few clones from the clone libraries constructed from the real-time PCR amplified products were randomly selected for sequencing and the results for every reaction tested verified the correct amplification of the target microorganisms' DNA.

Table 1

Influent and effluent characteristics, treatment efficiencies, and operational parameters of full-scale wastewater treatment plants.

Parameter	Unit	Wastewater treatment plant							
		IP1	IP2	IP3	MP1	MP2	MP3	MP4	
Treatment process		AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	
BOD in influent ^a	mg l^{-1}	1410.0	1285.0	192–327	24.8–29.8	23.4–27.1	44.2–49.2	51.0–68.0	
BOD in effluent ^a	mg l^{-1}	7.0	7.0	3.0–8.0	5.7–8.3	3.2–3.5	10.6–12.5	3.1–3.4	
BOD removal ^a	%	99.5	99.5	97.6–98.4	72.1–77.0	85.3–88.1	74.6–76.0	94.1–95.6	
$\text{NH}_4\text{-N}$ in influent ^a	mg l^{-1}	422.3	72.5	36.1–59.0	10.0–11.0	5.9–6.7	5.6–6.6	9.4–10.6	
$\text{NH}_4\text{-N}$ in effluent ^a	mg l^{-1}	29.2	5.3	13.3–20.0	0.7–1.1	0.3–0.4	2.7–3.0	0.2–1.2	
$\text{NH}_4\text{-N}$ removal ^a	%	93.1	92.7	63.2–66.1	72.8–84.0	93.8–94.9	51.7–55.4	88.7–95.7	
$\text{NH}_4\text{-N}$ removal by autotrophs	%	83.8	83.4	58.5	82.0	85.0	48.0	83.7	
Influent BOD/ $\text{NH}_4\text{-N}$ ratio		3.34	17.72	5.46	2.60	4.01	7.66	5.95	
Volumetric $\text{NH}_4\text{-N}$ removal load of aeration tank by autotrophs	$\text{mg l}^{-1} \text{d}^{-1}$	179.0	11.4	23.4	47.1	30.3	7.9	30.8	
HRT ^b	h	48	96	19	4	4	4	6	
SRT ^b	d	14	10	12	10	11	20	30	
MLSS ^b	mg l^{-1}	3970	3540	5020	2067	3940	1103	4150	

HRT, hydraulic retention time; SRT, solid residence time; MLSS, mixed liquor suspended solid; and AS, activated sludge.

^a All influent characteristic, effluent characteristic, and removal efficiency values were the ranges in the month in that sludge was collected.

^b All operational parameters were the averages of the month in which sludge was collected.

The cell numbers of AOB were calculated from the quantified numbers of the *amoA* and 16S rRNA genes on the basis of the numbers of *amoA* and 16S rRNA gene copies found in isolated AOB. Per genome, AOB possessed one copy of the 16S rRNA gene and 2.5 copies of *amoA* gene (Aakra et al., 1999; Norton et al., 2002).

2.4. Statistical analysis

The abundance of *amoA* genes of AOA and AOB in the WWTPs was assessed correlations to the plants' parameters including influent and effluent characteristics, removal efficiencies, and operational parameters. A calculation of nonparametric Spearman's rank correlation coefficient (r_s) was performed with a two tailed p value, at p value of <0.01 or 0.05 being significant, using SPSS statistical software version 17.

2.5. Analysis of ammonia-oxidizing archaeal communities

The 635-bp fragments of the archaeal *amoA* genes were amplified using the primers Arch-*amoA*F and Arch-*amoA*R. The PCR mixture was prepared using a Takara polymerase (Takara Bio Inc., Japan) following the manufacturer's instructions. PCR amplification was performed in a thermal cycler (Biorad Laboratories, USA). The PCR condition was 2 min at 94 °C followed by 30–35 cycles for 30 s at 94 °C, 45 s at 53 °C, and 45 s at 72 °C, followed by 10 min of final extension at 72 °C. Replicates of the PCR amplification were pooled and purified by gel electrophoresis using a NucleoSpin Extract II Kit (Clontech Laboratories Inc., USA). Then, the purified PCR products were cloned using the pGEM-T Easy vector system (Promega, USA). For each sample, 20–25 clones were randomly selected for sequencing at Macrogen Inc., Korea.

2.6. Analysis of ammonia-oxidizing bacterial communities

The primers *amoA* 1F and *amoA* 2R were used to amplify 495-bp of the bacterial *amoA* gene fragments. The PCR mixture was prepared using a Takara polymerase (Takara Bio Inc., Japan) following the manufacturer's instructions. The PCR amplification was performed in a thermal cycler (Biorad Laboratories, USA) under the PCR condition of 2 min at 94 °C followed by 30–35 cycles of 30 s at 94 °C, 45 s at 55 °C, and 45 s at 72 °C, followed by 10 min of final extension at 72 °C. Replicate PCR products were pooled and purified by gel electrophoresis using a NucleoSpin Extract II Kit (Clontech Laboratories Inc., USA). Then, the purified PCR products were cloned using the pGEM-T Easy vector system (Promega, USA). For

each sample, 15–20 clones were randomly selected for sequencing at Macrogen Inc., Korea.

2.7. Nucleotide sequence accession number

The analyzed sequences retrieved from this study have been deposited in the GenBank database under the accession numbers HM191510–HM191520 for the archaeal *amoA* gene and HM229662–HM229681 for bacterial *amoA* gene.

3. Results and discussion

3.1. Abundance of archaeal and bacterial *amoA* genes

The WWTPs in this study were selected to cover wide ranges of ammonium concentrations in the influent and effluent wastewaters (5.6–422.3 mgN l⁻¹ and 0.2–29.2 mgN l⁻¹, respectively). Quantitative real-time PCR showed that the comparative abundance results of the AOA and AOB *amoA* genes varied considerably among the samples (Fig. 1). All industrial WWTPs, whose influent and effluent contained the higher levels of ammonium (36.1–422.3 mgN l⁻¹ and 5.3–29.2 mgN l⁻¹, respectively), possessed the AOA *amoA* genes less than the limit of detection (LOD) of 1.70×10^2 copies mg⁻¹ MLSS (or 1.70×10^5 copies l⁻¹ sludge when the MLSS concentration is 1000 mg l⁻¹), whereas levels of more than nine orders of magnitude of the AOB *amoA* genes occurred ($2.78 \times 10^9 \pm 1.32 \times 10^9$ – $4.25 \times 10^{10} \pm 9.65 \times 10^9$ copies l⁻¹ sludge). This result is contrary to those of the municipal WWTPs, where lower levels of ammonium existed in the influent and effluent (5.6–11.0 mgN l⁻¹ and 0.2–3.0 mgN l⁻¹, respectively). In all municipal WWTPs, significant numbers of AOA *amoA* genes were found with more than eight orders of magnitude ($1.05 \times 10^8 \pm 6.74 \times 10^7$ – $7.48 \times 10^{11} \pm 2.08 \times 10^{11}$ copies l⁻¹ sludge). The level of AOB *amoA* genes found in the municipal WWTPs varied between $3.73 \times 10^8 \pm 3.07 \times 10^8$ and $9.05 \times 10^{10} \pm 2.77 \times 10^{10}$ copies l⁻¹ sludge. In all samples, the numbers of AOB were confirmed using the primer set targeting the 16S rRNA gene of the betaproteobacterial AOB. The results provided in Table S1 show the consistency of calculations from both assays.

The nonparametric Spearman's rank correlation coefficients demonstrated that the numbers of AOA *amoA* genes correlated to the ammonium levels in the effluent wastewater (negatively with $r_s = -0.741$) with the highest p value ($p = 0.057$) as compared to other plants' parameters. The p values for BOD concentrations in the influent and effluent, ammonium levels in the influent, influent

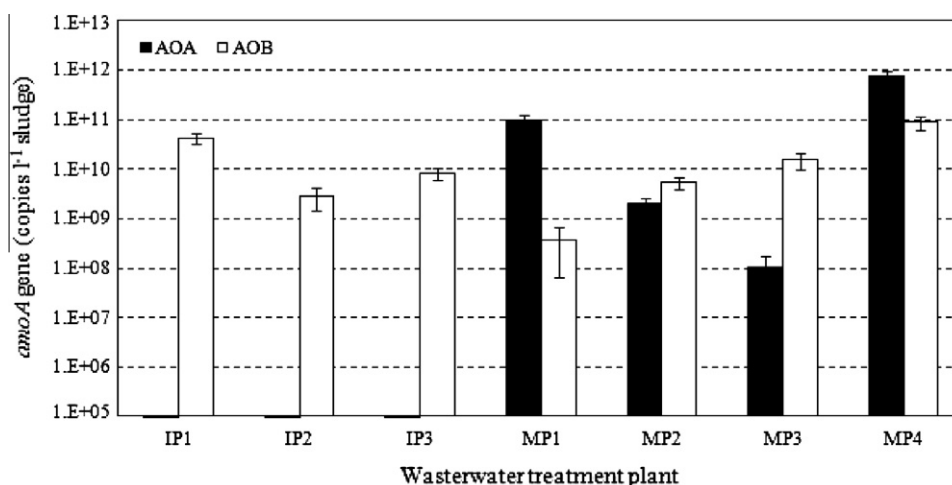


Fig. 1. Abundance of AOA and AOB *amoA* genes in activated sludge of full-scale wastewater treatment plants.

and effluent BOD per ammonium ratios, hydraulic retention time, and solid residence time were 0.129, 0.619, 0.102, 0.812, 0.077, 0.085, and 0.460, respectively. However, it is noticed that the p value for the ammonium levels in the effluent slightly exceeded the significant level of 0.05 and the numbers of the plants used for calculation were small as limited to only seven plants.

AOA and AOB share the common electron donor and acceptor, ammonia and oxygen, respectively. Culture-dependent studies revealed the similar stoichiometry of around 1:1.5 for both microorganisms (Konneke et al., 2005; De La Torre et al., 2008; Martens-Habbena et al., 2009). In aerobic biological wastewater treatment systems, aerobic microorganisms, for example heterotrophic, ammonia-oxidizing, and nitrite-oxidizing microorganisms, compete each other for the single electron acceptor, oxygen. With regard to their competitiveness for oxygen, as can be indicated by their oxygen affinities, distribution of distinct aerobic microorganisms in different locations of sludge floc and biofilm has been observed with heterotrophic microorganisms around the surfaces, and AOB and nitrite-oxidizing bacteria in the deeper parts (Wagner et al., 1998; Okabe et al., 1999; Gieseke et al., 2001; Shi et al., 2010). For AOA, the influence of oxygen level on these microorganisms has only partially been clarified. Erguder et al. (2009) suggested that although AOA likely tolerate a wide range of oxygen concentrations (<3.1 μM to 0.2 mM), some ecotypes might be specific for low-oxygen environments. And, the low range of oxygen concentrations might be one of the most determinative factors for the environments that AOA occur. Evidence from isolated cultures demonstrated that the only available AOA isolate, "*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*", has the half-saturation constant (K_s) value for oxygen of 3.91 μM (Martens-Habbena et al., 2009), while the values for *Nitrosomonas europaea* range from 6.9 to 17.4 μM (Laanbroek et al., 1994). And, for other AOB which are higher in affinity to ammonia than the *N. europaea*, such as *Nitrosomonas communis* and *Nitrosomonas oligotropha*, the K_s values for oxygen of these lineages seem to be lower than those of the *N. europaea* (Gieseke et al., 2001). In the municipal WWTPs in this study, AOA occurred in association with AOB with high affinity to ammonia (Section 3.3). Since the K_s values for oxygen of AOA (3.91 μM) are likely to be in the range of the K_s values of the AOB found in the plants (<6.9–17.4 μM reported for the *N. europaea*), AOA may appear in the depths around the AOB aggregates. In this case, AOA may receive ammonium at levels similar to the AOB. In many occasions, AOA were found to be the dominant ammonia-oxidizing microorganisms in environments low in ammonium levels (Erguder et al., 2009). Previous evidence suggested that "*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*", has the K_s value for ammonium (1.86 $\mu\text{gN L}^{-1}$, 133 nM total ammonium, Martens-Habbena et al., 2009) very much lower than the K_s values reported for AOB (between 0.4 and 27.4 mgN L^{-1} , 0.03–1.96 mM, Laanbroek et al., 1994; Stech et al., 1995; Bollmann et al., 2002; Martens-Habbena et al., 2009). However, when comparing the maximum specific growth rate (μ_{max}) of AOA and AOB, the μ_{max} of AOA was found to be in the range of AOB with high affinity to ammonia, but lower than the values reported for low affinity AOB. "*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*" showed the μ_{max} values of 0.0325 h^{-1} and 0.027 h^{-1} (Konneke et al., 2005; Martens-Habbena et al., 2009). The values were 0.014–0.025 (Suwa et al., 1994), 0.006–0.035 h^{-1} (Bollmann and Laanbroek, 2001), and 0.023–0.080 h^{-1} (Bollmann et al., 2002) for AOB with high affinity to ammonia and 0.063–0.138 h^{-1} (Bollmann et al., 2002), and 0.049–0.074 h^{-1} (Suwa et al., 1994) for AOB with low affinity to ammonia. The results suggested that as long as the ammonium level in the sludge floc is not high enough to reach the inhibitory levels for AOA or to shift the communities of AOB from high affinity AOB to low affinity AOB, AOA and AOB with high affinity to ammonia may co-predominate in ammonia-oxidizing consortium. The

very much (200 times) higher specific affinity (μ_{max}/K_s) value of "*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*" (68,700 $\text{l g cell}^{-1} \text{h}^{-1}$) than AOB (Martens-Habbena et al., 2009) suggested that AOA can outcompete AOB under extremely low ammonium levels. Therefore, even in the case that AOA locate beneath the AOB aggregates in sludge floc and receive the lower level of ammonium which remains from AOB consumption, AOA can still predominate inside the sludge floc. Previous studies showed that AOA are more sensitive than AOB to a high ammonium level, their growth and activity can be inhibited at the levels reported not to inhibit AOB. Growth of "*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*" was inhibited at the ammonium levels above 28 mgN L^{-1} (2 mM) and 4.2 mgN L^{-1} (0.3 mM) at pH of 8.2 (Martens-Habbena et al., 2009). The activity of the moderately thermophilic "*Candidatus Nitrososphaera gargensis*" was partially inhibited at the ammonium concentration of 43.1 mgN L^{-1} (3.08 mM, Hatzenpichler et al., 2008). In this study, a definite borderline of ammonium levels in the effluent between the municipal and industrial WWTPs was between 3.0 and 5.3 mgN L^{-1} . For the municipal WWTPs, the range of the effluent ammonium concentrations (0.2–3.0 mgN L^{-1}) was lower than the levels found to inhibit the AOA cultures. For the industrial WWTPs, the ammonium levels in plants IP1 and IP3 were in the high ranges (29.2 and 13.3–20.0 for plants IP1 and IP3, respectively) leading the possibility to provide the conditions that deteriorated AOA in the sludge floc. In plant IP2, the ammonium concentration (5.3 mgN L^{-1}) was higher than those of the municipal WWTPs. This level of ammonium in bulk solution may generate the inhibiting condition for AOA in the sludge floc. However, it must be noted that AOA found in our WWTPs may differ from the AOA cultures already discovered and they may response differently under different ammonium levels. In addition, the above explanation on the location of ammonia-oxidizing microorganisms in the sludge floc must be proven. This can be done using fluorescence *in situ* hybridization technique.

The percentage and the volumetric loads of ammonium removal in aeration tanks by autotrophic ammonia oxidation were calculated (Table 1) by assuming the amounts of ammonium used for cell assimilation approximately 0.1 \times the amounts of ammonium removed in the aeration tanks (Daims et al., 2001; Harms et al., 2003). In most WWTPs, 82.0–85.0% of ammonium in influent wastewater was oxidized by autotrophic microorganisms. Only in plants IP3 and MP3, the percentage of ammonium oxidized was lower than that in the others (58.5% and 48.0%, respectively). The calculation suggested that autotrophic ammonia oxidation occurred in all WWTPs. And, in the municipal WWTPs, ammonia might be partially oxidized by the AOA present. The volumetric ammonium removal loads of the aeration tanks by autotrophic ammonia-oxidizing microorganisms varied significantly among the WWTPs (ranging from 7.9 to 179.0 $\text{mg l}^{-1} \text{d}^{-1}$). These values show no correlation to the abundance of AOA *amoA* genes in the plants ($p = 0.751$).

For the industrial WWTPs, the ammonia-oxidizing activity per cell of AOB was calculated by assuming that AOA was not present in the plants and the values were found to be 31.31, 30.55, and 21.82 $\text{fmol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ for plants IP1, IP2, and IP3, respectively. These values corresponded to the range reported previously for AOB isolates (4.4–23.0 $\text{fmol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$) (Belser and Schmidt, 1980; Laanbroek et al., 1994). For the municipal WWTPs, the ammonia-oxidizing activity per cell of ammonia-oxidizing microorganism cannot be accurately estimated since both AOA and AOB *amoA* genes coexisted in ammonia-oxidizing consortium, and their contributions in ammonia oxidation in WWTPs remain unknown to date. However, rough estimation was computed by assuming that only AOA and AOB were responsible for ammonia oxidation in the municipal WWTPs and ammonia was prior used by AOB at a fixed rate for all plants. Previously, the values of

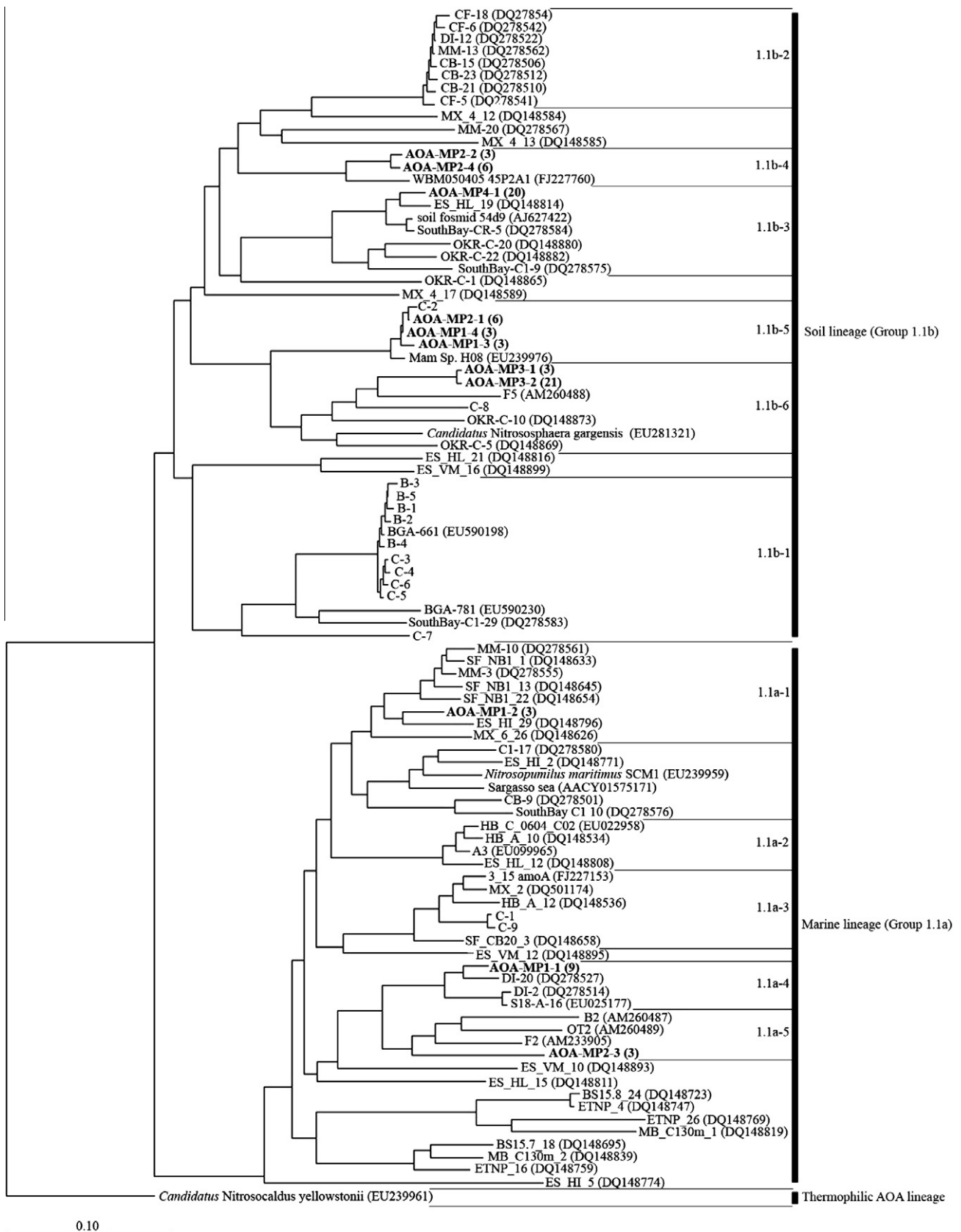


Fig. 2. A neighboring joining tree showing *amoA* genes of AOA. Sequences of AOA *amoA* genes retrieved in this study are shown in bold. The second abbreviation represents the samples followed by the sequence numbers of the samples. The amounts of sequences of each OTU are displayed by the number in parentheses.

7.7–12.4 fmol cell⁻¹ h⁻¹ and 0–49.6 fmol cell⁻¹ h⁻¹ were reported for AOB in municipal WWTPs (Harms et al., 2003; Limpiyakorn et al., 2005). However, at the times the previous studies performed, AOA had not yet been known to be available, thus the contribution of AOA was neither considered nor included in the calculation. Therefore, the value for the ammonia-oxidizing activity per cell of AOB was selected from the results of our industrial WWTPs, where AOA occurred minimally. The value obtained from plant IP1 (31.31 fmol cell⁻¹ h⁻¹) was excluded, since the analysis of AOB communities (Section 3.3) suggested that this plant contained AOB with low affinity to ammonia which differed from AOA found in the municipal WWTPs. This result was in contrast to plants IP2 and IP3 where AOB with high affinity to ammonia, as found to be common in the municipal WWTPs, appeared. Comparing between plants IP2 and IP3, we selected the higher value of 30.55 fmol cell⁻¹ h⁻¹ as reported for plant IP2. Based on the above assumptions, AOA contributed 96.75% and 26.94% of ammonia oxidation in plants MP1 and MP2 and 0% for plants MP3 and MP4. And, if it is assumed based on the previous studies (Wuchter et al., 2006; Beman et al., 2008; Kasuga et al., 2010) that AOA contain 2.5 copies of *amoA* genes per cell (2.8, 2.5, and 2.1, respectively), the ammonia-oxidizing activity per cell of AOA would be 3.58 and 30.15 fmol cell⁻¹ h⁻¹ for plants MP1 and MP2, respec-

tively. These values were similar to those (4.1–80.6 fmol cell⁻¹ h⁻¹) reported in granular activated carbon in a full-scale drinking water treatment plant (Kasuga et al., 2010), but higher than the value (0.53 fmol cell⁻¹ h⁻¹) found for “*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*” (Martens-Habbena et al., 2009). It is important to remark that the value for ammonia-oxidizing activity per cell of AOB used in this estimation can be varied depending on the actual kinetic coefficients of the AOB found and the ammonium concentration in the sludge floc in the plants. In addition, all above calculation needs modification when actual contribution of AOA and AOB in the WWTPs is clarified.

3.2. Communities of ammonia-oxidizing archaea

A total of 80 clones (15–25 clones for each library) was calculated for an arrangement of operational taxonomic units (OTUs) by the DOTUR program (Schloss and Handelsman, 2005). From the same clone library, any sequences showing 100% OTU identities were grouped into one OTU. Archaeal *amoA* sequences showed 94–100% identity to the previously reported nucleotide sequences in the GenBank database. The ARB program package (version 2.0; Department of Microbiology, Technische Universitat Munchen [http://www.arb-home.de]) was used for the phylogenetic

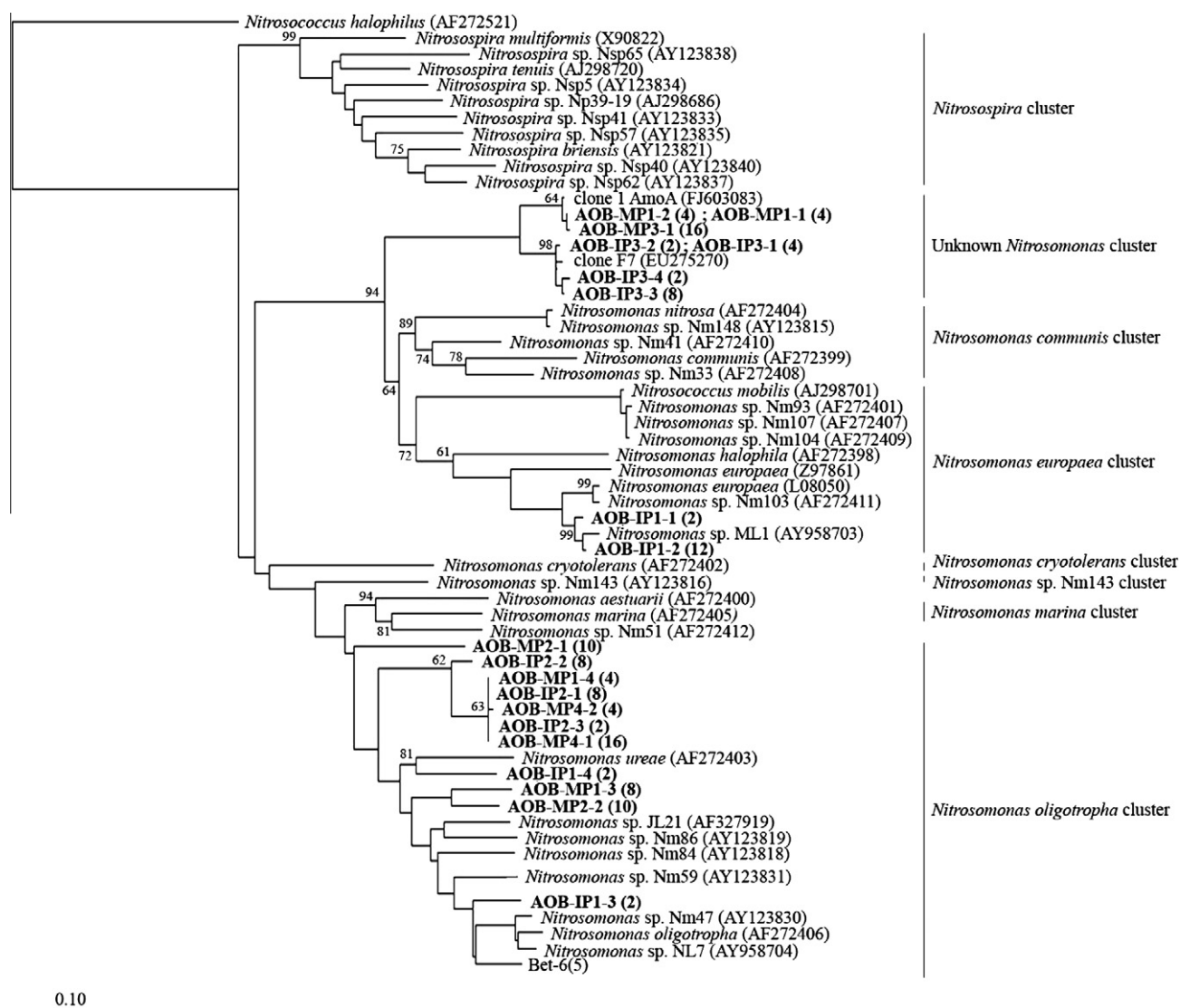


Fig. 3. A neighboring joining tree showing the *amoA* genes of AOB. Sequences of AOB *amoA* genes retrieved in this study are shown in bold. The second abbreviation represents the samples followed by the sequence numbers of the samples. The amounts of sequences of each OTU are displayed by the number in parentheses.

analysis. Our 80 AOA *amoA* sequences and reference sequences were aligned and calculated using three different methods (i.e., the distance matrix, maximum parsimony, and maximum likelihood), and the results show the same grouping of AOA clusters and tree topology as those computed using different approaches (data not shown).

Most of the sequences retrieved fell into a soil lineage (Group 1.1b). Few sequences were found to belong to a marine lineage (Group 1.1a), but no sequence related to a thermophilic AOA lineage (ThAOA). If a 14% nucleotide cutoff was defined, the AOA sequences were divided into 11 clusters (Fig. 2 and Table S2). All AOA analyzed sequences in this study fell within one of seven AOA clusters: 1.1a-1, 1.1a-4, 1.1a-5, 1.1b-3, 1.1b-4, 1.1b-5, and 1.1b-6. This finding differs from those reported by Park et al. (2006). Park et al. demonstrated that AOA of clusters 1.1a-4 and 1.1b-2 (clusters B and D in the Park et al. study) might be distinguished groups of AOA found in WWTPs, with cluster 1.1b-2 identified as a common widespread AOA in the WWTPs of their study. AOA of cluster 1.1b-2 was not found in any of the WWTPs in this current study. Unlike AOB, establishing a link between the affinity to ammonia of the AOA found and the ammonium levels in the effluent of the WWTPs is impossible because the information on the affinity to ammonia for each AOA cluster was unavailable. It is interesting to note that AOA found in the WWTPs of this study were found previously to be widely distributed in several environments, for example, a moderately thermal environment and marine environment (Francis et al., 2005; Weidler et al., 2007; De La Torre et al., 2008).

3.3. Communities of ammonia-oxidizing bacteria

From each clone library of the bacterial *amoA* gene, 15–20 clones were randomly selected for sequencing, and in total, 128 clones were sequenced. An arrangement of OTUs of the sequences was calculated as mentioned above. Analysis of sequence identity using the BLAST program showed 96–100% identity at the nucleotide level to previously reported sequences in the GenBank database. Phylogenetic analyses were performed with three different methods as described earlier. The results from all approaches exhibited the same grouping of AOB clusters and tree topology (data not shown). Fig. 3 shows the neighbor-joining tree of the *amoA* genes of AOB. All analyzed sequences recovered from our samples fell into three clusters: the unknown *Nitrosomonas*, *N. europaea*, and *N. oligotropha* clusters (Table S3). Members of the *N. europaea* cluster were found in plant IP1 only, while the *N. oligotropha* cluster was distributed in most plants (IP1, IP2, MP1, MP2, and MP4). The unknown *Nitrosomonas* cluster was recovered from plants IP3, MP1, and MP3. It is noted that with all three methods of phylogenetic calculation, the sequences of the unknown *Nitrosomonas* cluster were always placed within the branch of the *N. europaea* and *N. communis* clusters.

An analysis of the AOB *amoA* gene sequences revealed that AOB with low affinity to ammonia (*N. europaea* cluster) were found in plant IP1 only, whereas in the other plants, AOB with high affinity to ammonia (*N. oligotropha* cluster and the unknown *Nitrosomonas* cluster) arose. Studies from isolated and mixed cultures showed that *N. europaea* exhibits the highest K_s values (12.3–27.4 mgN l⁻¹, 0.88–1.96 mM, 7.7 mgN l⁻¹, 0.55 mM) (Laanbroek et al., 1994; Martens-Habbena et al., 2009) among the group of AOB, while *N. oligotropha* has lower K_s values (0.4–1.1 mgN l⁻¹, 0.030–0.075 mM, 0.7–1.4 mgN l⁻¹, 0.05–0.10 mM) than other AOB (Stech et al., 1995; Bollmann et al., 2002). Consequently, AOB of the *N. europaea* cluster are commonly found in WWTPs with high ammonium levels and members of the *N. oligotropha* cluster are majority strains originating from WWTPs with low ammonium levels (Harms et al., 2003; Limpiyakorn et al., 2005; Limpiyakorn et al.,

2006a,b; Ducey et al., 2010; Wang et al., 2010). In the case of the unknown *Nitrosomonas* cluster, although no information on the ammonia affinity value is available, the molecular evidence from environmental samples showed that clones (clone 1 AOA, FJ603083 and clone F7, EU275270) of this AOB cluster were recovered from low ammonium environments. It is therefore implied that members of the unknown *Nitrosomonas* cluster have a high affinity to ammonia.

In this study, some WWTPs exhibited incongruence between the ammonium levels found in the effluent and the appearance of AOB species in the WWTPs. One example is plant IP3, where the range of the ammonium concentrations in the effluent (13.3–20.0 mgN l⁻¹) was higher than the K_s values for *N. europaea*; however, AOB of this cluster did not exist, but AOB with an expected lower K_s value (unknown *Nitrosomonas* cluster) appeared. For plants IP2, the ammonium levels in the effluent were 5.3 mgN l⁻¹. Although the ammonium levels of the WWTP were significantly higher than the K_s values for *N. oligotropha*, AOB of this cluster appeared and were probably the dominant AOB in these WWTPs. The explanation for this is as described earlier that, the ammonium level in the sludge floc around the AOB aggregates, rather than the ammonium concentration in bulk solution, should be the determinative factor to promote specific AOB species in the plants. In addition, in the industrial WWTPs, the actual activity of heterotrophic microorganisms might be higher than estimated, resulting in lowering the ammonium levels around the AOB aggregates.

4. Conclusion

It was found that the comparative abundance of AOA and AOB *amoA* genes varied among the WWTPs with regard to the ammonium concentrations in the effluent wastewater of the WWTPs. Significant numbers of AOA *amoA* genes occurred in all municipal WWTPs suggesting the potential role of AOA in autotrophic ammonia oxidation in WWTPs receiving low ammonium influent (which can lead to the low ammonium levels in the effluent). The finding of this study changes our understanding on nitrogen removal in WWTPs. AOA must also be considered as another microorganism potentially involved in nitrogen removal in WWTPs. Further studies should clarify the role of AOA and AOB in autotrophic oxidation of ammonia in WWTPs. This may be done by employing a combination of *in situ* activity investigations and molecular tools.

Acknowledgements

This work has been supported by the Thailand Research Fund under Grant No. MRG5280086. In addition, we would like to express our gratitude to the Bangkok Metropolitan Administration (BMA) for providing the sludge of municipal WWTPs. We also thank Manaskorn Rachakornkij, Chantra Tongcumpou and Ekawan Luepromchai for their equipment supply.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.biortech.2010.11.085.

References

- Aakra, A., Utaker, J.B., Nes, I.F., 1999. RFLP of rRNA genes and sequencing of the 16S–23S rDNA intergenic spacer region of ammonia-oxidizing bacteria: a phylogenetic approach. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 123–130.
- Belser, L.W., Schmidt, E.L., 1980. Growth and oxidation kinetics of three genera of ammonia oxidizing nitrifiers. *FEMS Microbiol. Lett.* 7, 213–216.

- Beman, J.M., Popp, B.N., Francis, C.A., 2008. Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California. *ISME J.* 2 (4), 429–441.
- Bollmann, A., Laanbroek, H.J., 2001. Continuous culture enrichments of ammonia-oxidizing bacteria at low ammonium concentrations. *FEMS Microbiol. Ecol.* 37 (3), 211–221.
- Bollmann, A., Bär-Gilissen, M.-J., Laanbroek, H.J., 2002. Growth at low ammonium concentrations and starvation response as potential factors involved in niche differentiation among ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (10), 4751–4757.
- Caffrey, J.M., Bano, N., Kalanetra, K., Hollibaugh, J.T., 2007. Ammonia oxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia. *ISME J.* 1, 660–662.
- Daims, H., Ramsing, N.B., Schleifer, K.-H., Wagner, M., 2001. Cultivation-independent, semiautomatic determination of absolute bacterial cell numbers in environmental samples by fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (12), 5810–5818.
- De La Torre, J.R., Walker, C.B., Ingalls, A.E., Konneke, M., Stahl, D.A., 2008. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environ. Microbiol.* 10, 810–818.
- Ducey, T.F., Vanotti, M.B., Shriner, A.D., Szogi, A.A., Ellison, A.Q., 2010. Characterization of a microbial community capable of nitrification at cold temperature. *Bioresour. Technol.* 101 (2), 491–500.
- Erguder, T.H., Boon, B.N., Wittebolle, L., Marzorati, M., Verstraete, W., 2009. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia oxidizing archaea. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 855–869.
- Francis, C.A., Roberts, K.J., Beman, J.M., Santoro, A.E., Oakley, B.B., 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 14683–14688.
- Gieseke, A., Purkhold, U., Wagner, M., Amann, R., Schramm, A., 2001. Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (3), 1351–1362.
- Harms, G., Layton, A.C., Dionisi, H.M., Gregory, I.R., Garrett, V.M., Hawkins, S.A., Robinson, K.G., Saylor, G.S., 2003. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 37, 343–351.
- Hatzenpichler, R., Lebedeva, E.V., Spieck, E., Stoecker, K., Richter, A., Daims, H., Wagner, M., 2008. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (6), 2134–2139.
- Kasuga, I., Nakagaki, H., Kurisu, F., Furumai, H., 2010. Predominance of ammonia-oxidizing archaea on granular activated carbon used in a full-scale advanced drinking water treatment plant. *Water Res.* 44 (17), 5039–5049.
- Konneke, M., Bernhard, A.E., De La Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., Stahl, D.A., 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437, 543–546.
- Kowalchuck, G.A., Stephen, J.R., De Boer, W., Prosser, J.I., Embley, T.M., Woldendorp, J.M., 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the b subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1489–1497.
- Laanbroek, H.J., Bodelier, P.L.E., Gerards, S., 1994. Oxygen consumption kinetics of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter hamburgensis* grown in mixed continuous cultures at different oxygen concentrations. *Arch. Microbiol.* 161, 156–162.
- Limpiyakorn, T., Shinihara, Y., Kurisu, F., Yagi, O., 2005. Communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 205–217.
- Limpiyakorn, T., Kurisu, F., Yagi, O., 2006a. Development and application of real-time PCR quantification for particular ammonia-oxidizing bacteria in full-scale sewage activated sludge systems and continuous enrichment cultures. *Appl. Microbiol. Biol.* 72, 1004–1013.
- Limpiyakorn, T., Kurisu, F., Yagi, O., 2006b. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria populations in full-scale sewage activated sludge systems and assessment of system variables affecting their performance. *Water Sci. Technol.* 54, 91–99.
- Martens-Habbena, W., Berube, P.M., Urakawa, H., de la Torre, J.R., Stahl, D.A., 2009. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying archaea and bacteria. *Nature* 461, 976–981.
- Norton, J.M., Alzerreca, J.J., Suwa, Y., Klotz, M.G., 2002. Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol.* 177 (2), 139–149.
- Okabe, S., Satoh, H., Watanabe, Y., 1999. In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (7), 3182–3191.
- Park, H.D., Wells, G.F., Bae, H., Criddle, C.S., Francis, C.A., 2006. Occurrence of ammonia oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5643–5647.
- Rotthauwe, J.H., Witzel, K.P., Liesack, W., 1997. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4704–4712.
- Schloss, P.D., Handelsman, J., 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1501–1506.
- Shi, X.-Y., Sheng, G.-P., Li, X.-Y., Yu, H.-Q., 2010. Operation of a sequencing batch reactor for cultivating autotrophic nitrifying granules. *Bioresour. Technol.* 101 (9), 2960–2964.
- Stech, G., Bottcher, B., Dittberner, P., Rath, G., Koops, H.P., 1995. The ammonia-oxidizing nitrifying population of the River Elbe estuary. *FEMS Microbiol. Ecol.* 17, 177–186.
- Suwa, Y., Imamura, Y., Suzuki, T., Tashiro, T., Urushigawa, Y., 1994. Ammonia-oxidizing bacteria with different sensitivities to (NH₄)₂SO₄ in activated sludges. *Water Res.* 28 (7), 1523–1532.
- Treusch, A.H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S.C., Klenk, H.P., Schleper, C., 2005. Novel genes or nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ. Microbiol.* 7, 1985–1995.
- Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., et al., 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304, 66–74.
- Wagner, M., Noguera, D.R., Juretschko, S., Rath, G., Koops, H.P., Schleifer, K.H., 1998. Combining fluorescent in situ hybridization (FISH) with cultivation and mathematical modeling to study population structure and function of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge. *Water Sci. Technol.* 37 (4–5), 441–449.
- Wang, X., Wen, X., Criddle, C., Wells, G., Zhang, J., Zhao, Y., 2010. Community analysis of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of eight wastewater treatment systems. *J. Environ. Sci.* 22 (4), 627–634.
- Weidler, G.W., Dornmayr-Pfaffenhuemer, M., Gerbl, F.W., Heinen, W., Stan-Lotter, H., 2007. Communities of archaea and bacteria in a subsurface radioactive thermal spring in the Austrian central alps, and evidence of ammonia-oxidizing crenarchaeota. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 259–270.
- Wuchter, C., Abbas, B., Coolen, M.J.L., Herfort, L., Van Bleijswijk, J., Timmers, P., 2006. Archaeal nitrification in the ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 12317–12322.
- Zhang, T., Jin, T., Yan, Q., Shao, M., Wells, G., Criddle, C., Fang, H.H.P., 2009. Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in activated sludges of a laboratory scale reactor and two wastewater treatment plants. *J. Appl. Microbiol.* 107 (3), 970–977.

Change in ammonia-oxidizing microorganisms in enriched nitrifying activated sludge

Applied Microbiology and
Biotechnology

ISSN 0175-7598

Volume 89

Number 3

Appl Microbiol Biotechnol
(2010) 89:843-853

DOI 10.1007/s00253-010-2902-

y

Applied and Microbiology Biotechnology

Volume 89 Number 3 February 2011

Mini-Reviews

- Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria**
S. Qin · K. Xing · J.-H. Jiang · L.-H. Xu · W.-J. Li 457
- Antimicrobial polymers: mechanism of action, factors of activity, and applications**
L. Timoteeva · N. Kleshcheva 475
- Ionic liquids for two-phase systems and their application for purification, extraction and biocatalysis**
S. Oppermann · F. Stein · U. Kragl 493
- RNAi as a potential tool for biotechnological applications in fungi**
T.M. Salame · C. Ziv · Y. Hadar · O. Yarden 501
- A review—biosynthesis of optically pure ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate ester: recent advances and future perspectives**
Q. Ye · P. Ouyang · H. Ying 513
- Bioavailability of organic compounds solubilized in nonionic surfactant micelles**
Z. Wang 523
- Biochemistry of lactone formation in yeast and fungi and its utilisation for the production of flavour and fragrance compounds**
C. Romero-Guido · I. Belo · T.M.N. Ts · L. Cao-Hoang · M. Alchihab · N. Gomes · P. Thonart · J.A. Teixeira · J. Destain · Y. Wache 535
- The unconventional antimicrobial peptides of the classical propionibacteria**
T. Feye · H. Holo · T. Langsrud · I.F. Nes · D.A. Brede 549
- Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma*/*Xanthophyllomyces dendrorhous***
I. Schmidt · H. Schewe · S. Gassel · C. Jin · J. Buckingham · M. Hünibelin · G. Sandmann · J. Schrader 555
- Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biotechnological production of high-value organic acids and alcohols**
C. Yu · Y. Cao · H. Zou · M. Xian 573

Biotechnological products and process engineering

- Evaluation of rhamnolipid production capacity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in comparison to the rhamnolipid over-producer strains DSM 7108 and DSM 2874**
M.M. Müller · B. Hörmann · M. Kugel · C. Syldatk · R. Hausmann 585
- A novel plasmid addition system for large-scale production of cyanophycin in *Escherichia coli* using mineral salts medium**
J. Kroll · S. Klinger · A. Steinbüchel 593
- Microbial community differences between propionate-fed microbial fuel cell systems under open and closed circuit conditions**
D.A. de Cárcer · P.T. Ha · J.K. Jang · I.S. Chang 605
- Optimization of cold-active chitinase production from the Antarctic bacterium, *Sanguibacter antarcticus* KOPRI 21702**
S.J. Han · H. Park · S.G. Lee · H.K. Lee · J.H. Yim 613
- Elaboration of antibiofilm materials by chemical grafting of an antimicrobial peptide**
J.-F. Yala · P. Thebaud · A. Héquet · V. Humblot · C.-M. Pradier · J.-M. Berjeaud 623

Biotechnologically relevant enzymes and proteins

- Cloning and characterization of a rhamnase isomerase from *Bacillus halodurans***
P. Prabhu · T.T.N. Doan · M. Jeya · L.-W. Kang · J.-K. Lee 635
- Cloning, purification, and characterization of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13**
O. Juajun · T.-H. Nguyen · T. Manschberger · S. Iqbal · D. Höltrich · M. Yamashita 645
- Nitroreductase activity of ferredoxin reductase BphA4 from *Dyella ginsengisoli* LA-4 by catalytic and structural properties analysis**
Y. Qu · H. Zhou · A. Li · F. Ma · J. Zhou 655

(Continued on inside front cover)

 Springer

 Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.

Change in ammonia-oxidizing microorganisms in enriched nitrifying activated sludge

Puntipar Sonthiphand · Tawan Limpiyakorn

Received: 26 July 2010 / Revised: 17 September 2010 / Accepted: 18 September 2010 / Published online: 5 October 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract In this study, sludge was taken from a municipal wastewater treatment plant that contained a nearly equal number of archaeal *amoA* genes ($5.70 \times 10^6 \pm 3.30 \times 10^5$ copies mgsludge^{-1}) to bacterial *amoA* genes ($8.60 \times 10^6 \pm 7.64 \times 10^5$ copies mgsludge^{-1}) and enriched in three continuous-flow reactors receiving an inorganic medium containing different ammonium concentrations: 2, 10, and 30 mM NH_4^+-N (28, 140, and 420 mgNI^{-1}). The abundance and communities of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in enriched nitrifying activated sludge (NAS) were monitored at days 60 and 360 of the operation. Early on, between day 0 and day 60 of reactor operation, comparative abundance of AOA *amoA* genes to AOB *amoA* genes varied among the reactors depending on the ammonium levels found in the reactors. As compared to the seed sludge, the number of AOA *amoA* genes was unchanged in the reactor with lower ammonium level ($0.06 \pm 0.04 \text{ mgNI}^{-1}$), while in the reactors with higher ammonium levels (0.51 ± 0.33 and $0.25 \pm 0.10 \text{ mgNI}^{-1}$), the numbers of AOA *amoA* genes were deteriorated. By

day 360, AOA disappeared from the ammonia-oxidizing consortiums in all reactors. The majority of the AOA sequences from all NASs at each sampling period fell into a single AOA cluster, however, suggesting that the ammonium did not affect the AOA communities under this operational condition. This result is contradictory to the case of AOB, where the communities varied significantly among the NASs. AOB with a high affinity for ammonia were present in the reactors with lower ammonium levels, whereas AOB with a low affinity to ammonia existed in the reactors with higher ammonium levels.

Keywords Ammonia-oxidizing archaea · Ammonia-oxidizing bacteria · *amoA* gene · Nitrifying activated sludge · Wastewater

Introduction

It had been believed for several decades that aerobic ammonia oxidation was mediated by only a group of chemolithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria (AOB). In the year 2004, it was revealed for the first time that autotrophic ammonia oxidation is not only restricted to the domain *Bacteria* but also occurs in the domain *Archaea*. Metagenomic studies demonstrated the presence of the archaeal ammonia monooxygenase (*amo*) gene that potentially encodes ammonia monooxygenase (AMO), a key enzyme in ammonia oxidation, indicating the potential role of archaea in the nitrification process in marine and terrestrial environments (Venter et al. 2004; Treusch et al. 2005). The ultimate confirmation of the presence of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and its activity was achieved when the first autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon was isolated by Konneke et al. (2005).

P. Sonthiphand
International Postgraduate Programs in Environmental
Management, Graduate School, Chulalongkorn University,
Bangkok, Thailand

P. Sonthiphand · T. Limpiyakorn
National Center of Excellence for Environmental and Hazardous
Waste Management, Chulalongkorn University,
Bangkok, Thailand

T. Limpiyakorn (✉)
Department of Environmental Engineering,
Faculty of Engineering, Chulalongkorn University,
Phayathai Road, Pathumwan,
Bangkok 10330, Thailand
e-mail: tawan.l@chula.ac.th

Like AOB, this AOA “*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*” grows chemolithoautotrophically by oxidizing ammonia to nitrite under mesophilic conditions and contains putative genes for all three subunits of AMO (i.e., *amoA*, *amoB*, and *amoC*). This led to the obtainment of enriched thermophilic and moderately thermophilic AOA, “*Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii*” and “*Candidatus Nitrososphaera gargensis*,” respectively (De La Torre et al. 2008; Hatzenpichler et al. 2008). Quantitative gene analysis revealed an abundance of the archaeal *amoA* gene that outnumbers those of AOB in seawater, estuarine sediments, soil, and aquarium biofiltration systems (Leininger et al. 2006; Wuchter et al. 2006; Caffrey et al. 2007; Urakawa et al. 2008). Besides natural environments, AOA have been detected in activated sludge bioreactors using specific polymerase chain reaction (PCR) primers targeting the archaeal *amoA* gene (Park et al. 2006). It is therefore debatable whether AOA play a key role in the global nitrogen cycle and the removal of nitrogen in the influent of wastewater treatment plants (WWTPs).

Past evidence suggests that the major concern when selecting the groups of AOB in enriched nitrifying activated sludge (NAS) is the ammonium concentration in the supplied inorganic media (Limpiyakorn et al. 2007). The reason for this is that the affinity constants for ammonia differ among distinct AOB species (Koops et al. 2003), which leads to the differences in the distribution patterns of AOB species in the environment. For example, members of the *Nitrosomonas oligotropha*, *Nitrosomonas communis*, and *Nitrosospira* clusters are the most common AOB found in systems with low ammonium concentrations (Dionisi et al. 2002; Limpiyakorn et al. 2005, 2006a, b), whereas members of the *Nitrosomonas europaea* cluster are found in systems with high ammonium concentrations (Juretschko et al. 1998). This leads to a question of this study, whether the ammonium level influences the consortium of AOA in enriched NAS. In this study, the sludge taken from a municipal WWTP, which possessed the same ranges of numbers of the archaeal *amoA* gene and the bacterial *amoA* gene, was enriched in three continuous-flow reactors receiving an inorganic medium containing different ammonium concentrations: 2, 10, and 30 mM $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (28, 140, and 420 mgNl^{-1}). The abundance and communities of AOA and AOB in enriched NASs were monitored at days 60 and 360 of the operation.

Materials and methods

Seed sludge

The seed sludge taken from a WWTP in Bangkok, Thailand came from one of the plant's sludge buffer tanks in a cyclic activated sludge system, which is a modification of a

sequencing batch reactor. The 1-year-average biological oxygen demand (BOD) and ammonium concentrations in the influent were 31.5 mg l^{-1} and 9.1 mgNl^{-1} , and the BOD and ammonium removal efficiencies of this system were 81.6% and 86.1%, respectively. The nitrite concentration in the aeration tank was 0.01 mgN/l , and the pH was controlled within the range of 6 to 7.

Enrichment of the nitrifying activated sludge by an inorganic medium containing different ammonium concentrations

Sludge taken from the municipal WWTP was enriched in three continuous flow reactors without sludge recycling. Each reactor received an inorganic medium containing a different ammonium concentration: 2, 10, and 30 mM $\text{NH}_4^+\text{-N}$ corresponding to 28, 140, and 420 mgNl^{-1} in NAS2, NAS10, and NAS30, respectively. The total volume of each reactor was 4 l, with an effective volume of 2 l. All three reactors were operated under the appropriate conditions for enhancing the nitrification process. The temperature was controlled between 25 °C and 30 °C, the DO concentration was kept above 2 mg l^{-1} at all times, and the pH was adjusted to be in the range of 7.5 to 8.0 using 1 N HCl and 1 N NaOH. Mixing in the reactors was performed by rotators at a speed of 300 rpm to prevent aggregation and sedimentation. A fixed dilution rate of 0.01 h^{-1} , equal to a hydraulic retention time and a solid retention time of 100 h, was used to supply the inorganic medium into the reactors. Each liter of inorganic medium contained $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 40 mg $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 mg $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 200 mg KH_2PO_4 , 1 mg $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 mg $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.02 mg $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mg $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 0.002 mg $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Limpiyakorn et al. 2007). The pH value was adjusted to be within the range of 7.5 to 8.0 using 40 g l^{-1} NaHCO_3 .

Measurement of the ammonium, nitrite, and nitrate concentrations

The ammonium, nitrite, and nitrate concentrations were measured by using the phenate method, colorimetric method, and ultraviolet spectrophotometric screening method, respectively, following the standard procedure (Clesceri et al. 1998) applied to UV visible spectrophotometers (Thermo Electron Corporation, UK).

Preparation of the samples and DNA extraction

Each enriched NAS with 2 mg dry weight was transferred to 1.7-ml tubes and centrifuged at 14,000 rpm for 10 min. The supernatant was removed, and the pellet was kept at -20 °C until analyzed. DNA was extracted from the samples using

Fast-DNA SPIN kits for soil (QBiogene, USA) according to the manufacturer's instructions. The product from the DNA extraction was verified by electrophoresis in 1.5% agarose (Bio-Rad, Spain). Triplicate DNA of each sample were extracted and pooled to minimize bias.

Real-time PCR quantification

The extracted DNA was prepared for four different tenfold dilutions; each dilution was quantified in duplicates using an Mx3005P instrument (Stratagene, USA) with a Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene, USA). Quantification of archaeal *amoA* genes was performed using the primers Arch-amoAF (5'-STAATGGTCTGGCTT AGACG-3') and Arch-amoAR (5'-GCGGCCATCCA TCTGTATGT-3'; Francis et al. 2005). The PCR mixture contained 12.5 μ l of the QPCR master mix, 1 μ l of each primer (0.4 μ M), and 1 μ l of each sample, which composed a total volume of 25 μ l. The PCR conditions were 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 60 s at 95 °C, 60 s at 56 °C, 30 s at 72 °C, and data capture for 15 s at 78 °C. Standard DNA was the pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) possessing the *amoA* gene fragment of archaea *amoA* clone AOA-S-4 (accession number of GQ390338) prepared in a range of 2.7×10^1 to 2.7×10^7 copies. Bacterial *amoA* genes were quantified using the primers amoA 1F (5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3') and amoA 2R (5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3'; Rotthauwe et al. 1997). The PCR mixtures and conditions were the same as those used for the archaeal *amoA* genes. Standard DNA was pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) with an inserted *amoA* gene fragment of the clone AOB-NAS10-360-4 (accession number of GU980134) prepared in a range of 4×10^1 to 4×10^7 copies. The AOB 16S rRNA gene was quantified using the primers CTO 189A/Bf (5'-GGAGRAAAGCAGGGGATCG-3'), CTO189Cf (5'-GGAGGAAAGTAGGGGATCG-3'), and CTO 654r (5'-CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC-3'; Kowalchuck et al. 1997). The PCR mixture and conditions were identical to the mixture and conditions used for the archaeal and bacterial *amoA* genes. Standard DNA was prepared using the pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) containing the 16S rRNA gene fragment of *Nitrosospira multififormis* (an accession number of X90822) in the range of 7.2×10^1 to 7.2×10^7 copies. For every real-time PCR reaction performed, dissociation curves were analyzed and plotted to confirm the single target fragment of the PCR amplified products. To calculate the cell numbers of AOB from the quantified numbers of the *amoA* and 16S rRNA genes, it was assumed, on the basis of the numbers of *amoA* and 16S rRNA gene copies found in isolated AOB, that AOB possessed one copy of the 16S rRNA gene and 2.5 copies of *amoA* gene per genome (Aakra et al. 1999; Norton et al. 2002).

Analysis of ammonia-oxidizing archaeal communities

Primers Arch-amoAF and Arch-amoAR were used to amplify 635 bp of the archaeal *amoA* gene fragments. The PCR mixture was prepared using a Takara polymerase (Takara Bio Inc., Japan) following the manufacturer's instructions. PCR amplification was performed in a thermal cycler (Biorad Laboratories, USA) for 2 min at 94 °C followed by 30–35 cycles for 30 s at 94 °C, 45 s at 53 °C, and 45 s at 72 °C, followed by 10 min of final extension at 72 °C. Replicates of PCR amplification were pooled and purified by gel electrophoresis using a NucleoSpin Extract II Kit (Clontech Laboratories Inc., USA). Then, the purified PCR products were cloned using the pGEM-T Easy vector system (Promega, USA). For each sample, 20 to 30 clones were randomly selected for sequencing at Macrogen Inc., Korea.

Analysis of ammonia-oxidizing bacterial communities

The primers CTO189f and CTO654r were used to amplify 465 bp of the AOB 16S rRNA gene fragment belonging to betaproteobacteria. The extracted DNA was PCR amplified using the primer sets with a GC clamp at the 5' end of the forward primer. The PCR mixture was prepared using a Takara polymerase (Takara Bio Inc., Japan) following the manufacturer's guidelines. PCR amplification was performed in a thermal cycler (Biorad Laboratories, USA) for 2 min at 94 °C followed by 30 to 35 cycles of 30 s at 94 °C, 45 s at 55 °C, and 45 s at 72 °C, followed by 5 min of final extension at 72 °C. Polyacrylamide gels (8% of a 37.5:1 acrylamide: bisacrylamide mixture) with a gradient of 30% to 70% of urea–formamide were made by using a gradient wheel (Biorad Laboratories, USA) following the manufacturer's instructions. Gels were run on the D Code system (Biorad Laboratories, USA) at 75 V for 16 h at a constant temperature of 60 °C in a $1 \times$ TAE buffer. After electrophoresis, the gels were stained with ethidium bromide (Amersham Biosciences, Germany) and analyzed by gel documentation (Dolphin-DOC Plus, USA). All bands were excised and dissolved in 30 μ l of sterilized water. They were stored at 4 °C overnight to recover the DNA. The DNA eluted from the bands excised from the DGGE gels were reamplified for 20–25 cycles and run on new DGGE gel until they were purified. Then, the DNA eluted from the purified bands was amplified in 25 cycles using the primer set lacking the GC clamp, and the products were purified using a NucleoSpin Extract II Kit (Clontech Laboratories Inc., USA) and analyzed for sequencing at Macrogen Inc., Korea.

Nucleotide sequence accession number

The analyzed sequences obtained from this study have been deposited in the GenBank database under the accession numbers GQ390309–GQ390338, GU936642–GU936656

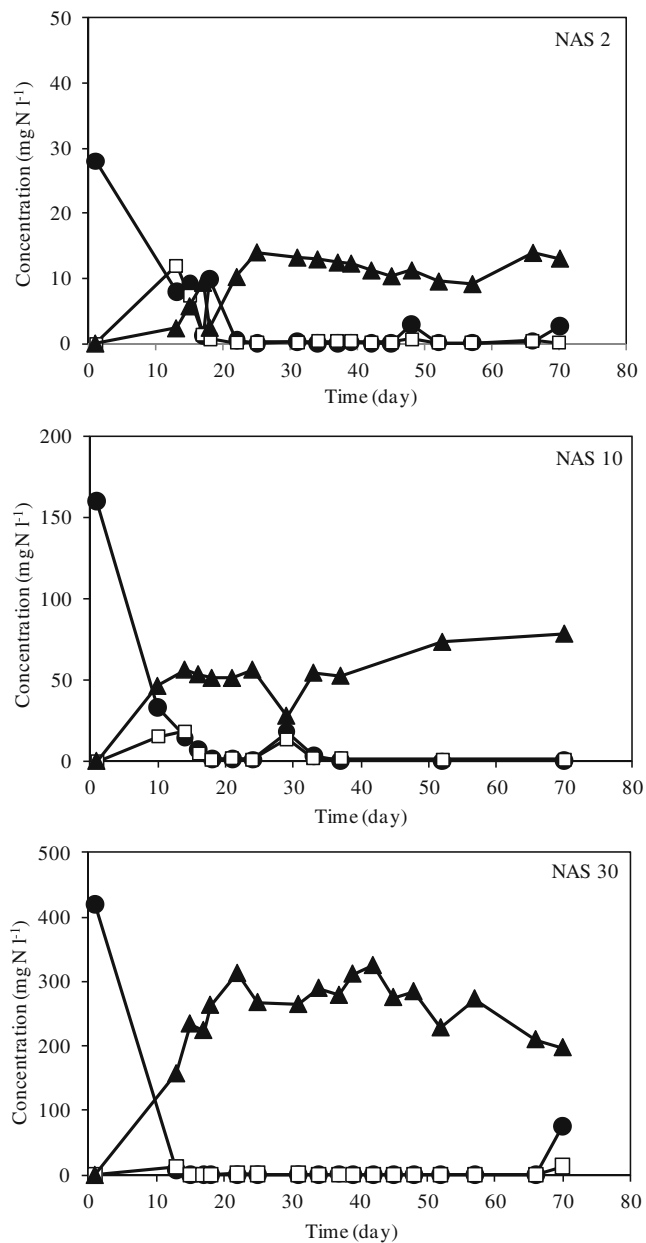


Fig. 1 Concentrations of ammonium (black circle), nitrite (white square), and nitrate (black triangle) during the first 80 days of enrichment of the nitrifying activated sludge

(archaeal *amoA* gene), and GQ390301–GQ390308, GU936638–GU936641 (bacterial 16S rRNA gene).

Results

Abundance of archaeal and bacterial *amoA* genes in the seed sludge

Quantitative real-time PCR showed that the AOA *amoA* gene ($5.70 \times 10^6 \pm 3.30 \times 10^5$ copiesmgsludge⁻¹) occurred in

the seed sludge with the number nearly identical to AOB *amoA* gene ($8.60 \times 10^6 \pm 7.64 \times 10^5$ copiesmgsludge⁻¹). Confirmation of the AOB number was performed using the primers targeting the betaproteobacterial AOB 16S rRNA gene ($1.17 \times 10^6 \pm 2.44 \times 10^5$ cellsmgsludge⁻¹). This result was fairly consistent with that of the AOB *amoA* gene ($3.44 \times 10^6 \pm 3.06 \times 10^5$ cellsmgsludge⁻¹).

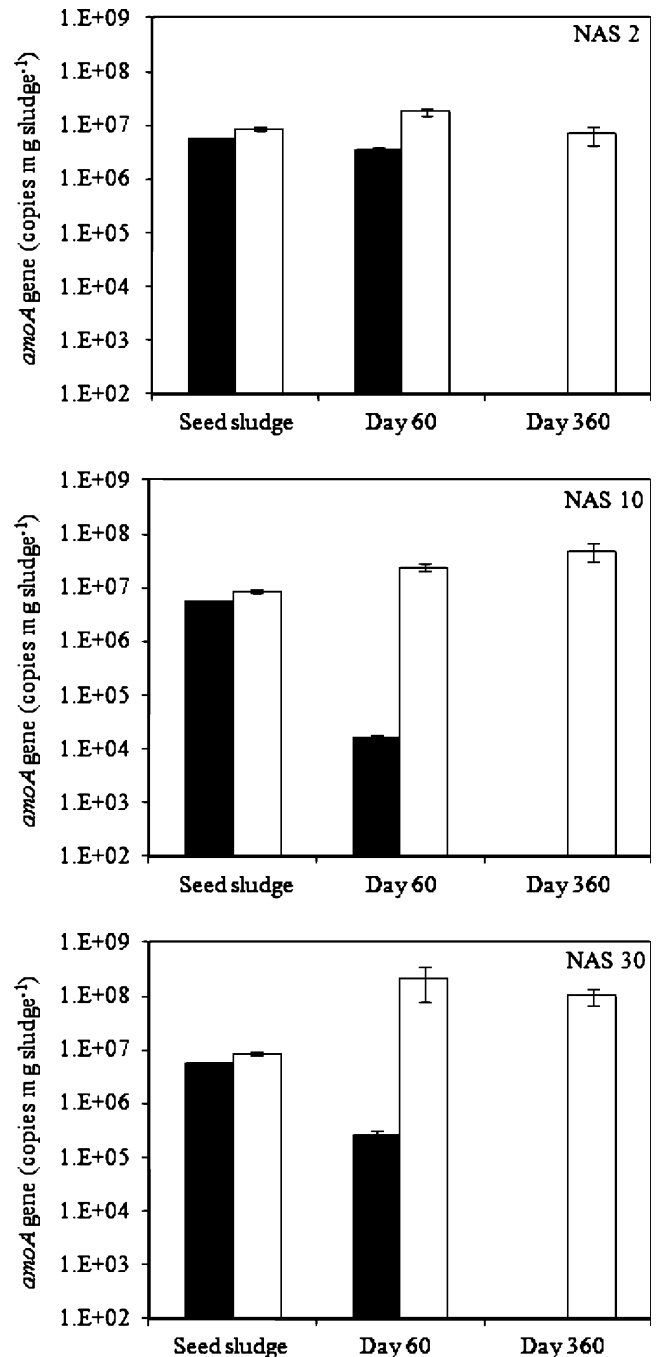


Fig. 2 Abundance of AOA (black square) and AOB (white square) *amoA* genes in the seed sludge and enriched nitrifying activated sludge samples

Enrichment of nitrifying activated sludge

During the operational period of 360 days, ammonium, nitrite, and nitrate concentrations were monitored. Figure 1 shows the concentrations of ammonium, nitrite, and nitrate during the first 80-day run. Ammonium concentrations in all three reactors reached steady-state conditions (0.06 ± 0.04 , 0.51 ± 0.33 , and 0.25 ± 0.10 mgNl⁻¹ for NAS2, NAS10, and NAS30, respectively) after certain periods of operation (i.e., after 22 days of operation for NAS2, after 37 days for NAS10, and after 15 days for NAS30). Nitrite concentrations were detected in all reactors during the start-up periods (i.e., after 13 days of operation for NAS2, 10 days for NAS10, and 13 days for NAS30); then, they gradually decreased to below the limit of detection after 18 days of operation. Nitrate concentrations were detected in all reactors, and the concentrations gradually increased until they reached their steady-state conditions: it took 22 days for NAS2, 14 days for NAS10, and 15 days for NAS30. Steady-state conditions of nitrogen were maintained until the end of the experiment of 360 days (data not shown). At days 60 and 360, the enriched NASs were collected to analyze the abundance and communities of AOA and AOB.

Abundance of archaeal and bacterial *amoA* genes in the enriched nitrifying activated sludge

Results in Fig. 2 indicate a shift in the numbers of archaeal and bacterial *amoA* genes along the time of operation in all three enriched NAS. As mentioned earlier, the seed sludge contained a nearly equal number of AOA *amoA* genes to AOB *amoA* genes. After an operation time of 60 days, the proportions of ammonia-oxidizing microorganisms in each NAS shifted distinctively from those of the original consortium in the seed sludge. In NAS2, the amount of AOA *amoA* genes ($3.60 \times 10^6 \pm 4.27 \times 10^5$ copiesmg sludge⁻¹) was still in the same order of magnitude as that of the AOB *amoA* genes ($1.78 \times 10^7 \pm 2.55 \times 10^6$ copiesmg sludge⁻¹). However, the number of AOA *amoA* genes for NAS10 and NAS30 decreased significantly ($1.62 \times 10^4 \pm 1.93 \times 10^3$ and $2.69 \times 10^5 \pm 4.26 \times 10^4$ copiesmg sludge⁻¹,

respectively) as compared to the AOB *amoA* genes ($2.44 \times 10^7 \pm 4.25 \times 10^6$ and $2.22 \times 10^8 \pm 1.39 \times 10^8$ copiesmg sludge⁻¹, respectively). When the reactor operation was prolonged to 360 days, bacterial *amoA* was more abundant ($6.97 \times 10^6 \pm 2.57 \times 10^6$, $4.93 \times 10^7 \pm 1.82 \times 10^7$, and $1.05 \times 10^8 \pm 3.52 \times 10^7$ copiesmg sludge⁻¹ for NAS2, NAS10, and NAS30, respectively) than archaeal *amoA* (<LOD of 1.70×10^2 copiesmg sludge⁻¹). This observation was made in all three NAS, with more than a four order of magnitude difference. Confirmations of the AOB numbers in all samples were carried out using the primer set targeting betaproteobacterial AOB 16S rRNA genes. Table 1 shows the well-matched results when calculated using the *amoA* genes and 16S rRNA genes (with the ratio for each sample ranging from 0.49 to 2.95).

Communities of ammonia-oxidizing archaea in the seed sludge and enriched nitrifying activated sludge

Although some samples of the real-time PCR quantification show values below the LOD for archaeal *amoA* genes (i.e., NAS2, 360 days; NAS10, 360 days; and NAS30, 360 days), PCR-amplified products could be obtained at the end point of the amplification when a regular PCR reaction was performed with a Takara polymerase under lower annealing temperature. From each clone library, 20 to 30 clones were randomly selected for sequencing; in total, 159 clones were sequenced. All sequences were calculated for an arrangement of operational taxonomic units (OTUs), based on 100% OTU identities by the DOTUR program (Schloss and Handelsman 2005). Any sequences from the same clone library showing 100% OTU identities were grouped into one OTU. Consequently, 46 unique OTUs were recovered: six OTUs for the seed sludge and three to eight OTUs for each enriched NAS sample. Archaeal *amoA* sequences were tested for their sequence identity using the BLAST program, and the results show 88% to 100% identity at the nucleotide level to previously reported sequences in the GenBank database. Our 159 archaeal *amoA* sequences and reference sequences were aligned and phylogenetic analyzed using three different methods (i.e., the distance matrix, maximum parsimony, and maximum likelihood) in

Table 1 Calculated numbers of AOB in the seed sludge and enriched nitrifying activated sludge samples based on the *amoA* gene and 16S rRNA gene

LOD for the AOB *amoA* gene, 80 cellsmg sludge⁻¹. LOD for the AOB 16S rRNA gene, 2.20×10^2 cellsmg sludge⁻¹

Sample	Day	<i>amoA</i> gene (cellsmg sludge ⁻¹)	16S rRNA gene (cellsmg sludge ⁻¹)
Seed sludge		$3.44 \times 10^6 \pm 3.06 \times 10^5$	$1.17 \times 10^6 \pm 2.44 \times 10^5$
NAS2	Day 60	$7.13 \times 10^6 \pm 1.02 \times 10^6$	$5.09 \times 10^6 \pm 7.99 \times 10^5$
	Day 360	$2.79 \times 10^6 \pm 1.03 \times 10^6$	$2.57 \times 10^6 \pm 6.05 \times 10^5$
NAS10	Day 60	$9.74 \times 10^6 \pm 1.70 \times 10^6$	$1.97 \times 10^7 \pm 4.88 \times 10^6$
	Day 360	$1.97 \times 10^7 \pm 7.30 \times 10^6$	$1.07 \times 10^7 \pm 4.58 \times 10^6$
NAS30	Day 60	$8.87 \times 10^7 \pm 5.58 \times 10^7$	$1.44 \times 10^8 \pm 1.61 \times 10^8$
	Day 360	$4.20 \times 10^7 \pm 1.41 \times 10^7$	$7.34 \times 10^7 \pm 8.43 \times 10^6$

Table 2 Communities of AOA in the seed sludge and enriched nitrifying activated sludge samples based on the *amoA* gene sequence

AOA cluster	Seed sludge	NAS2		NAS10		NAS30	
		Day 60	Day 360	Day 60	Day 360	Day 60	Day 360
Cluster 1.1a-1							
Cluster 1.1a-2		+	+				
Cluster 1.1a-3		+		+			
Cluster 1.1a-4				+	++		+
Cluster 1.1a-5							
Cluster 1.1b-1			+++++++	+	+++++++		+++++++
			+++++		+++++++		+++++
Cluster 1.1b-2							
Cluster 1.1b-3							
Cluster 1.1b-4	+++++						
Cluster 1.1b-5	+++++++	+++++++	+	+++++++	++	+++++++	
	++++	+++++++		+++++++		+++++++	
				+++		+++++++	

+ present (the amount of symbols represents the number of clones)

the ARB program package (version 2.0; Department of Microbiology, Technische Universitat Munchen [<http://www.arb-home.de>]). The results from all approaches exhibited the same grouping of AOA clusters and tree topology (data not shown). The AOA cluster was defined based on 14% nucleotide cutoffs calculated by the DOTUR program. All AOA analyzed sequences in this study fell within one of six AOA clusters: 1.1a-2, 1.1a-3, 1.1a-4, 1.1b-1, 1.1b-4, and 1.1b-5 (Table 2 and Fig. 3). It is noted that AOA sequences found fell mainly into soil lineage (Group 1.1b) with some sequences in marine lineage (Group 1.1a), but no sequence related to a thermophilic AOA lineage (ThAOA) was found.

Communities of ammonia-oxidizing bacteria in the seed sludge and enriched nitrifying activated sludge

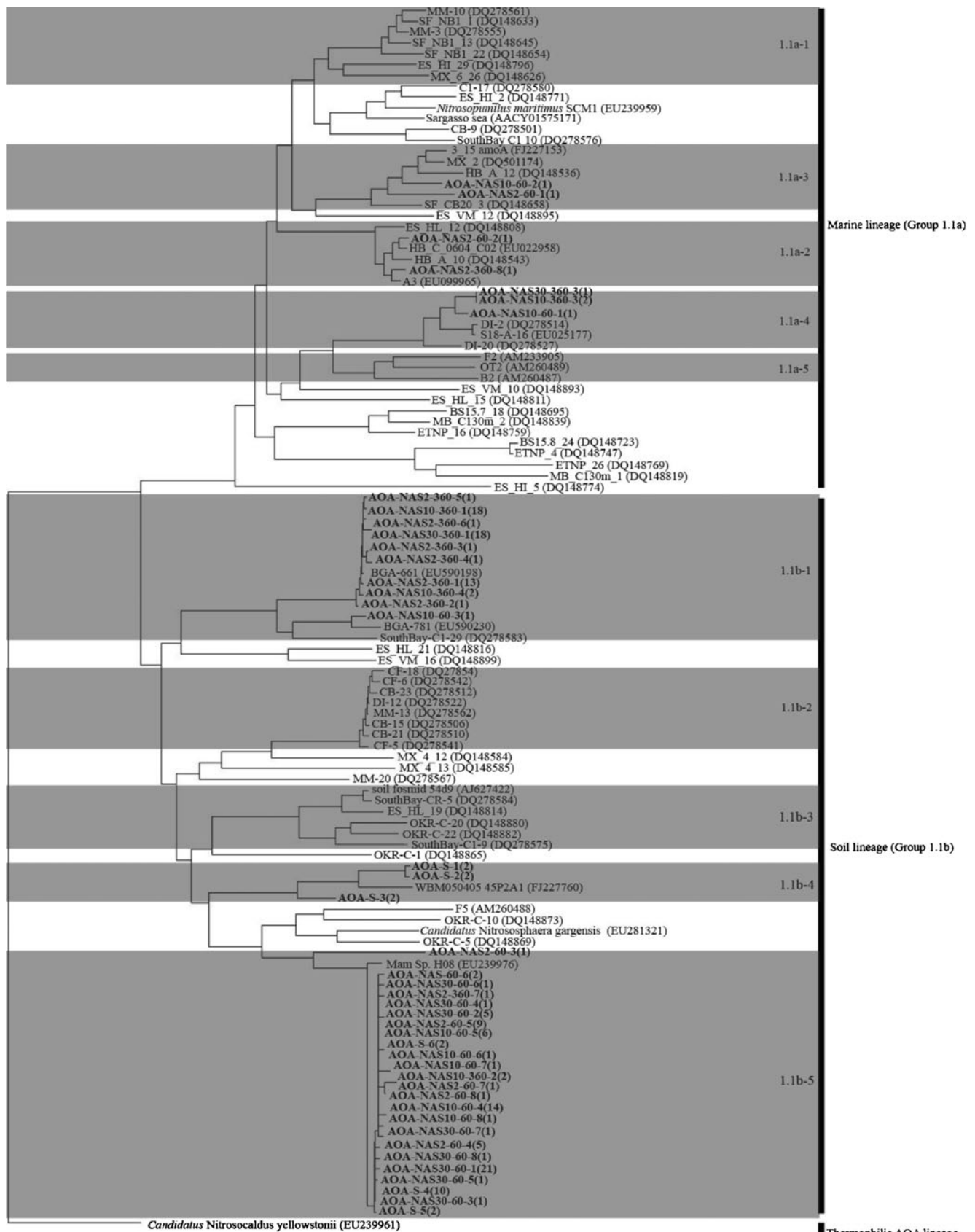
All recovered bands of the AOB 16S rRNA gene from DGGE were cut, reamplified, and run on new gels until they were purified. A total of 12 bands were found and sent for sequencing. All sequences were tested for their sequence identity using the BLAST program, and the results showed 96% to 99% identity at the nucleotide level to the previously reported sequences in the GenBank database. All analyzed sequences along with the reference sequences from the SSU rRNA database were aligned and put through phylogenetic analyses using three different methods (i.e., the distance matrix, maximum parsimony, and maximum likelihood) in the ARB program package. All phylogenetic analyses exhibited the same grouping of AOB sequences (data not shown). The presented tree in Fig. 4 was constructed by adding our approximately 400 bp

sequences into the distance tree, which was previously constructed based on a comparison of >1,000 bp sequences of reference AOB with *Escherichia coli* (J01859) used as an outgroup sequence. All analyzed sequences recovered from our samples fell into four clusters: the unknown *Nitrosomonas* cluster, *N. europaea* cluster, *N. communis* cluster, and *N. oligotropha* cluster (Table 3). The seed sludge taken from the municipal WWTP contained members of the *N. communis* and *N. oligotropha* clusters. After the seed sludge was enriched for 60 days, members of both clusters disappeared from all enriched NAS samples. In NAS2 and NAS10, the unknown *Nitrosomonas* cluster was found, while sequence types of the *N. europaea* cluster were recovered from NAS10 and NAS30. These patterns of AOB communities were maintained throughout the study, except that on the day 360, AOB of *N. europaea* cluster in NAS10 shifted to *N. communis* cluster.

Discussion

In this study, a significant number of AOA *amoA* genes were found for the first time in wastewater treatment facilities. This suggests the potential role of AOA in the removal of nitrogen in WWTPs. AOA is proposed to be

Fig. 3 A neighboring joining tree showing *amoA* genes of AOA. Sequences of AOA *amoA* genes retrieved in this study are shown in bold. The second abbreviation represents the samples followed by the sequence numbers of the samples (e.g., AOA-NAS10-60-3 refers to sequence 3 of NAS10 taken on day 60). The amounts of sequences of each OTU are displayed by the number in parentheses



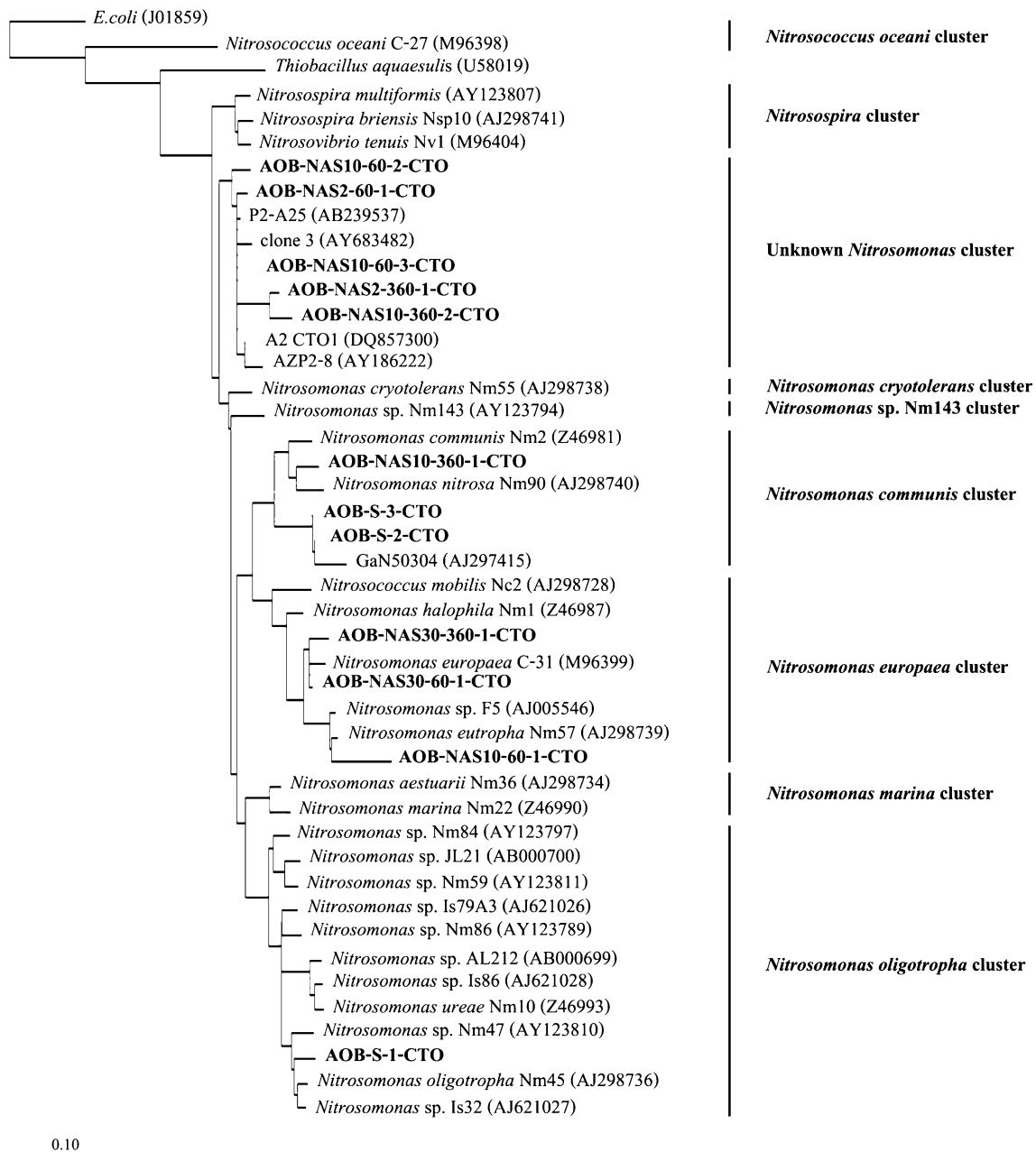


Fig. 4 Phylogenetic tree showing the 16S rRNA genes of AOB belonging to betaproteobacteria constructed by adding approximately 400 bp sequences from the seed sludge and enriched NASs using the parsimony method into the tree previously constructed by the neighbor-joining (distance matrix) method using >1,000 bp sequences

of described AOB. The sequences of the DGGE bands in this study are shown in *bold*. The *second abbreviation* represents the sample followed by the band number of the sample (e.g., AOB-NAS10-60-3 refers to band 3 of NAS10 taken on day 60)

one of the possible major ammonia oxidizers in low ammonium-containing environments (Erguder et al. 2009). The municipal WWTPs of this study received an influent with low ammonium concentration of 9.1 mgNI^{-1} , and the ammonium level in an effluent was found to be low as well (1.3 mgNI^{-1}). The seed sludge mainly contained the archaeal *amoA* sequences of cluster 1.1b-5; the minor sequences fell into cluster 1.1b-4. This finding is contrary

to those previously reported by Park et al. (2006). Park et al. suggested that clusters 1.1a-4 and 1.1b-2 (clusters B and D in the Park et al. study) might be distinguished groups of AOA found only in WWTPs, with cluster 1.1b-2 identified as a common AOA due to it being so widespread in the WWTPs in their study.

On day 60 of operation, the patterns of the ammonia-oxidizing consortiums varied among the reactors. General-

Table 3 Communities of AOB in the seed sludge and enriched nitrifying activated sludge based on the 16S rRNA gene sequence

AOB cluster	Seed sludge	NAS2		NAS10		NAS30	
		Day 60	Day 360	Day 60	Day 360	Day 60	Day 360
<i>Nitrosococcus oceani</i> cluster							
<i>Nitrospira</i> cluster							
Unknown <i>Nitrosomonas</i> cluster		+	+	++	+		
<i>Nitrosomonas cryototerans</i> cluster							
<i>Nitrosomonas</i> sp. Nm143 cluster							
<i>Nitrosomonas communis</i> cluster	++				+		
<i>Nitrosomonas europaea</i> cluster				+		+	+
<i>Nitrosomonas marina</i> cluster							
<i>Nitrosomonas oligotropha</i> cluster	+						

+ present (the amount of symbols represents the number of bands)

ly, the ammonium levels are considered to relate directly to the inclusion of ammonia-oxidizing microorganisms in the environments. It is found that the ammonium concentrations after reaching steady-state conditions in all three reactors varied with significantly lower levels in NAS2 than others (0.06 ± 0.04 , 0.51 ± 0.33 , and 0.25 ± 0.10 mgNl^{-1} for NAS2, NAS10, and NAS30, respectively). The half-saturation constant (K_s) for ammonia of AOA is very much lower than those of AOB. The only isolated AOA, “*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*,” shows the K_s for total ammonium of $1.86 \mu\text{gNl}^{-1}$ (133 nM; Martens-Habbena et al. 2009). The K_s values for AOB isolates vary among the species, but they fall in a range of 0.4 – 27.4 mgNl^{-1} (0.03 – 1.96 mM; Keen and Prosser 1987; Laanbroek et al. 1994; Stehr et al. 1995; Martens-Habbena et al. 2009). As results, AOA are likely to be supported by the ammonium levels found in NAS2, but not NAS10 and NAS30. By day 360, AOA *amoA* genes were not detected in all reactors leading to bacterial *amoA* being at least four orders of magnitude more abundant than archaeal *amoA*. This could be attributed from several factors during reactor operation. One possible reason is a lack of vitamins and other trace elements necessary for the growth of archaea in the inorganic medium supplied. Nicol and Schleper (2006) suggested that AOA media should require particular additives such as vitamins and trace elements. However, it must be noted that so far there is no clear scientific evidence supporting the role of vitamins for the AOA growth. Therefore, other factors, such as operational parameters, cannot be omitted. To compare with 360-day reactor operation, sludge was taken again from the WWTP in the next 1 and 2 years. The abundance of AOA and AOB *amoA* genes was analyzed. It is suggested that the sludge from both sampling periods still contained significant numbers of AOA *amoA* genes ($3.15 \times 10^5 \pm 1.31 \times 10^5$ and $3.14 \times 10^6 \pm 4.53 \times 10^6$ copies mgsludge^{-1} , for year 1

and year 2 samples) and AOB *amoA* genes ($1.49 \times 10^6 \pm 3.89 \times 10^5$ and $8.66 \times 10^4 \pm 6.87 \times 10^4$ copies mgsludge^{-1} , respectively) as did for the sludge used as the seed for the NASs. This finding leads to the concern if enriched NAS prepared by traditional protocols, as in this study, can be good representatives for ammonia-oxidizing consortiums in actual WWTPs. In recent years, enriched NAS has been used extensively in laboratory studies to representatively describe the metabolic and cometabolic behavior of ammonia-oxidizing microorganisms of the actual WWTPs. The ammonia-oxidizing activity per cell is estimated using the AOB numbers calculated from the 16S rRNA genes to crosscheck the activity found in previous studies. In this case, activity of AOA (in all reactors at day 60) is neglected, as at the time the previous studies performed, AOA was not known to be available. The ammonia-oxidizing activity per cell of AOB was 40.91, 50.66, and 20.50 $\text{fmol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ on day 60 and 80.94, 93.28, and 40.29 $\text{fmol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ on day 360 for NAS2, NAS10, and NAS30, respectively. These values do not far differ from those reported in the past: 0 – 49.6 $\text{fmol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Limpiyakorn et al. 2005) for AOB in municipal WWTPs and 9 – 23 $\text{fmol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ for AOB isolates (Belser and Schmidt 1980).

Analysis of AOB communities reveals a shift in the AOB communities from the seed sludge to the enriched NASs, and the communities of AOB in each NAS varied significantly. AOB with high and moderate affinities to free ammonia (i.e., the *N. oligotropha* cluster, *N. communis* cluster, and unknown *Nitrosomonas* cluster) were recovered from the seed sludge, NAS2, and NAS10, whereas AOB with a low affinity to free ammonia (namely, the *N. europaea*–*Nitrosococcus mobilis* cluster) were retrieved from NAS10 and NAS30. *N. oligotropha*'s high affinity to free ammonia (0.4 – 1.1 mgNl^{-1} NH_4^+ plus NH_3 , 0.030 – 0.075 mM, Stehr et al. 1995) tends to make it the dominant AOB in oligotrophic environments, especially in WWTP

sludge with low ammonium concentrations (Dionisi et al. 2002; Limpiyakorn et al. 2005, 2006a). Members of the *N. communis* cluster are noted for their moderate affinity to free ammonia, but often found in WWTPs receiving influent with low ammonium concentrations (Limpiyakorn et al. 2006b). In the case of the unknown *Nitrosomonas* cluster, there is no available isolate leading to information on the ammonia affinity value (K_s) of AOB in this cluster. However, related information of this AOB cluster is accessible when using molecular evidence with environmental samples. Clone A2_CTO1 (DQ857300), clone 3 (AY683482), and clone P2-A25 (AB239537) were recovered from a municipal sewage plant, an aquarium biofilter, and river sediments (Grommen et al. 2005; Nakamura et al. 2006; Geets et al. 2007). All of these clones were obtained from environments with mid-to-low ammonium concentrations implying that the AOB of the unknown *Nitrosomonas* cluster has a high affinity to free ammonia. The molecular analysis of the isolated AOB species demonstrated that the *N. europaea* cluster contains AOB with a low affinity to free ammonia (5.6 mgNI⁻¹, 0.4 mM, 12.3–27.4 mgNI⁻¹, 0.88–1.96 mM, 7.7 mgNI⁻¹, 0.55 mM; Keen and Prosser 1987; Laanbroek et al. 1994; Martens-Habbena et al. 2009). This AOB cluster is the most common AOB found in WWTPs with high ammonium concentrations (Pynaert et al. 2003). It is known that the presence of AOB species results from the affinity to ammonia of the AOB species and the ammonium concentration in the reactors. However, this may not be true for NAS10 and NAS30. In these two reactors, the ammonium concentrations in the reactors (0.51±0.33 and 0.25±0.10 mgNI⁻¹) were found to be much lower than the K_s value of *N. europaea* cluster. However, this AOB existed in both reactors. A previous study gave rise to the question of whether the ammonium level or/and ammonium removal load are factors influencing the inclusion of AOB species (Limpiyakorn et al. 2007). When considering the volumetric ammonium removal loads of the NASs (7, 33.6, and 99.4 mgNI⁻¹day⁻¹ for NAS2, NAS10, and NAS30, respectively), it is found the *N. europaea* cluster occurred when the volumetric removal loads of ammonium were higher than 33.6 mgNI⁻¹day⁻¹, which corresponded to the previous report by Limpiyakorn et al. (2007).

Although the abundance of AOA in the enriched NASs was found to vary, the AOA communities seemed to be stable among the enriched NASs. The results differ for AOB: the majority of the clones obtained from all enriched NASs on day 60 fell into cluster 1.1b-5 and then found in cluster 1.1b-1 on day 360. DOTOURL analysis with our analyzed sequences from cluster 1.1b-5 and 1.1b-1 exhibited only one unique OTU at a 2% cutoff for each AOA cluster. This suggests that the ammonium levels in the NASs did not influence the communities of AOA, as it

affected the AOA abundance. The information on substrate affinity to the free ammonia of AOA is limited since there is only one available AOA culture that has been isolated from the environment (Konneke et al. 2005).

The sequence closest to that of our AOA in cluster 1.1b-5 was found in the Mammoth hot spring sediment, located in a moderately thermal environment (from 42°C to 50°C; De La Torre et al. 2008). The temperature of the hot spring was higher than that of the municipal WWTP and its continuous flow reactors used for enriching the NASs (from 25°C to 30°C). Interestingly, members of AOA cluster 1.1b-5 might be tolerant to a relatively wide temperature range, meaning that they could survive in environments of 25°C to 50°C. In addition, it is interesting to note that some AOA sequences found in our study are closely related to the AOA sequences retrieved from saline environments. AOA of clusters 1.1a-2, 1.1a-3, and 1.1b-1 comprise the sequences recovered from coastal sediments, estuary sediments, marine sediments, and intertidal sandy flats (Francis et al. 2005; Park et al. 2006; Santoro et al. 2008). These results imply that some AOA clusters are salt tolerant and can exist in both salt and non-salt environments.

In conclusion, this study indicates the presence of a nearly identical level of AOA *amoA* genes to AOB *amoA* genes in a WWTP. The reason for this phenomenon is unclear due to the limited amount of studies to refer to. During the early operational period, day 0 to day 60, comparative abundance of AOA *amoA* genes to AOB *amoA* genes varied among the NASs, and this variation probably relied on the ammonium levels found in the reactors. However, AOA communities among the NASs at the same sampling periods were found to be similar. Unlike AOA, AOB communities were found to be dependent on the ammonium levels in the reactors.

Acknowledgements This work was supported by the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund) and the Thailand Research Fund under grant no. MRG5280086. Additionally, we would like to express our appreciation to the Bangkok Metropolitan Administration (BMA) for providing the seed sludge from one of its municipal WWTP. We also thank Professor Chongrak Polprasert for his guidance and Ms. Akiko Uyeda for her assistance in editing, polishing, and correcting the English language of our manuscript.

References

- Aakra A, Utaker JB, Nes IF (1999) RFLP of rRNA genes and sequencing of the 16S-23S rDNA intergenic spacer region of ammonia-oxidizing bacteria: a phylogenetic approach. *Int J Sys Bacteriol* 49:123–130
- Belser LW, Schmidt EL (1980) Growth and oxidation kinetics of three genera of ammonia oxidizing nitrifiers. *FEMS Microbiol Lett* 7:213–216

- Caffrey JM, Bano N, Kalanetra K, Hollibaugh JT (2007) Ammonia oxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia. *ISME J* 1:660–662
- Clesceri LS, Greenberg AE, Eaton AD (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th edn. APHA, AWWA and WEF, USA
- De La Torre JR, Walker CB, Ingalls AE, Konneke M, Stahl DA (2008) Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environ Microbiol* 10:810–818
- Dionisi HM, Layton AC, Harms G, Gregory IR, Robinson KG, Sayler GS (2002) Quantification of *Nitrosomonas oligotropha* like ammonia-oxidizing bacteria and *Nitrospira* spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR. *Appl Environ Microbiol* 68:245–253
- Erguder TH, Boon BN, Wittebolle L, Marzorati M, Verstraete W (2009) Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. *FEMS Microbiol Rev* 33:855–869
- Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, Santoro AE, Oakley BB (2005) Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:14683–14688
- Geets J, de Cooman M, Wittebolle L, Heylen K, Vanparys B, De Vos P, Verstraete W, Boon N (2007) Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:211–221
- Grommen R, Dauw L, Verstraete W (2005) Elevated salinity selects for a less diverse ammonia-oxidizing population in aquarium biofilters. *FEMS Microbiol Ecol* 52:1–11
- Hatzenpichler R, Lebedeva EV, Spieck E, Stoecker K, Richter A, Daims H, Wagner M (2008) A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2134–2139
- Juretschko S, Timmermann G, Schmid M, Schleifer KH, Pommerening-Roser A, Koops HP, Wagner M (1998) Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl Environ Microbiol* 64:3042–3051
- Keen GA, Prosser JI (1987) Steady state and transient growth of autotrophic nitrifying bacteria. *Arch Microbiol* 147:73–79
- Konneke M, Bernhard AE, De La Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437:543–546
- Koops HP, Purkhold U, Pommerening-Roser A, Timmermann G, Wagner M (2003) The lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria. In: Dworkin M (ed) *The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community*. Springer, New York
- Kowalchuck GA, Stephen JR, De Boer W, Prosser JI, Embley TM, Woldendorp JM (1997) Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the b subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl Environ Microbiol* 63:1489–1497
- Laanbroek HJ, Bodelier PLE, Gerards S (1994) Oxygen consumption kinetics of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter hamburgensis* grown in mixed continuous cultures at different oxygen concentrations. *Arch Microbiol* 161:156–162
- Leininger S, Urich T, Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442:806–809
- Limpiyakorn T, Shinihara Y, Kurisu F, Yagi O (2005) Communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo. *FEMS Microbiol Ecol* 54:205–117
- Limpiyakorn T, Kurisu F, Yagi O (2006a) Development and application of real-time PCR quantification for particular ammonia-oxidizing bacteria in full-scale sewage activated sludge systems and continuous enrichment cultures. *Appl Microbiol Biol* 72:1004–1013
- Limpiyakorn T, Kurisu F, Yagi O (2006b) Quantification of ammonia-oxidizing bacteria populations in full-scale sewage activated sludge systems and assessment of system variables affecting their performance. *Water Sci Technol* 54:91–99
- Limpiyakorn T, Kurisu F, Sakamoto Y, Yagi O (2007) Effects of ammonium and nitrite on communities and populations of ammonia-oxidizing bacteria in laboratory-scale continuous-flow reactors. *FEMS Microbiol Ecol* 60:501–512
- Martens-Habbena W, Berube PM, Urakawa H, de la Torre JR, Stahl DA (2009) Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying archaea and bacteria. *Nature* 461:976–981
- Nakamura Y, Satoh H, Kandaichi T, Okabe S (2006) Community structure, abundance, and in situ activity of nitrifying bacteria in river sediments as determined by the combined use of molecular techniques and microelectrodes. *Environ Sci Technol* 40:1532–1539
- Nicol GW, Schleper C (2006) Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *Trends Microbiol* 14:207–212
- Norton JM, Alzerreca JJ, Suwa Y, Klotz MG (2002) Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Arch Microbiol* 177:139–149
- Park HD, Wells GF, Bae H, Criddle CS, Francis CA (2006) Occurrence of ammonia oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Appl Environ Microbiol* 72:5643–5647
- Pynaert K, Smets BF, Wyffels S, Beheydt D, Siciliano SD, Verstraete W (2003) Characterization of an autotrophic nitrogen-removing biofilm from a highly loaded lab-scale rotating biological contactor. *Appl Environ Microbiol* 69:3626–3635
- Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W (1997) The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol* 63:4704–4712
- Santoro AE, Francis CA, De Sieyes NR, Boehm AB (2008) Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across physicochemical gradients in a subterranean estuary. *Environ Microbiol* 10:1068–1079
- Schloss PD, Handelsman J (2005) Introducing DOTUR, a computer-program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol* 71:1501–1506
- Stehr G, Bottcher B, Dittberner P, Rath G, Koops HP (1995) The ammonia oxidizing nitrifying population of the River Elbe estuary. *FEMS Microbiol Ecol* 17:177–186
- Treusch AH, Leininger S, Kletzin A, Schuster SC, Klenk HP, Schleper C (2005) Novel genes or nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol* 7:1985–1995
- Urakawa H, Tajima Y, Numata Y, Tsuneda S (2008) Low temperature decreases the phylogenetic diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in aquarium biofiltration systems. *Appl Environ Microbiol* 74:894–900
- Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers Y-H, Smith HO (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304:66–74
- Wuchter C, Abbas B, Coolen MJL, Herfort L, Van Bleijswijk J, Timmers P (2006) Archaeal nitrification in the ocean. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12317–12322

1 **Abstract**

2 The contribution of ammonia-oxidizing archaea to nitrogen removal in wastewater treatment
3 plants (WWTPs) remains unknown. This study investigated the abundance of archaeal
4 (AOA) and bacterial (AOB) *amoA* genes in eight of Bangkok’s municipal WWTPs. AOA
5 *amoA* genes ($3.28 \times 10^7 \pm 1.74 \times 10^7 - 2.23 \times 10^{11} \pm 1.92 \times 10^{11}$ copies l⁻¹ sludge) outnumbered AOB
6 *amoA* genes in most of the WWTPs even though the plants’ treatment processes, influent and
7 effluent characteristics, removal efficiencies, and operation varied. An estimation of the
8 ammonia-oxidizing activity of AOA and AOB suggests that AOA involved in autotrophic
9 ammonia oxidation in our WWTPs. Statistical analysis shows that the numbers of AOA
10 *amoA* genes correlated negatively to the ammonium levels in effluent wastewater, while no
11 correlation was found between the AOA *amoA* gene numbers and the oxygen concentrations
12 in aeration tanks. An analysis of the AOB sequences shows that AOB found in the WWTPs
13 limited to only two AOB clusters which exhibit high or moderate affinity to ammonia. In
14 contrast to AOB, AOA sequences of various clusters were retrieved and they were previously
15 recovered from a variety of environments, such as thermal and marine environments.

16

17 **Keywords**

18 ammonia-oxidizing archaea, ammonia-oxidizing bacteria, *amoA* gene, quantitative PCR,
19 wastewater treatment plant

20

21 **Introduction**

22 A nitrification-denitrification process is commonly employed by wastewater treatment plants
23 (WWTPs) to remove nitrogen from wastewater. Nitrification is a two-step process by which
24 ammonia is oxidized to nitrite by ammonia oxidizers and subsequently to nitrate by nitrite
25 oxidizers. Thereafter, nitrate is reduced to nitrogen gas and released into the atmosphere

1 by denitrifiers in a denitrification process. Ammonia oxidation is a rate-limiting step
2 since autotrophic ammonia oxidizers have comparatively slower growth rates and are more
3 sensitive to environmental factors than the microorganisms in the surrounding regimes.
4 This has led to several intensive and extensive studies on the ammonia-oxidizing
5 microorganisms in WWTPs to improve their activities and thus enhance the overall
6 performance of nitrogen removal at WWTPs.
7
8 The recent discovery of an archaeal ammonia monooxygenase (*amo*) gene in environments
9 [37, 38] and the obtainment of ammonia-oxidizing archaeal (AOA) cultures, namely
10 “*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*,” “*Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii*,” and
11 “*Candidatus Nitrososphaera gargensis*” [8, 13, 15] have changed the current understanding of
12 aerobic autotrophic ammonia oxidation. In the global nitrogen cycle, this process also occurs
13 in the domain *Archaea* and is not restricted to the domain *Bacteria*. In WWTPs, sequences of
14 archaeal *amoA* genes were found for the first time in five out of nine activated sludge
15 bioreactors in the US [28], followed by two WWTPs in Hong Kong [43]. The numbers of
16 AOA and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in WWTPs had been solely reported in a study
17 by Wells et al. [41]. Wells et al. [41] weekly monitored the comparative abundance of
18 archaeal and bacterial *amoA* genes in a municipal WWTP over the period of one year. An
19 AOA *amoA* gene was found in 8 of the 51 weekly samples, and in each of those eight
20 samples, its amount was always three orders of magnitude lower than that of the AOB *amoA*
21 gene [41]. Due to the very limited available information on AOA in WWTPs, this study
22 determined the abundance of archaeal and bacterial *amoA* genes in eight municipal WWTPs
23 in Bangkok. It must be noted that the specifics of the WWTPs differed; they had different
24 treatment processes, influent and effluent characteristics, removal efficiencies, and system
25 operation.

1 **Materials and methods**

2 **Municipal wastewater treatment plants**

3 Sludge samples were taken from the aeration basins of eight municipal WWTPs in Bangkok,
4 Thailand (Table 1). Based on their treatment capacities, the municipal WWTPs were
5 categorized into large and small plants. The large plants received influent with flow rates
6 ranging from 18 881 to 200 274 m³ d⁻¹ (plants L1-L4). Plants S1-S4 received much smaller
7 amounts of wastewater, ranging from 413 to 1442 m³ d⁻¹. The characteristics of the influent
8 wastewater of the large and small plants also differed. The small plants received higher
9 strength influent. Their influent biological oxygen demand (BOD) and ammonium
10 concentrations were 72.0–152.0 mg l⁻¹ and 5.4–38.6 mgN l⁻¹, respectively. These values were
11 more than double the large plants' concentrations of influent BOD and ammonium
12 (24.8–58.3 mg l⁻¹ and 7.1–11.1 mgN l⁻¹, respectively). The lower concentrations
13 of the influent entering the large plants in this study were caused by the natural attenuation
14 of compounds in wastewater during its transport in the sewerage system. This is a unique
15 characteristic of Bangkok's urban piping system for central WWTPs; they have extremely
16 long retention times for conveying wastewater from households to large municipal WWTPs.
17 In all municipal WWTPs, BOD removal efficiencies were satisfactory, whereas
18 the ammonium removal efficiencies varied. Complete ammonium removal was achieved in
19 plants L3, S1, S2, and S3. The ammonium removal efficiencies of plant S4 were poor.
20 The treatment processes of the nine municipal WWTPs differ: plants L1, L2, S1, and S3
21 utilize conventional activated sludge processes, while plants L3 and L4 utilize modified
22 activated sludge processes. Plant L3 employs contact stabilization and plant L4, anoxic-oxic.
23 Plant S2 employs an oxidation ditch and S4 utilizes aerated lagoon systems. Since
24 the treatment processes differ, there are also distinct differences in their operation (e.g., their
25 hydraulic retention time (HRT) and solid residence time (SRT) values).

1 **DNA extraction**

2 DNA was extracted from two mg (dry weight) of a mixed liquor suspended solid (MLSS)
3 of the sludge using Fast-DNA SPIN kits for soil (QBiogene, USA). The product from
4 the DNA extraction was verified by electrophoresis in 1.5% agarose (Bio-Rad, Spain).

5

6 **Quantitative PCR**

7 Quantitative PCR was performed in a Mx3005P instrument (Stratagene, USA) with
8 a Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene, USA). For each sample,
9 quantitative PCR was performed with duplicate sets of extracted DNA. For each set
10 of extracted DNA, DNA was extracted in triplicate and pooled to minimize bias and was
11 prepared for four different 10-fold dilutions and for each dilution; quantification was carried
12 out in duplicate. The primers Arch-amoAF (5'-STAATGGTCTGGCTTAGACG-3') and
13 Arch-amoAR (5'-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3') [10] were used to quantify the
14 archaeal *amoA* genes. The standard DNA was prepared in the range of 2.7×10^1 to 2.7×10^7
15 copies (PCR efficiencies = 93.6–102.8% and $R^2 = 0.995$ –0.998) by the pGEM-T Easy Vector
16 (Promega, USA) containing the *amoA* gene fragment of the archaea *amoA* clone AOA-S-4
17 (with an accession number of GQ390338). The bacterial *amoA* genes were quantified using
18 the primers amoA 1F (5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3') and amoA 2R (5'-
19 CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3') [32]. The standard DNA used was prepared using the
20 pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) inserted by the *amoA* gene fragment of the clone
21 AOB-NAS10-360-4 (with an accession number of GU980134) in the range of 4×10^1 to $4 \times$
22 10^7 copies (PCR efficiencies = 88.9–92.9% and $R^2 = 0.997$ –0.999). The quantification of the
23 AOB 16S rRNA gene was performed with the primers CTO 189A/Bf (5'-
24 GGAGRAAAGCAGGGGATCG-3'), CTO189Cf (5'-GGAGGAAAGTAGGGGATCG-3'),
25 and CTO 654r (5'-CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC-3') [17]. The standard DNA was the

1 pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) possessing the 16S rRNA gene fragment of
2 *Nitrosospira multiformis* (with an accession number of X90822) in the range of 7.2×10^1 to
3 7.2×10^7 copies (PCR efficiencies = 96.5–97.8% and $R^2 = 0.995$ –0.999). The PCR conditions
4 were 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 60 s at 95 °C, 60 s at 56 °C, and 30 s at 72
5 °C, with data capture for each cycle at 78 °C for 15 s. At the end of every quantitative PCR
6 reaction, dissociation curves were plotted to confirm the single target fragment of the PCR
7 amplified products.

8

9 **Statistical analysis**

10 A calculation of nonparametric Spearman's rank correlation coefficients was performed to
11 assess correlations between the abundance of *amoA* genes of AOA and AOB and plants'
12 parameters. The calculation was carried out with a two tailed *p* value, at *p* value of < 0.01 or
13 0.05 being significant, using SPSS statistical software version 17.

14

15 **Analysis of the communities of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing** 16 **bacteria**

17 The archaeal *amoA* genes (635 bp) were amplified using the primers Arch-amoAF and Arch-
18 amoAR. The PCR was performed in a thermal cycler (Biorad Laboratories, USA). The PCR
19 mixture was prepared using a Takara polymerase (Takara Bio Inc., Japan) and the PCR
20 condition was 2 min at 94 °C followed by 30–35 cycles for 30 s at 94 °C, 45 s at 56 °C, and
21 45 s at 72 °C, followed by 10 min of final extension at 72 °C. The PCR amplified product
22 was purified by gel electrophoresis using a NucleoSpin Extract II Kit (Clontech Laboratories
23 Inc., USA), and the purified PCR products were cloned using the pGEM-T Easy vector
24 system (Promega, USA). For each sample, 14 to 22 clones were selected for sequencing at
25 Macrogen Inc., Korea. The analyzed sequences for the archaeal *amoA* gene have been

1 deposited in the GenBank database under the accession numbers HM748092–HM748103 and
2 HM748107–HM748131.

3

4 The 465-bp fragment of the AOB 16S rRNA gene belonging to betaproteobacteria was
5 amplified using the primers CTO189f with a GC clamp and CTO654r. The PCR mixture was
6 prepared using a Takara polymerase (Takara Bio Inc., Japan) and the PCR condition was 2
7 min at 94 °C followed by 30 to 35 cycles of 30 s at 94 °C, 45 s at 56 °C, and 45 s at 72 °C,
8 followed by 5 min of final extension at 72 °C. Gels for denaturing gradient gel
9 electrophoresis (DGGE) were prepared with a gradient of 30% to 70% of urea–formamide
10 using polyacrylamide (8% of a 37.5:1 acrylamide:bisacrylamide mixture). Gels were run at
11 75 V for 16 h on the D Code system (Biorad Laboratories, USA) at a constant temperature of
12 60 °C. The DNA excised from the gels was PCR amplified and the products were purified
13 using a NucleoSpin Extract II Kit (Clontech Laboratories Inc., USA). DNA sequences were
14 analyzed at Macrogen Inc., Korea. The analyzed sequences for AOB 16S rRNA gene have
15 been deposited in the GenBank database under the accession numbers HM754393-
16 HM754401.

17

18 **Results**

19 **Abundance of archaeal and bacterial *amoA* genes**

20 Quantitative PCR showed considerable numbers of AOA *amoA* genes in all municipal
21 WWTPs ($3.28 \times 10^7 \pm 1.74 \times 10^7$ – $2.23 \times 10^{11} \pm 1.92 \times 10^{11}$ copies l⁻¹ sludge, Figure 1). The numbers
22 of AOB *amoA* genes occurred within the range of $8.05 \times 10^6 \pm 5.20 \times 10^6$ – $5.72 \times 10^9 \pm 5.96 \times 10^8$
23 copies l⁻¹ sludge. In plant L3, the number of AOA *amoA* genes was two orders of magnitude
24 higher than the number of AOB *amoA* genes; in plants L2 and S3, the difference was more
25 than one order of magnitude; and for plants L4, S1, S2, and S4, the difference was one order

1 of magnitude. In only plant L1 did the AOB *amoA* genes outnumber the AOA *amoA* genes;
2 however, the numbers were merely one order of magnitude less AOA *amoA* genes than AOB
3 *amoA* genes.

4

5 Quantification of the AOB 16S rRNA genes was performed, and the cell numbers of AOB
6 were calculated from the quantified numbers of 16S rRNA genes and compared with those of
7 the *amoA* genes. The calculation was carried out on the basis of the numbers of *amoA* and
8 16S rRNA gene copies found in isolated AOB: 2.5 copies of the *amoA* gene and one copy of
9 the 16S rRNA gene per genome [1, 25]. The corresponding results were obtained from both
10 assays (Table 2).

11

12 The Spearman's rank correlation coefficients (Table 3) demonstrated that the numbers of
13 AOA *amoA* genes significantly ($p \leq 0.01$) correlated negatively to the ammonium
14 concentrations in effluent wastewater and positively to the ammonium removal in aeration
15 tanks by autotrophs. For operational parameters, the AOA *amoA* gene numbers positively
16 correlated to SRT ($p < 0.05$). The numbers of AOB *amoA* genes solely correlated to the
17 influent ammonium concentrations ($p < 0.05$).

18

19 **Communities of ammonia-oxidizing bacteria**

20 Analyzed sequences together with the reference sequences from the SSU rRNA database
21 were aligned and calculated using three different methods to find the distance matrix,
22 maximum parsimony, and maximum likelihood, provided in the ARB program package
23 (version 2.0; Department of Microbiology, Technische Universitat Munchen
24 [<http://www.arb-home.de>]) for phylogenetic analyses. All phylogenetic trees showed the
25 same grouping of AOB sequences (data not shown). Analyzed sequences recovered from the

1 municipal WWTPs fell into 2 AOB clusters: *Nitrosomonas communis* cluster, and
2 *Nitrosomonas oligotropha* cluster (Table 4).

3

4 **Communities of ammonia-oxidizing archaea**

5 An arrangement of operational taxonomic units (OTUs) of all 154 analyzed sequences was
6 calculated using the DOTUR program [34]. Any sequences from the same clone library that
7 exhibited 100% OTU identities were grouped into one OTU. The AOA *amoA* sequences
8 retrieved from the municipal WWTPs along with reference sequences were aligned and
9 calculated with three different methods to determine the distance matrix, maximum
10 parsimony, and maximum likelihood, using the ARB program package. The results from the
11 different approaches show the same grouping of AOA clusters and tree topology (data not
12 shown). The majority of AOA sequences found in the municipal WWTPs fell within the soil
13 lineage (Group 1.1b) with some sequences in the marine lineage (Group 1.1a) (Table 5,
14 Figure 2). However, there was no sequence belonging to the thermophilic AOA lineage
15 (ThAOA) [8, 26]. When the nucleotide cutoff was defined at 14%, the AOA sequences were
16 divided into several clusters. AOA sequences obtained from the municipal WWTPs fell
17 within AOA clusters 1.1a-1, 1.1a-2, 1.1a-4, 1.1a-6, 1.1b-3, 1.1b-4, 1.1b-5, 1.1b-6, 1.1b-7, and
18 1.1b-8.

19

20 **Discussion**

21 AOA *amoA* genes outnumbered AOB *amoA* genes in most of our WWTPs. With regard to
22 the AOB cells ($5.58 \times 10^8 \pm 2.70 \times 10^8 - 2.29 \times 10^9 \pm 2.27 \times 10^8$ cells l⁻¹ sludge calculated based on
23 the AOB *amoA* gene numbers) in activated sludge processes (plant L1-L4, S1 and S3),
24 similar ranges of AOB cells were found to those documented of other municipal WWTPs:
25 $\sim 4.80 \times 10^7 - 1.64 \times 10^9$ cells l⁻¹ sludge [41] and $1.0 \times 10^9 - 9.2 \times 10^{10}$ cells l⁻¹ sludge [21]. To

1 confirm that significant numbers of AOA *amoA* genes also occurred in our municipal
2 WWTPs during other sampling periods, additional sludge samples were taken from some
3 plants (L1, L2, S3, and S4) in the same month of the following year. For each plant, the
4 influent and effluent characteristics, removal efficiencies, and system operation did not vary
5 between both sampling occasions also the comparative abundance of AOA and AOB *amoA*
6 genes appeared to be similar. Numbers of AOA and AOB *amoA* genes were
7 $2.54 \times 10^8 \pm 2.20 \times 10^8$ and $8.54 \times 10^8 \pm 1.73 \times 10^8$ for plant L1, $4.87 \times 10^{11} \pm 7.38 \times 10^{10}$ and
8 $7.83 \times 10^8 \pm 1.07 \times 10^9$ for plant L2, $1.99 \times 10^{11} \pm 5.45 \times 10^{10}$ and $3.53 \times 10^9 \pm 5.10 \times 10^8$ for plant S3,
9 and $3.45 \times 10^7 \pm 7.92 \times 10^7$ and $2.60 \times 10^7 \pm 3.25 \times 10^7$ for plant S4. The results confirm a high
10 contribution of AOA *amoA* genes to the ammonia-oxidizing consortium. However, it must be
11 noted that the results do not imply no seasonal variation of the comparative abundance of
12 AOA and AOB *amoA* genes, because the confirmation was performed only in the same
13 month (dry season) of the later year.

14

15 By assuming that the ammonia assimilation of microorganisms in the aeration tanks was
16 accounted for $0.1 \times$ the ammonium removed [7, 12], the percentages of the ammonium
17 removal and the volumetric ammonium removal loads of the aeration tanks by autotrophic
18 ammonia oxidation were calculated (see Table 1). Between 62.3 and 90.0% of ammonium in
19 the influent of plants L1-L4 and S1-S3 was oxidized by autotrophic microorganisms. For
20 plant S4, small autotrophic ammonia oxidation occurred (18.2%). The results suggest that
21 autotrophic ammonia oxidation arose in most plants. When considering the volumetric
22 ammonium removal loads, larger amounts of ammonium were oxidized autotrophically at the
23 large municipal WWTPs ($23.6\text{--}32.8 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) than the small municipal WWTPs ($0.1\text{--}16.4$
24 $\text{mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, Table 1). However, a connection between the volumetric ammonium removal loads
25 by autotrophic microorganisms and the individual numbers of AOA or AOB *amoA* genes

1 remains undefined (Table 3). It is noticed that for plant S4, where minimal autotrophic
2 ammonia oxidation was performed, a smaller sized ammonia-oxidizing consortium occurred
3 (when considering based on 1 mg sludge). This is probably due to too short SRT to promote
4 ammonia oxidation in this plant.

5

6 Thus far, the actual contribution of AOA to ammonia oxidation in WWTPs remains unclear.
7 Here, we estimated the ammonia-oxidizing activity of AOA and AOB in our WWTPs with
8 some assumptions: 1) AOA and AOB were the only microorganisms involving autotrophic
9 ammonia oxidation in our WWTPs and 2) AOB oxidized ammonia at equal ammonia-
10 oxidizing activity per cell for all plants. Previous studies reported the values of 4.4–23.0
11 $\text{fmol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ for AOB isolates [2, 18] and 0–49.6 $\text{fmol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ for AOB in municipal
12 WWTPs [21]. However, at the time of the previous study [21], AOA was not known to be
13 available and was excluded when estimating the ammonia-oxidizing activity per cell of AOB
14 in the municipal WWTPs. Thus, only the values reported for AOA isolates were used for our
15 calculation. To calculate ammonia-oxidizing activity per cell of AOA, it was assumed that
16 AOA posses 2.5 copies of *amoA* genes per cell following the former estimations (2.5, 2.1,
17 and 2.8 copies of *amoA* genes per cell) [3, 14, 42]. With the minimum value for ammonia-
18 oxidizing activity per cell of AOB (4.4 $\text{fmol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$), AOA involved 39.37–97.39% of
19 autotrophic ammonia oxidation (Figure 3a) and the estimated ammonia-oxidizing activity per
20 cell of AOA ranged from 0.07–34.97 $\text{fmol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ for all plants except for plant L1 where
21 the value was significantly higher (343.27 $\text{fmol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$). When AOB performed with the
22 maximum ammonia-oxidizing activity per cell of 23.0 $\text{fmol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$, AOA still involved in
23 autotrophic ammonia oxidation in all plants (21.64–86.36%) with an exception of plant L3
24 (0%). In this case, the ammonia-oxidizing activity per cell of AOA ranged between 0 and
25 100.63 $\text{fmol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$. The estimations show that AOA contributed to ammonia oxidation in

1 most plants. Previously, the values of $4.1\text{-}80.6\text{ fmol cell}^{-1}\text{ h}^{-1}$ and $0.53\text{ fmol cell}^{-1}\text{ h}^{-1}$ were
2 estimated for AOA in granular activated carbon of a full-scale drinking water treatment plant
3 [14] and reported for “*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*” [24], respectively.
4
5 AOA and AOB compete each other for the common electron donor and acceptor, ammonia
6 and oxygen. Although AOA and AOB are likely to differ in ammonia and oxygen affinities,
7 both microorganisms can probably co-predominate in sludge floc by arranging themselves in
8 certain locations of the sludge floc where the surrounding conditions favor their growth.
9 For ammonia, “*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*” and AR enrichment culture have the
10 K_s values for ammonium ($1.86\text{ }\mu\text{gN L}^{-1}$, 133 nM and $8.54\text{ }\mu\text{gN L}^{-1}$, 610 nM total ammonium)
11 [24, 31] extremely lower than the values described for AOB (between 0.4 and 27.4 mgN L^{-1} ,
12 $0.03\text{-}1.96\text{ mM}$) [5, 18, 24, 35]; however, the maximum specific growth rate (μ_{max}) of AOA
13 (0.0325 h^{-1} , 0.027 h^{-1} and 0.027 h^{-1}) [15, 24, 31] is in the range reported for AOB with high
14 affinity to ammonia, as were found to be common in all of our WWTPs ($0.006\text{-}0.035\text{ h}^{-1}$,
15 $0.023\text{-}0.080\text{ h}^{-1}$ and $0.014\text{-}0.025\text{ h}^{-1}$) [4, 5, 36]. The μ_{max} values for low affinity AOB are in
16 the higher ranges ($0.063\text{-}0.138\text{ h}^{-1}$ and $0.049\text{-}0.074\text{ h}^{-1}$) [5, 36]. In addition, the specific
17 affinity (μ_{max}/K_s) value of “*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*” ($68,700\text{ l g cell}^{-1}\text{ h}^{-1}$) was
18 200 times lower than AOB [24]. The data suggest that anywhere in the sludge floc if the
19 ammonium levels do not exceed the inhibitory levels for AOA (see below) or are too high to
20 promote growth of AOB with low affinity to ammonia over AOB with high affinity to
21 ammonia, AOA should co-predominate with AOB, if the oxygen levels do not limit AOA
22 growth (see below). And, in the deeper parts of the sludge floc where the ammonium levels
23 may fall below the growth-limiting concentrations for AOB, AOA can be the only ammonia-
24 oxidizing microorganism in those layers (if the oxygen levels are enough for AOA growth).
25 Previously, studies on isolated and enriched AOA cultures suggested that growth and activity

1 of AOA can be inhibited at high ammonium levels. Growth of “*Candidatus Nitrosopumilus*
2 *maritimus*” was inhibited at the ammonium levels above 28 mgN L⁻¹ (2 mM) and 4.2 mgN L⁻¹
3 (0.3 mM) at pH of 8.2 [24] and activity of “*Candidatus Nitrososphaera gargensis*” was
4 partially inhibited at the ammonium concentration of 43.1 mgN l⁻¹ (3.08 Mm) [13]. For AOB
5 the inhibitory levels were found to be significantly higher (>20 mM) than AOA (16, 36). In
6 our study, the ammonium concentrations in aeration tanks (<0.1–4.9 mgN l⁻¹) were found to
7 be lower than the levels reported to inhibit AOA. But, the ammonium levels inside the sludge
8 floc were not investigated here. Information from studies in the past using microelectrodes
9 with municipal sludge suggested that throughout the sludge floc depth, the ammonium
10 profiles reduced slightly as compared to the oxygen profiles, which declined dramatically
11 [20, 33]. Interpolated from data presented by Satoh et al. [33], the ammonium levels at the
12 floc centers were found to reduce < 20% from the levels observed in bulk solutions (an
13 average value of 3.96 mgN l⁻¹ for the bulk solutions). And, the levels of ammonium occurred
14 at the sludge floc center in their study were higher than the K_s values reported for AOB with
15 high affinity to ammonia (0.7–1.4 mgN l⁻¹, 0.05–0.10 mM, 0.4–1.1 mgN l⁻¹, 0.030–0.075
16 mM) [5, 35]. However, in our study, the ammonium concentrations in aeration tanks (<0.1–
17 1.1 mgN l⁻¹) of many WWTPs (plants L2, L3, L4, S1, S2, and S3) remained around the K_s
18 values reported for AOB found in the plants (members of *Nitrosomoas communis* and
19 *Nitrosomonas oligotropha* clusters). In this case, in the deeper layers of the sludge floc, the
20 ammonium levels may remain below the growth-requiring levels for AOB and only AOA
21 may predominate in those layers. The calculation of Spearman's rank correlation coefficients
22 (Table 3) supports this explanation. The numbers of AOA *amoA* genes were found to
23 strongly correlate negatively to the ammonium levels in effluent wastewater. Many studies in
24 the past are also in this agreement. Erguder et al. [9] recommended that AOA were found to

1 be the dominant ammonia-oxidizing microorganisms in environments low in ammonium
2 levels.
3
4 With regard to oxygen competition, an interaction among a group of microorganisms in
5 sludge floc is more complicated since in association with AOA and AOB, heterotrophic
6 microorganisms and nitrite-oxidizing bacteria also consume oxygen for their electron
7 acceptor. Previous studies suggested that depending on the competitiveness for oxygen of
8 each microorganism, as can be described by their oxygen affinity, the aerobic
9 microorganisms place themselves in different layers of sludge floc and biofilm. Heterotrophic
10 microorganisms exist near the sludge floc and biofilm surfaces, while AOB and nitrite-
11 oxidizing bacteria occur in the deeper parts [11, 27, 39]. Comparing between AOA and AOB,
12 studies on isolated cultures suggested that the K_s values for oxygen of AOA are likely to be
13 lower than the values reported for AOB. The K_s values for “*Candidatus Nitrosopumilus*
14 *maritimus*” and AR enrichment culture are 0.13 and 0.06 mg l⁻¹ (3.91 and 2.01 μM),
15 respectively [24, 31]. *Nitrosomonas europaea* have the K_s values in a range of 0.22–0.56 mg
16 l⁻¹ (6.9–17.4 μM) [18]. For *Nitrosomonas oligotropha*, which were the common AOB found
17 in most WWTPs in this study, the K_s values for this lineage are ambiguous. Evidence from a
18 culture-dependent study demonstrated that a relative of *Nitrosomonas oligotropha* has the K_s
19 value for oxygen higher than the values reported for the *Nitrosomonas europaea* (1.22 mg l⁻¹,
20 38.13 μM) [29]. In contrast, molecular evidence showed that the K_s value for oxygen of
21 *Nitrosomonas oligotropha* lineage seemed to be lower than those of the *Nitrosomonas*
22 *europaea* [11]. However, the data show a clear tendency that the K_s values for oxygen of
23 *Nitrosomonas oligotropha* are higher than the K_s values reported for AOA. This suggests that
24 in the sludge floc, AOA and AOB are likely to co-predominate at the upper layers of the
25 sludge floc and in the lower layers of the sludge floc, where oxygen levels may limit growth

1 of AOB, only AOA may predominate. Molecular evidence with a few environmental samples
2 agrees with this; the low levels of oxygen in the environments may be the factor promoting
3 the AOA *amoA* gene abundance [9]. For example, in suboxic marine environments, relatively
4 high abundance of AOA was found [3, 6, 19, 30]. As mentioned earlier, in the municipal
5 sludge, the oxygen concentration profiles reduced dramatically along the sludge floc depth
6 [20, 33]. Li & Bishop [20] showed that even under aerobic bulk liquid condition, the aerobic
7 zone only restricted to the surface layer of the sludge floc (0.25 mm), while in the remaining
8 parts of the sludge floc (a diameter of ~ 1.0–1.4 mm), the oxygen levels reached zero. Satoh
9 et al. [33] suggested that the oxygen concentrations in bulk solutions influenced the oxygen
10 concentration profiles in the sludge floc, especially for the occurrence of anoxic zone in the
11 sludge floc. When the bulk oxygen level was 6.24 mg l⁻¹ (195 μM), no anoxic zone was
12 generated even at the floc center, whereas an anoxic zone was found when the bulk oxygen
13 concentration reduced to 1.44 mg l⁻¹ (45 μM). It must be noted that in our study, anoxic zones,
14 as can be indicated by denitrification performances in aeration tanks, did not occur in all
15 plants (data not shown). Only in plants L2, L4, S1, and S2 did denitrification arise (data not
16 shown), and in these plants the oxygen levels in the aeration tanks were lower (< 1.40 mg l⁻¹)
17 than in the plants with no denitrification (> 2.68 mg l⁻¹, plants L1, L3, S3, and S4). The
18 results imply that although the oxygen levels in the sludge floc varied among the plants, AOA
19 *amoA* genes arose in significant numbers in all plants. The result from the calculation of
20 Spearman's rank correlation coefficients (Table 3) is in this agreement. The abundance of
21 AOA *amoA* genes did not correlate directly to the oxygen concentrations in the aeration
22 tanks.

23
24 For operational parameters, the AOA *amoA* gene numbers correlated solely to the SRT
25 (positively). Previously, the occurrence of AOA in WWTPs was found to relate

1 (qualitatively) to SRT. Park et al. [28] demonstrated that only WWTPs having the SRT of >
2 15 days are likely to harbor AOA. In our WWTPs, AOA were found in significant numbers
3 though most plants (L1, L4, S1, S2, S3, and S4) were operated with shorter SRT (2.8–14.9
4 days) than the WWTPs' in study of Park et al. [28].

5

6 Analysis of AOB communities demonstrated that AOB found in our municipal WWTPs were
7 limited to only two AOB clusters (*Nitrosomonas oligotropha* and *Nitrosomonas communis*
8 clusters) which exhibit high or moderate affinity to ammonia. *Nitrosomonas oligotropha* are
9 groups of AOB with lower K_s values (0.7–1.4 mgN l⁻¹, 0.05–0.10 mM, 0.4–1.1 mgN l⁻¹,
10 0.030–0.075 mM,) than other AOB [5, 35]. As a result, they are commonly the majority
11 strains in the municipal WWTPs, as the environments low in ammonium levels [12, 21, 22,
12 23]. Although AOB of the *Nitrosomonas communis* cluster are noted for their moderate
13 affinity to free ammonia [16], they are also commonly found in municipal WWTPs [23].

14

15 In contrast to AOB, AOA sequences of various clusters were retrieved from the municipal
16 WWTPs of this study. Previously, the related sequences to our sequences were found
17 extensively in a variety of environments. AOA of clusters 1.1b-5 and 1.1b-6 were found in
18 Mammoth hot spring sediment, which is a moderately thermal environment (42 °C to 50 °C)
19 [8], and a subsurface thermal spring [40]. The results suggest that AOA cluster 1.1b-5 and
20 1.1b-6 might be tolerant to a relatively wide temperature range, meaning that they could
21 survive in environments of 25 °C, as in WWTPs, to 50 °C, as in a hot spring. In addition,
22 AOA of clusters 1.1a-1, 1.1a-2, 1.1a-6, 1.1b-3, 1.1b-4, 1.1b-7, and 1.1b-8 were found in
23 marine environments (5; clone WBM050405_45P2A1, accession number FJ227760). These
24 results imply that AOA of these clusters are salt tolerant and can exist in both salt and non-
25 salt environments. And, in plants L2, L3, S1, and S3 they were the only AOA sequence type

1 present implying that they were the dominant ammonia-oxidizing microorganisms in these
2 municipal WWTPs.

3

4 The AOA sequences recovered from the municipal WWTPs in this study differed from those
5 reported by Park et al. [28]. Their study indicated that AOA of clusters 1.1a-4 and 1.1b-2
6 (clusters B and D in their study) might be distinguished groups of AOA, with cluster 1.1b-2
7 as the AOA with a widespread presence in their WWTPs. AOA of cluster 1.1b-2, however,
8 was not found in any of the municipal WWTPs in our study. Sequences of AOA cluster 1.1b-
9 4 were found to be the most widespread sequences distributed throughout five of the nine
10 municipal WWTPs in this study. No special AOA cluster was found to relate to the highly
11 active plants. A link between AOA distribution patterns and autotrophic ammonia oxidation,
12 therefore, remains unclear.

13

14 One to three AOA clusters were found in each plant with activated sludge or oxidation ditch
15 processes (plants L1-L4 and S1-S3). However, the AOA in an aerated lagoon system (plant
16 S4) were found to be highly diverse with seven clusters present. It must be noted that in plant
17 S4, autotrophic ammonia oxidation occurred minimally (Table 1) and the numbers of AOA
18 (and AOB) *amoA* genes were less significant than they were in the other plants (when
19 considering based on 1 mg sludge).

20

21 **Conclusion**

22 In conclusion, AOA *amoA* genes outnumbered AOB *amoA* genes in most of the WWTPs
23 even though the treatment processes, influent and effluent characteristics, removal
24 efficiencies, and system operation of the nine municipal WWTPs in this study were not
25 homogenous. This points to the significant contribution made by AOA *amoA* genes to

1 ammonia-oxidizing consortiums; as a result, these microorganisms may be involved in the
2 ammonia oxidation that occurs at municipal WWTPs. Prior to the recent work, studies on the
3 removal of nitrogen from WWTPs had overlooked AOA, considering only AOB's role.
4 Future research must include and clarify the role of AOA as well as AOB in the treatment
5 processes of municipal WWTPs.

6

7 **Acknowledgements**

8 This work has been supported by the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund
9 (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund). We also acknowledge financial support from
10 the Thailand Research Fund (grant no. MRG5280086) and Office of the Higher Education
11 Commission. We would like to show our appreciation to the Bangkok Metropolitan
12 Administration (BMA) for providing sludge from their municipal WWTPs and Professor
13 Chongrak Polprasert for his guidance.

14

15 **References**

- 16 1. Aakra A, Utaker JB, Nes IF (1999) RFLP of rRNA genes and sequencing of the 16S-23S
17 rDNA intergenic spacer region of ammonia-oxidizing bacteria: a phylogenetic approach. *Int J*
18 *Syst Bacteriol* 49:123–130.
- 19
- 20 2. Belser LW, Schmidt EL (1980) Growth and oxidation kinetics of three genera of ammonia
21 oxidizing nitrifiers. *FEMS Microbiol Lett* 7:213–216.
- 22
- 23 3. Beman JM, Popp BN, Francis CA (2008) Molecular and biogeochemical evidence for
24 ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California. *ISME J* 2(4):429-441.

25

- 1 4. Bollmann A & Laanbroek HJ (2001) Continuous culture enrichments of ammonia-
2 oxidizing bacteria at low ammonium concentrations. *FEMS Microbiol Ecol* 37:211-221.
3
- 4 5. Bollmann A, Bär-Gilissen MJ, Laanbroek HJ (2002) Growth at low ammonium
5 concentrations and starvation response as potential factors involved in niche differentiation
6 among ammonia-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microb* 68:4751–4757.
7
- 8 6. Coolen MJL, Abbas B, Van Bleijswijk J, Hopmans EC, Kuypers MMM, Wakeham SG,
9 Sinninghe Damsté JS (2007) Putative ammonia-oxidizing Crenarchaeota in suboxic waters
10 of the Black Sea: A basin-wide ecological study using 16S ribosomal and functional genes
11 and membrane lipids. *Environ Microbiol* 9(4):1001-1016.
12
- 13 7. Daims H, Ramsing NB, Schleifer KH, Wagner M (2001) Cultivation-independent,
14 semiautomatic determination of absolute bacterial cell numbers in environmental samples by
15 fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microb* 67(12):5810-5818.
16
- 17 8. De La Torre JR, Walker CB, Ingalls AE., Konneke M, Stahl DA (2008) Cultivation of a
18 thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environ Microbiol* 10:
19 810–818.
20
- 21 9. Erguder TH, Boon BN, Wittebolle L, Marzorati M, Verstraete W (2009) Environmental
22 factors shaping the ecological niches of ammonia oxidizing archaea. *FEMS Microbiol Rev*
23 33:855–869.
24

- 1 10. Francis C, Roberts KJ, Beman JM, Santoro AE, Oakley BB (2005) Ubiquity and diversity
2 of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *P Natl Acad Sci*
3 *USA* 102:14683–14688.
- 4
- 5 11. Gieseke A, Purkhold U, Wagner M, Amann R, Schramm A (2001) Community structure
6 and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. *Appl Environ*
7 *Microb* 67:1351–1362.
- 8
- 9 12. Harms G, Layton AC, Dionisi HM, Gregory IR, Garrett VM, Hawkins SA, Robinson KG,
10 Saylor GS (2003) Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal
11 wastewater treatment plant. *Environ Sci Technol* 37:343–351.
- 12
- 13 13. Hatzenpichler R, Lebedeva EV, Spieck E, Stoecker K, Richter A, Daims H, Wagner M
14 (2008) A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *P*
15 *Natl Acad Sci USA* 105(6):2134–2139
- 16
- 17 14. Kasuga I, Nakagaki H, Kurisu F, Furumai H (2010) Predominance of ammonia-oxidizing
18 archaea on granular activated carbon used in a full-scale advanced drinking water treatment
19 plant. *Water Res* 44:5039-5049.
- 20
- 21 15. Könneke M, Bernhard AE, De La Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA (2005)
22 Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437:543–546.
- 23
- 24 16. Koops HP, Purkhold U, Pommerening-Röser A, Timmermann G, Wagner M (2003) The
25 lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria. In: Dworkin M (ed) *The Prokaryotes: An*

- 1 Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. Springer-Verlag, New
2 York.
- 3
- 4 17. Kowalchuck GA, Stephen JR, De Boer W, Prosser JI, Embley TM, Woldendorp JM
5 (1997) Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class
6 Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing
7 of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl Environ Microb* 63:1489–1497.
- 8
- 9 18. Laanbroek HJ, Bodelier PLE, Gerards S (1994) Oxygen consumption kinetics of
10 *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter hamburgensis* grown in mixed continuous cultures
11 at different oxygen concentrations. *Arch of Microbiol* 161:156–162.
- 12
- 13 19. Lam P, Jensen MM, Lavik G, McGinnis DF, Müller B, Schubert CJ, Amann R,
14 Thamdrup B, Kuypers MMM (2007) Linking crenarchaeal and bacterial nitrification to
15 anammox in the Black Sea. *P Natl Acad Sci USA* 104(17):7104-7109.
- 16
- 17 20. Li B, Bishop PL (2004) Micro-profiles of activated sludge floc determined using
18 microelectrodes. *Water Res* 38(5):1248-1258.
- 19
- 20 21. Limpiyakorn T, Shinihara Y, Kurisu F, Yagi O (2005) Communities of ammonia-
21 oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo. *FEMS*
22 *Microbiol Ecol* 54:205–117.
- 23
- 24 22. Limpiyakorn T, Shinihara Y, Kurisu F, Yagi O (2006a) Development and application of
25 real-time PCR quantification for particular ammonia-oxidizing bacteria in full-scale sewage

- 1 activated sludge systems and continuous enrichment cultures. *Appl Microbiol* 72:1004–
2 1013.
- 3
- 4 23. Limpiyakorn T, Shinihara Y, Kurisu F, Yagi O (2006b) Quantification of ammonia-
5 oxidizing bacteria populations in full-scale sewage activated sludge systems and assessment
6 of system variables affecting their performance. *Water Sci Technol* 54:91–99.
- 7
- 8 24. Martens-Habbena M, Berube PM, Urakawa H, de la Torre JR, Stahl DA (2009) Ammonia
9 oxidation kinetics determine nicheseparation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature* 461:
10 976–981.
- 11
- 12 25. Norton, JM, Alzerreca JJ, Suwa Y, Klotz MG (2002) Diversity of ammonia
13 monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Arch Microbiol* 177:
14 139-149.
- 15
- 16 26. Offre P, Prosser JI, Nicol GW (2009) Growth of ammonia-oxidizing archaea in soil
17 microcosms is inhibited by acetylene. *FEMS Microbiol Ecol* 70(1):99-108.
- 18
- 19 27. Okabe S, Satoh H, Watanabe Y (1999) In situ analysis of nitrifying biofilms as
20 determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl Environ Microb*
21 65:3182–3191.
- 22
- 23 28. Park HD, Wells GF, Bae H, Criddle CS, Francis CA (2006) Occurrence of ammonia
24 oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Appl Environ Microb* 72: 5643–
25 5647.

- 1 29. Park HD, Noguera DR (2007) Characterization of two ammonia-oxidizing bacteria
2 isolated from reactors operated with low dissolved oxygen concentrations. *J Appl Microbiol*
3 102(5): 1401-1417.
4
- 5 30. Park SJ, Park BJ, Rhee SK (2008) Comparative analysis of archaeal 16S rRNA and amoA
6 genes to estimate the abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea in marine
7 sediments. *Extremophiles* 12(4):605-615.
8
- 9 31. Park BJ, Park SJ, Yoon DN, Schouten S, Damsté JSS, Rhee SK (2010) Cultivation of
10 autotrophic ammonia-oxidizing archaea from marine sediments in coculture with sulfur-
11 oxidizing bacteria. *Appl Environ Microb* 76:7575-7587.
12
- 13 32. Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W (1997) The ammonia monooxygenase structural
14 gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-
15 oxidizing populations. *Appl Environ Microb* 63:4704-4712.
16
- 17 33. Satoh H, Nakamura Y, Ono H, Okabe S (2003) Effect of oxygen concentration on
18 nitrification and denitrification in single activated sludge flocs. *Biotechnol and Bioeng* 83(5):
19 604-607.
20
- 21 34. Schloss PD, Handelsman J (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining
22 operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microb* 71:1501-
23 1506.
24

- 1 35. Stech G, Bottcher B, Dittberner P, Rath G, Koops HP (1995) The ammonia-oxidizing
2 nitrifying population of the River Elbe estuary. *FEMS Microbiol Ecol* 17:177–186.
3
- 4 36. Suwa Y, Imamura Y, Suzuki T, Tashiro T, Urushigawa Y (1994) Ammonia-oxidizing
5 bacteria with different sensitivities to $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in activated sludges. *Water Res* 28:1523-
6 1532.
7
- 8 37. Treusch AH, Leininger S, Kletzin V, Schuster SC, Klenk HP, Schleper C (2005) Novel
9 genes or nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic
10 crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol* 7:1985–1995.
11
- 12 38. Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen
13 I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O,
14 Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers YH, Smith HO
15 (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304:66–74.
16
- 17 39. Wagner M, Noguera DR, Juretschko S, Rath G, Koops HP, Schleifer KH (1998)
18 Combining fluorescent in situ hybridization (FISH) with cultivation and mathematical
19 modeling to study population structure and function of ammonia-oxidizing bacteria in
20 activated sludge. *Water Sci Technol* 37:441–449.
21
- 22 40. Weidler GW, Dornmayr-Pfaffenhuemer M, Gerbl FW, Heinen W, Stan-Lotter H (2007)
23 Communities of archaea and bacteria in a subsurface radioactive thermal spring in the
24 Austrian central alps, and evidence of ammonia-oxidizing crenarchaeota. *Appl Environ*
25 *Microb* 73:259–270.
26

- 1 41. Wells GF, Park HD, Yeung CH, Eggleston B, Francis CA, Criddle CS (2009) Ammonia-
2 oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor:
3 betaproteobacterial dynamics and low relative abundance of Crenarchaea. *Environ Microbiol*
4 11:2310-2328.
- 5
- 6 42. Wuchter C, Abbas B, Coolen MJL., Herfort L (2006) Archaeal nitrification in the ocean.
7 *P Natl Acad Sci USA* 103:12317–12322.
- 8
- 9 43. Zhang T, Jin T, Yan Q, Shao M, Wells G, Criddle C, Fang HHP (2009) Occurrence of
10 ammonia-oxidizing Archaea in activated sludges of a laboratory scale reactor and two
11 wastewater treatment plants. *J Appl Microbiol* 107:970-977.
- 12

1 **List of Tables and Figures**

2 **Table 1** Treatment processes, influent and effluent characteristics, removal efficiencies, and
3 system operation of municipal wastewater treatment plants.

4

5 **Table 2** Calculated numbers of AOB in municipal wastewater treatment plants based on the
6 *amoA* gene and 16S rRNA gene

7

8 **Table 3** Spearman's rank correlation coefficients between the numbers of AOA and AOB
9 *amoA* genes and plants' parameters.

10

11 **Table 4** Communities of AOB in municipal wastewater treatment plants

12

13 **Table 5** Communities of AOA in municipal wastewater treatment plants

14

15 **Figure 1** Abundance of AOA and AOB *amoA* genes in municipal wastewater treatment
16 plants.

17

18 **Figure 2** A neighbor joining tree for *amoA* genes of AOA. The sequences of this study are
19 shown in bold with the second abbreviation representing the samples followed by the
20 sequence numbers of the samples. The number in parentheses behind the sequence name
21 exhibits the amounts of sequences of each OTU.

22

23 **Figure 3** Contributions of AOA and AOB to autotrophic ammonia oxidation estimated based
24 on the ammonia-oxidizing activity per cell of AOB of $4.4 \text{ fmol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (a) and 23.0 fmol
25 $\text{cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (b)

1 **Table 1** Treatment processes, influent and effluent characteristics, removal efficiencies, and system operation of municipal wastewater treatment
 2 plants.

Parameter	Unit	Wastewater treatment plant							
		L1	L2	L3	L4	S1	S2	S3	S4
Treatment process		Conventional AS	Conventional AS	Contact stabilization AS	Anoxic-oxic AS	Conventional AS	Oxidation ditch	Conventional AS	Aerated lagoon
Wastewater flow rate	m ³ d ⁻¹	102184	200274	18881	111295	413	1302	600	1442
BOD in influent ^{a)}	mg l ⁻¹	24.8–27.4	30.1–31.4	57.0–58.3	46.0–47.3	109.0–135.0	89.0–103.0	102.0–152.0	72.0–75.0
BOD in effluent ^{a)}	mg l ⁻¹	8.6–10.4	5.9–11.8	5.5–5.7	3.3–3.4	5.0–6.0	3.0–5.0	2.0–5.0	4.0–5.0
BOD removal ^{a)}	%	62.2–65.4	60.9–81.1	90.6–91.0	92.6–92.9	94.5–96.3	95.1–96.6	96.7–98.0	93.3–94.4
NH ₄ -N in influent ^{a)}	mg l ⁻¹	8.5–9.7	11.0–11.1	7.7–7.9	7.1–8.1	21.4–24.0	36.2–38.6	13.4–14.5	5.4–6.0
NH ₄ -N in effluent ^{a)}	mg l ⁻¹	2.7–2.9	0.9–1.1	<0.1	0.6–1.0	0.2–0.4	<0.1–0.4	<0.1–0.2	4.1–4.9
NH ₄ ⁺ -N removal ^{a)}	%	68.2–70.1	90.9–91.8	100.0	87.9–92.0	98.3–99.1	99.0–100.0	99.9–100.0	18.3–24.1
NH ₄ ⁺ -N removal by autotrophs	%	62.3	81.8	90.0	80.5	88.8	89.5	89.4	18.2
Volumetric NH ₄ -N removal load of aeration tank	mg l ⁻¹ d ⁻¹	37.8	40.1	35.1	33.9	13.7	18.3	5.7	0.4
Volumetric NH ₄ -N removal load of aeration tank by autotrophs	mg l ⁻¹ d ⁻¹	23.6	32.8	31.6	27.3	12.2	16.4	5.1	0.1
DO in aeration tank ^{b)}	mg l ⁻¹	3.25	0.5	2.95	0.55	1.30	1.40	3.05	2.68
HRT ^{b)}	h	4.0	7.0	6.0	4.0	6.0	39.8	43.5	67.2
SRT ^{b)}	d	9.0	35.0	25.0	12.0	7.0	5.7	14.9	2.8
MLSS ^{b)}	mg l ⁻¹	1670	5930	7550	7640	3360	2090	6110	120

3 DO, dissolved oxygen; HRT, hydraulic retention time; SRT, solid residence time; MLSS, mixed liquor suspended solid; AS, activated sludge

4 a) All influent characteristic, effluent characteristic, and removal efficiency values were the ranges for the month that the sludge was collected.

5 b) All operational parameters are the averages for the month in which the sludge was collected.

- 1 **Table 2** Calculated numbers of AOB in municipal wastewater treatment plants based on the
 2 *amoA* gene and 16S rRNA gene

Wastewater treatment plant	<i>amoA</i> gene (cells l ⁻¹ sludge)	16S rRNA gene (cells l ⁻¹ sludge)
L1	2.29x10 ⁹ ±2.27x10 ⁸	2.17x10 ⁹ ±1.25x10 ⁹
L2	1.37x10 ⁹ ±3.95x10 ⁸	1.07x10 ⁹ ±3.66x10 ⁸
L3	5.58x10 ⁸ ±2.70x10 ⁸	6.27x10 ⁸ ±4.44x10 ⁸
L4	9.78x10 ⁸ ±1.10x10 ⁸	4.66x10 ⁹ ±2.06x10 ⁹
S1	1.24x10 ⁹ ±6.07x10 ⁸	1.92x10 ⁹ ±5.71x10 ⁸
S2	1.21x10 ⁹ ±3.62x10 ⁸	1.03x10 ⁹ ±2.32x10 ⁸
S3	2.09x10 ⁹ ±7.14x10 ⁸	3.20x10 ⁹ ±4.60x10 ⁸
S4	3.22x10 ⁶ ±2.08x10 ⁶	3.89x10 ⁶ ±4.36x10 ⁶

3

- 1 **Table 3** Spearman's rank correlation coefficients between the numbers of AOA and AOB
 2 *amoA* genes and plants' parameters.

Parameter	Spearman's rank correlation coefficient	
	AOA <i>amoA</i> gene	AOB <i>amoA</i> gene
Wastewater flow rate	-0.143 (0.736)	-0.214 (0.610)
BOD in influent	0.310 (0.456)	0.381 (0.352)
BOD in effluent	0.012 (0.978)	-0.144 (0.734)
BOD removal	0.167 (0.693)	0.405 (0.320)
NH ₄ -N in influent	0.381 (0.352)	0.714 (0.047)
NH ₄ -N in effluent	-0.833 (0.010)	-0.333 (0.420)
NH ₄ ⁺ -N removal	0.826 (0.011)	0.407 (0.317)
NH ₄ ⁺ -N removal by autotrophs	0.833 (0.010)	0.333 (0.420)
Volumetric NH ₄ -N removal load of aeration tank	0.214 (0.610)	0.048 (0.911)
Volumetric NH ₄ -N removal load of aeration tank by autotrophs	0.381 (0.352)	0.048 (0.911)
DO in aeration tank	-0.024 (0.955)	-0.286 (0.493)
HRT	0.048 (0.910)	0.133 (0.754)
SRT	0.738 (0.037)	0.405 (0.320)
MLSS	0.643 (0.086)	0.310 (0.456)

3 *p* values are shown in parenthesis

4 Bold letters indicate significant correlations at *p* value of < 0.05.

5

1 **Table 4** Communities of AOB in municipal wastewater treatment plants

AOB cluster	Wastewater treatment plant							
	L1	L2	L3	L4	S1	S2	S3	S4
<i>Nitrosococcus oceani</i> cluster								
<i>Nitrospira</i> cluster								
<i>Nitrosomonas communis</i> cluster	√							
<i>Nitrosomonas europaea</i> cluster								
<i>Nitrosomonas cryototerans</i> cluster								
<i>Nitrosomonas</i> sp. Nm143 cluster								
<i>Nitrosomonas marina</i> cluster								
<i>Nitrosomonas oligotropha</i> cluster		√	√	√	√	√	√	√

2 √, present

3

1 **Table 5** Communities of AOA in municipal wastewater treatment plants

AOA cluster	Wastewater treatment plant							
	L1	L2	L3	L4	S1	S2	S3	S4
Cluster 1.1a-1	++++					++		
Cluster 1.1a-2								+++
Cluster 1.1a-3								
Cluster 1.1a-4	+++++					+++++++ ++		
Cluster 1.1a-5								
Cluster 1.1a-6								+++
Cluster 1.1b-1								
Cluster 1.1b-2								
Cluster 1.1b-3			+++++++ +++++		+++++++ +++++++			+++++
Cluster 1.1b-4		+++++++ +++++++		+++++++		+++++	+++++++ ++	++
Cluster 1.1b-5	++++			+++++				++
Cluster 1.1b-6								++
Cluster 1.1b-7								++
Cluster 1.1b-8					++			

2 +, present (the amount of symbols represents the number of clones)

3

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

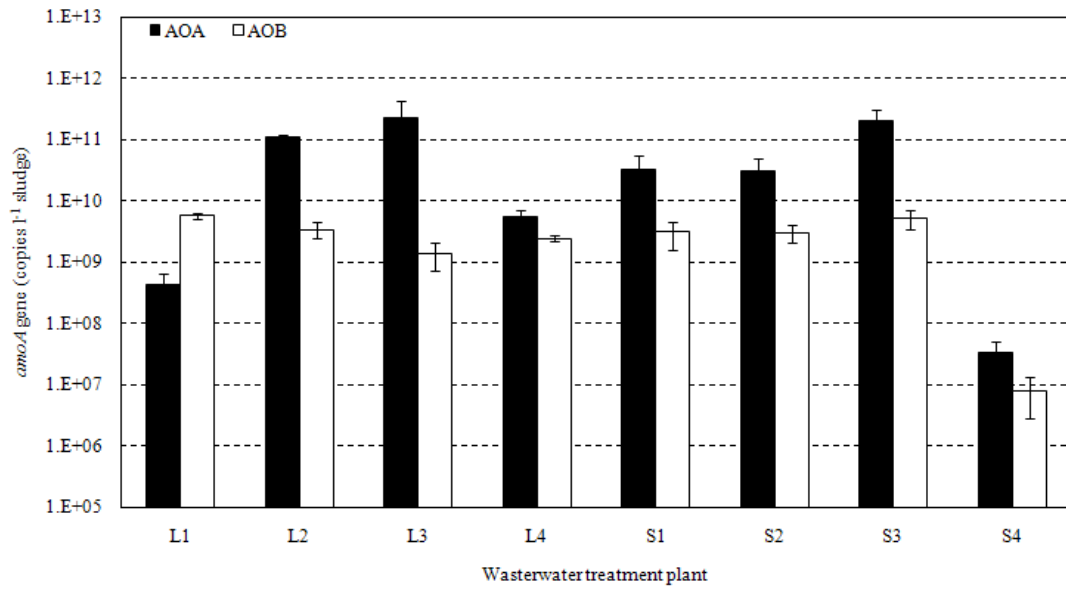
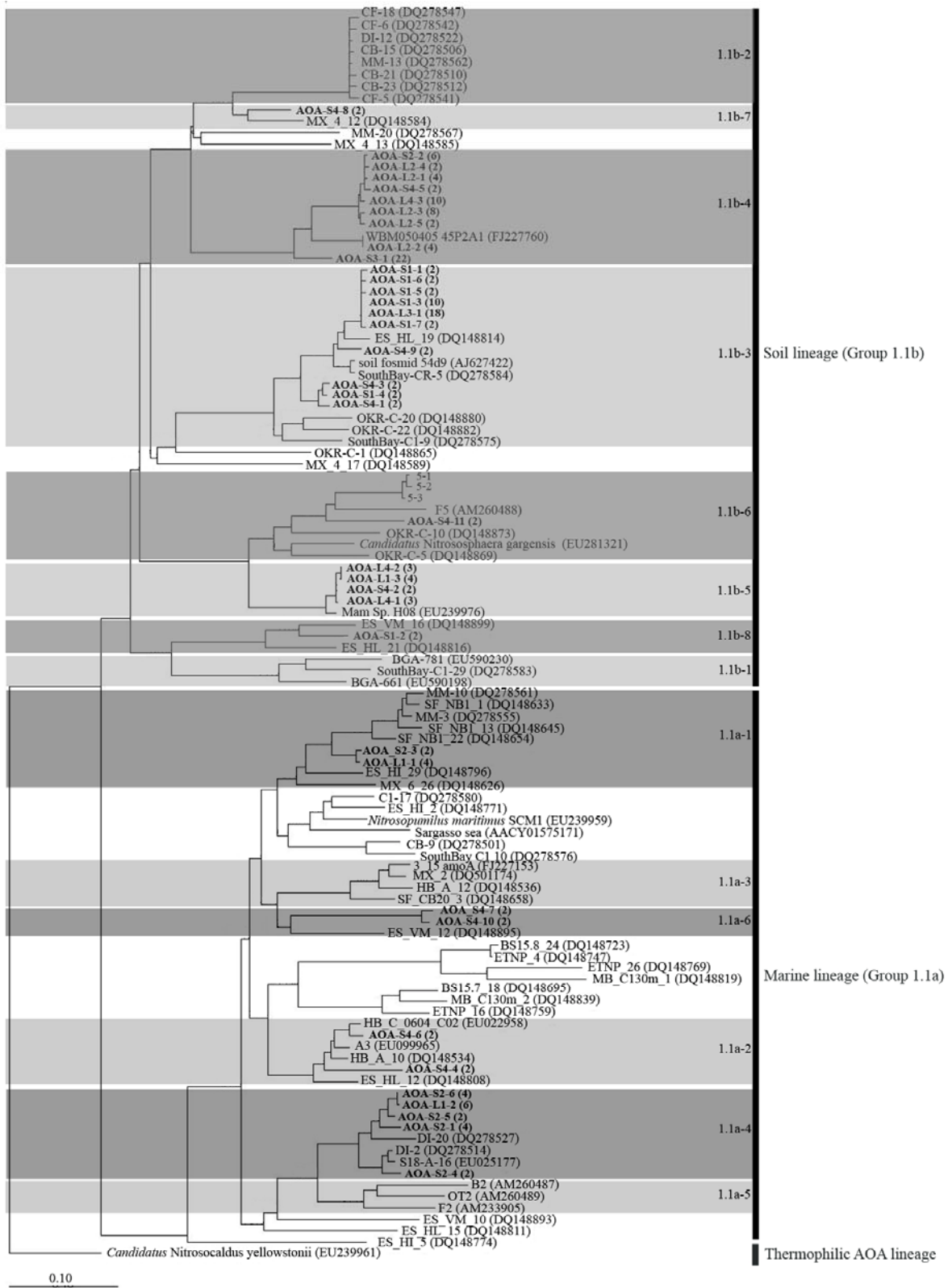
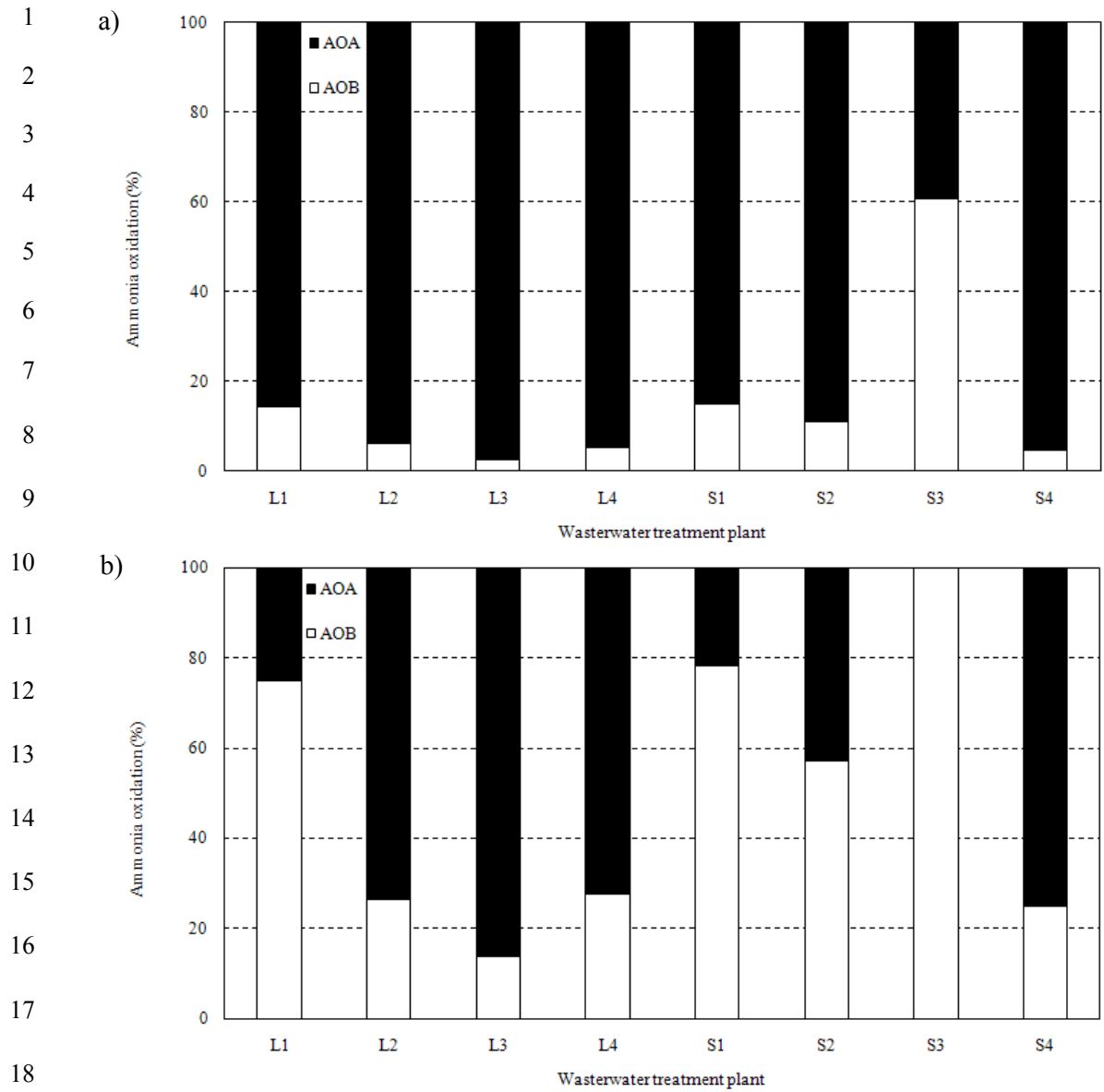


Figure 1



1

2 **Figure 2**



19 **Figure 3**