



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิเดชันของแอมโมเนียออกไซด์ซิงอาร์เคียและแบคทีเรีย
ในระบบบำบัดน้ำเสียโดย DNA stable isotope probing (DNA-SIP)
และสารยับยั้งเฉพาะกลุ่มจุลินทรีย์

โดย รองศาสตราจารย์ ดร.ตะวัน ลิ้มปียากร

มิถุนายน 2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ออโตโทพิกแอมโมเนียออกซิเดชันของแอมโมเนียออกไซด์เชิงอาร์เคียและแบคทีเรีย

ในระบบบำบัดน้ำเสียโดย DNA stable isotope probing (DNA-SIP)

และสารยับยั้งเฉพาะกลุ่มจุลินทรีย์

รองศาสตราจารย์ ดร.ตะวัน ลิ้มปิยากร

ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนด้านการเงินแก่งานวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักการระบายน้ำ กรุงเทพมหานคร ที่ให้ความอนุเคราะห์ตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย โดยผู้วิจัยได้รับคำปรึกษาด้านตะกอนและการเดินระบบบำบัดน้ำเสียจาก ดร. ปธาน บรรจงปรุ วิศวกรสุขาภิบาลชำนาญการ สำนักงานจัดการคุณภาพน้ำ สำนักการระบายน้ำ กรุงเทพมหานคร ซึ่งผู้วิจัยมีความซาบซึ้งใจเป็นอย่างยิ่ง ผู้วิจัยขอขอบคุณนักวิจัยและอาจารย์ 3 ท่าน ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิค DNA-stable isotope probing ได้แก่ ดร. สุวัฒน์ สูงเลิศสง่า สถาปนิกวิจัยและเทคโนโลยี ปตท. Dr. Futoshi Kurisu, Research Center for Water Environment Technology, the University of Tokyo และ Dr. Ikuro Kasuga, Department of Urban Engineering, the University of Tokyo ผู้วิจัยขอขอบคุณนิสิต 2 ท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทดลอง ได้แก่ นางสาวปรียาภรณ์ พรกุลวัฒน์ นิสิตปริญญาโทและเอก ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนางสาวปัทมยา ศรีเทพ นิสิตปริญญาเอก หลักสูตรการจัดการสิ่งแวดล้อมและสารอันตราย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณบุคคลท่านอื่นๆที่ได้เฝ้าช่วยงานในกิตติกรรมประกาศนี้ แต่ให้ความช่วยเหลืองานวิจัยด้วยดีเสมอมา หากไม่มีบุคคลทั้งที่ได้เฝ้าช่วยงานและมีได้เฝ้าช่วยงานเหล่านี้ งานวิจัยนี้ไม่สามารถเสร็จสมบูรณ์ได้

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA5780096

ชื่อโครงการ : ออโตโทรฟิคแอมโมเนียออกซิเดชันของแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคียและแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียโดย DNA stable isotope probing (DNA-SIP) และสารยับยั้งเฉพาะกลุ่มจุลินทรีย์

ชื่อนักวิจัย : รองศาสตราจารย์ ดร. ตะวัน ลิ้มปิยากร คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : tawan.l@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 16 มิถุนายน 2557 - 15 มิถุนายน 2560

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย (AOA) และแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (AOB) ในระบบบำบัดน้ำเสีย โดยอาศัยเทคนิค DNA-stable isotope probing (DNA-SIP) และสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่ม AOA และ AOB ได้แก่ PTIO และ ATU ตามลำดับ การใช้ DNA-SIP กับตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย 3 ระบบพบว่า AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียทั้ง 3 ระบบมีการใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนในการสร้างเซลล์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า AOB มีส่วนร่วมในการออกซิไดซ์แอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสียทั้ง 3 ระบบ สำหรับ AOA พบการใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนในการสร้างเซลล์ในระบบบำบัดน้ำเสีย 2 ระบบจาก 3 ระบบที่ทำการศึกษา แสดงให้เห็นว่า AOA มีส่วนร่วมในการออกซิไดซ์แอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสียทั้ง 2 ระบบนี้ การศึกษาสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่ม พบว่า ATU ที่ความเข้มข้น $\geq 10 \mu\text{M}$ ยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOB ในขณะที่ต้องใช้ ATU ความเข้มข้น $>500 \mu\text{M}$ ในการการยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA และสามารถใช้ ATU ที่ความเข้มข้นระหว่าง $10\text{-}200 \mu\text{M}$ ในการตรวจวัดการทำงานของ AOA ที่อยู่ในระบบที่มี AOA และ AOB อยู่ร่วมกันได้ การทดลอง ATU ที่ความเข้มข้น $80 \mu\text{M}$ ร่วมกับ DNA-SIP พบว่า ATU ที่ความเข้มข้นนี้ยับยั้งการเจริญเติบโตของ AOB แต่ไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของ AOA เมื่อนำ ATU มาตรวจวัดกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสีย 5 ระบบ พบว่า AOB เป็นจุลินทรีย์หลักที่ทำหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสียทุกระบบ โดย AOA มีส่วนร่วมในการออกซิไดซ์แอมโมเนียประมาณ 20% ในระบบที่มี AOA มากกว่า AOB ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า AOA มีส่วนร่วมในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย แต่อาจไม่ใช่จุลินทรีย์หลักที่ทำหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งควรยืนยันด้วยเทคนิคอื่นๆต่อไป

คำหลัก : ระบบบำบัดน้ำเสีย แอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย แอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย DNA-SIP

Abstract

Project Code : RSA5780096

Project Title : Autotrophic ammonia oxidation of ammonia-oxidizing archaea and bacteria (AOA and AOB) in wastewater treatment plants identified by DNA stable isotope probing (DNA-SIP) and selective inhibitors

Investigator : Tawan Limpiyakorn, Ph.D., Department of Environmental Engineering,
Chulalongkorn University

E-mail Address : tawan.l@chula.ac.th

Project Period : 16 June 2014 – 15 June 2017

This study aims to investigate the ammonia-oxidizing activity of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in wastewater treatment systems (WWTSs) using DNA-stable isotope probing (DNA-SIP) and selective inhibitors that allow only either group of microorganisms to perform ammonia oxidation at a time. ATU and PTIO were selected as a specific inhibitor for AOB and AOA, respectively. Applying DNA-SIP to three WWTS sludge revealed that AOB in all three sludge incorporated inorganic carbon into their *amoA* genes, while AOA in two out of the three sludge showed positive signal for DNA-SIP. The incorporation of inorganic carbon into the *amoA* genes of AOA and AOB implies that the microorganisms involved in ammonia-oxidizing activity of sludge. Tests of ammonia-oxidizing activity with sludge from two nitrifying reactors demonstrated that ATU concentrations of ≥ 10 μM provided complete inhibition of ammonia oxidation of AOB. For AOA, complete ammonia oxidizing inhibition occurred at ATU concentrations of >500 μM . ATU concentrations between 10 and 200 μM may be useful for observing the activity of AOA in systems where both microorganisms coexisted. Applying 80 μM of ATU to DNA-SIP confirmed that ATU at this concentration mainly inhibited growth of only AOB, not AOA. ATU was then applied to sludge from 5 WWTSs. The results indicated that AOB played the main role in ammonia-oxidizing activity in all WWTS sludge. In WWTS sludge, where AOA outnumbered AOB, AOA contributed around 20% of ammonia oxidation. Further studies are required to confirm the role of AOA in ammonia oxidation in WWTSs using different techniques.

Keywords : Ammonia-oxidizing archaea; Ammonia-oxidizing bacteria; DNA-SIP; Wastewater

บทนำ

ปัจจุบันมีการพัฒนาการกำจัดไนโตรเจนในน้ำเสียด้วยกระบวนการทางชีววิทยา โดยใช้จุลินทรีย์หลากหลายกลุ่มซึ่งมีวิธีการเปลี่ยนรูปสารประกอบไนโตรเจนที่ต่างกัน การพัฒนาดังกล่าวช่วยเพิ่มความหลากหลายในการเลือกใช้กระบวนการทางชีววิทยาแบบต่างๆให้มีความเหมาะสมกับน้ำเสียแต่ละประเภท การบวนการไนตริฟิเคชัน-ดีไนตริฟิเคชัน (Nitrification-denitrification) เป็นกระบวนการดั้งเดิมที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยในช่วงหลังได้มีการพัฒนากระบวนการไนตริฟิเคชันแบบบางส่วน (Partial nitrification) เพื่อลดการใช้พลังงานในการเติมอากาศ โดยน้ำออกจากกระบวนการไนตริฟิเคชันแบบบางส่วน สามารถนำไปบำบัดต่อด้วยกระบวนการไนไตรท์ดีไนตริฟิเคชัน (Nitrite denitrification) หรือกระบวนการแอนโนมอกซ์ (Anammox) ได้ จะเห็นได้ว่าไม่ว่าจะใช้กระบวนการทางชีววิทยาแบบใดในการกำจัดไนโตรเจน จะไม่สามารถหลีกเลี่ยงการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ซึ่งเป็นขั้นตอนเริ่มต้นของทุกกระบวนการได้ ทั้งนี้การออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ถือเป็นขั้นตอนจำกัดอัตรา เนื่องจากจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำและมีความอ่อนไหวต่อสภาวะแวดล้อมสูงเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ในกระบวนการถัดๆไป

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันความเข้าใจเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมาก โดยในช่วงกว่า 100 ปีที่ผ่านมาความเข้าใจกันว่ามีเพียงแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรีย (Ammonia oxidizing bacteria; AOB) เท่านั้นที่ทำหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ ทั้งนี้งานวิจัยในช่วง 10 ปีนี้พบว่าแอมโมเนียออกซิไดซิงอาร์เคีย (Ammonia oxidizing archaea; AOA) ก็สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ได้เช่นกัน (Venter และคณะ 2004; Könneke และคณะ 2005; Treusch และคณะ 2005; de la Torre และคณะ 2008; Hatzenpichler และคณะ 2008; Lehtovirta-Morley และคณะ 2011; Tournia และคณะ 2011) สำหรับในระบบบำบัดน้ำเสีย มีการพบ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียทั่วโลกทั้งในทวีปอเมริกาเหนือ ยุโรป และเอเชีย (Park และคณะ 2006; Wells และคณะ 2009; Limpiyakorn และคณะ 2011; Mußmann และคณะ 2011; Yapsakli และคณะ 2011; Zhang และคณะ 2011; Bai และคณะ 2012; Sauder และคณะ 2012; Gao และคณะ 2013; Gao และคณะ 2014; Sinthusith และคณะ 2015; Li และคณะ 2016; Sauder และคณะ 2017) การศึกษาจำนวนประชากรจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสีย พบจำนวนยีน *amoA* ของ AOA มากกว่า AOB ในบางระบบ (Limpiyakorn และคณะ 2011; Mußmann และคณะ 2011; Bai และคณะ 2012; Sauder และคณะ 2012; Wu และคณะ 2013; Sinthusith และคณะ 2015; Zhang และคณะ 2015) ในขณะที่บางระบบพบจำนวนยีน *amoA* ของ AOB มากกว่า AOA หรือไม่พบยีน *amoA* ของ AOA (Wells และคณะ 2009; Yapsakli และคณะ 2011; Gao และคณะ 2013; Gao และคณะ 2014) ถึงแม้จะมีการพบจำนวนยีน *amoA* ของ AOA มากกว่า AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียบางระบบ ก็ไม่ได้หมายความว่า AOA จะเป็นจุลินทรีย์หลักในการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ในระบบ เนื่องจากจำนวนยีน *amoA* ที่พบไม่จำเป็นต้องสัมพันธ์กับกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA โดยตรง เนื่องจากเป็นไปได้เหมือนกันว่า AOA อาจมียีน *amoA* อยู่แต่ไม่ได้ใช้ยีนนี้ในการดำรงชีวิตโดยการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ในระบบบำบัดน้ำเสีย แต่

เดิมการศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์ใดๆในระบบเชื้อผสม (Mixed culture) ทำได้เพียงศึกษากับเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากระบบเท่านั้น อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคในการติดตามการย่อยสลายสารของจุลินทรีย์ในระบบเชื้อผสม และระบุชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ย่อยสลายสารเหล่านั้นได้ ยกตัวอย่างเช่นเทคนิค Fluorescence in situ hybridization in combination with microautoradiography (MAR-FISH) และ DNA-stable isotope probing (DNA-SIP) เป็นต้น

งานตีพิมพ์ที่ศึกษากิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียมีอยู่อย่างจำกัด ในปี 2011 Mußmann และคณะ พบว่าระบบบำบัดน้ำเสียจากโรงกลั่นมีจำนวน AOA มากกว่า AOB 10,000 เท่า แต่ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MAR-FISH กลับไม่พบการดิงสารอนินทรีย์คาร์บอนเข้าสู่เซลล์ของ AOA ระหว่างการออกซิไดซ์แอมโมเนียของตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียดังกล่าว ซึ่งเป็นไปได้ว่า AOA เหล่านี้ไม่ได้ออกซิไดซ์แอมโมเนียในระบบ แต่อาศัยช่องทางอื่นในการดำรงชีวิตในระบบบำบัดน้ำเสียนี้ อย่างไรก็ตามในปี 2016-2017 ได้มีการคัดแยก AOA จากระบบบำบัดน้ำเสียได้เป็นผลสำเร็จโดย *Candidatus Nitrosotenuis cloacae* และ *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare* ถือเป็น AOA เพียง 2 ตัว ที่เป็นตัวแทนของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสีย โดยเป็นการคัดแยกจากระบบบำบัดน้ำเสียในจีนและแคนาดาตามลำดับ (Li และคณะ 2016; Sauder และคณะ 2017) ผลการศึกษาพบว่า AOA ทั้ง 2 ตัวนี้สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนโตรทโดยใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานได้ จะเห็นได้ว่าการศึกษากิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียนอกจากจะมีอยู่อย่างจำกัดแล้ว ผลการศึกษายังมีความขัดแย้งกัน ทำให้มีความจำเป็นต้องศึกษากิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียอื่นๆอีก

ด้วยเหตุผลดังกล่าวงานวิจัยนี้ต้องการศึกษากิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียในประเทศไทย โดยอาศัยเทคนิคร่วมกัน 2 เทคนิคได้แก่ DNA-stable isotope probing (DNA-SIP) และสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่ม AOA และ AOB การใช้เทคนิค DNA-SIP อยู่ภายใต้สมมติฐานที่ว่า AOA และ AOB ใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงานและใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นการเจริญเติบโตแบบออโตโทรฟระหว่างที่ออกซิไดซ์แอมโมเนีย ซึ่งหากมีการตรวจพบการใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนใน AOA และ AOB ด้วยเทคนิค DNA-SIP ย่อมมีความเป็นไปได้มากที่ AOA และ AOB จะออกซิไดซ์แอมโมเนียได้ การทดลอง DNA-SIP ทำได้โดยการบ่มตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียกับไบคาร์บอเนตคาร์บอนไอโซโทป $^{12}\text{C-HCO}_3^-$ และ $^{13}\text{C-HCO}_3^-$ โดยหากจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตแบบออโตโทรฟ จุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวจะสะสม ^{12}C และ ^{13}C เข้าสู่เซลล์ และด้วยการปั่นแยกที่ความเร็วสูงในสารละลาย CsCl จะสามารถแยก DNA ที่มี ^{13}C ออกจาก DNA ที่มี ^{12}C ได้ เนื่องจากน้ำหนักของ DNA ที่มี ^{13}C จะหนักกว่า DNA ที่มี ^{12}C และเมื่อใช้เทคนิคโมเลกุล (Molecular technique) จะสามารถระบุได้ว่าจุลินทรีย์กลุ่มใดที่ใช้ ^{13}C ในการสร้างเซลล์และส่วนประกอบต่างๆของเซลล์เช่น DNA โดยการทดลองนี้จะใช้ยีน *amoA* เป็นยีนเป้าหมายของทั้ง AOA และ AOB เนื่องจากเป็นยีนที่ใช้ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนโตรท นอกจากนี้เนื่องจาก AOA และ AOB มีโครงสร้างเซลล์และมีวิธีการออกซิไดซ์แอมโมเนีย (Ammonia oxidation pathway) ที่แตกต่างกัน จึงสามารถใช้สารเคมีบางตัวเป็นสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่มของ AOA หรือ AOB ได้ ซึ่งจะช่วยในการจำแนกกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA หรือ AOB ในระบบเชื้อผสมที่มีจุลินทรีย์ทั้ง

สองกลุ่มนี้อยู่ด้วยกัน Allythiurea (ATU) มีเป้าหมายยับยั้งเอนไซม์ AMO ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย โดยจะทำหน้าที่ยับยั้ง Copper chelating ที่เอนไซม์ AMO (Shen และคณะ 2013) ทั้งนี้การตอบสนองต่อ ATU จะแตกต่างกันระหว่าง AOA และ AOB ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ยับยั้ง ความแตกต่างกันของรหัสกรดอะมิโน และความแตกต่างของสัดส่วนของ Copper ที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนในจีโนม (Shen และคณะ 2013; Li และคณะ 2017) จากการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์และตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม (Martens-Habbena และคณะ 2015) พบว่า AOB จะถูกยับยั้งได้ด้วย ATU ความเข้มข้นต่ำ ในขณะที่ AOA จะถูกยับยั้งด้วย ATU ที่ความเข้มข้นสูงกว่ามาก สาร 2-phenyl-4, 4, 5, 5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide (PTIO) เป็นสารที่เป็น NO scavenger โดย NO เป็นผลิตภัณฑ์ระหว่างกลางของการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ของ AOA (Walker และคณะ 2010) ผลการทดลองของ Martens-Habbena และคณะ (2015) พบว่า PTIO สามารถยับยั้งการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA สายพันธุ์บริสุทธิ์ ได้แก่ *Nitrososphaera viennensis*, *Nitrosopumilus maritimus* strain HCA1, และ *Nitrosopumilus maritimus* strain SCM1 ได้ โดยไม่มีผลยับยั้ง AOB งานวิจัยนี้จึงได้ใช้เทคนิค DNA-SIP และสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่ม AOA และ AOB ในการศึกษากระบวนการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสีย

วัตถุประสงค์

- เพื่อระบุการออกซิไดซ์แอมโมเนียแบบอโตโทรฟของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียจริงด้วยเทคนิค DNA-SIP
- เพื่อพัฒนาสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่มสำหรับการตรวจวัดกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA และ AOB ในระบบที่มีจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มนี้อยู่ด้วยกัน
- เพื่อระบุกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA และ AOB ด้วยเทคนิค DNA-SIP พร้อมด้วยสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่ม
- เพื่อตรวจวัดกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียจริงด้วยสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่ม

วิธีการทดลอง

1. ภาพรวมการทดลอง

งานวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 6 การทดลอง การทดลองที่ 1: “การคัดเลือกระบบบำบัดน้ำเสีย” เป็นการตรวจวัดจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสีย 8 ระบบ ด้วยเทคนิค qPCR เพื่อเลือกระบบในการทดลองถัดไป การทดลองที่ 2 “การระบุการออกซิไดซ์แอมโมเนียแบบอโตโทรปของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียจริงด้วยเทคนิค DNA-SIP” การทดลองนี้เป็นการใช้เทคนิค DNA-SIP ในการระบุการออกซิไดซ์แอมโมเนียแบบอโตโทรปของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียจริง 3 ระบบ ทั้งนี้จะใช้ $^{13}\text{C-HCO}_3^-$ เป็นฉลากในการตรวจวัดการใช้ไบคาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างเซลล์ของ AOA และ AOB ซึ่งหากมีการใช้ไบคาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างเซลล์ ก็จะมีแนวโน้มที่ AOA และ AOB จะใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งหมายความว่า AOA และ AOB มีส่วนร่วมในการออกซิไดซ์แอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสีย การทดลองที่ 3 “การศึกษาสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่มสำหรับการตรวจวัดกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA และ AOB” การทดลองนี้จะเป็นการทดสอบการใช้สารยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA และ AOB อันได้แก่ ATU และ PTIO ตามลำดับ กับตะกอนจากถังปฏิกรณ์จากห้องปฏิบัติการ สาเหตุที่การทดลองนี้ใช้ตะกอนจากถังปฏิกรณ์จากห้องปฏิบัติการ ก็เพื่อลดผลกระทบของจุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรปที่พบมากในตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียจริงต่อสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่ม โดยหลังจากที่เลือกความเข้มข้นของสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่มได้แล้ว จะนำไปทดสอบร่วมกับเทคนิค DNA-SIP ดังการทดลองที่ 4 “การระบุกิจกรรมของ AOA และ AOB ด้วยเทคนิค DNA-SIP พร้อมด้วยสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่ม” ซึ่งเป็นการศึกษาการใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนในการสร้างเซลล์โดย AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์จากห้องปฏิบัติการ และเป็นการศึกษาผลของสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่มที่ความเข้มข้นที่เลือกต่อการสร้างเซลล์ของ AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์จากห้องปฏิบัติการ เมื่อยืนยันแล้วว่าสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่มที่ความเข้มข้นที่เลือกสามารถยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มเดียว โดยจุลินทรีย์อีกกลุ่มยังทำงานได้อยู่ จะนำสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่มที่ความเข้มข้นที่เลือก ไปใช้ในการศึกษากิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียจริง ดังการทดลองที่ 5 “การตรวจวัดกิจกรรมของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียจริงด้วยสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่ม” โดยเป็นการศึกษากับระบบบำบัดน้ำเสียจริง 5 ระบบ ส่วนการทดลองที่ 6 “ผลของสารพาราไดโรฟีนอลและอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อกิจกรรมของ AOB” เป็นการทดลองเสริมเพิ่มเติมจากโครงการ ซึ่งเป็นการศึกษาผลของสารเคมี 2 ชนิดนี้กับกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOB ในถังปฏิกรณ์จากห้องปฏิบัติการ

2. การทดลองที่ 1: การคัดเลือกระบบบำบัดน้ำเสีย

การทดลองที่ 1 เป็นการตรวจวัดจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ของระบบบำบัดน้ำเสีย 8 ระบบ ด้วยเทคนิค qPCR เพื่อเลือกระบบในการทดลองถัดไป ระบบบำบัดน้ำเสียทั้ง 8 ระบบ ได้แก่ 1) WWTP 1 เป็นระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน

แบบตะกอนแขวนลอย มี BOD น้ำเข้าและออก 155 และ 9 mg l⁻¹ 2) WWTP 2 เป็นระบบบำบัดน้ำเสียตลาดสดแบบเซลล์
ตรึง มี COD น้ำเข้า 213 mg l⁻¹ แอมโมเนียน้ำเข้า 48 mgN l⁻¹ 3) WWTP 3 เป็นระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนแบบตะกอน
แขวนลอย มี BOD น้ำเข้าและออก 36 และ 7 mg l⁻¹ แอมโมเนียน้ำเข้าและออก 4 และ 1 mgN l⁻¹ 4) WWTP 4 เป็นระบบ
บำบัดน้ำเสียชุมชนแบบตะกอนแขวนลอย มี BOD น้ำเข้าและออก 24 และ 9 mg l⁻¹ แอมโมเนียน้ำเข้าและออก 8 และ 1 mgN
l⁻¹ 5) WWTP 5 เป็นระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนแบบตะกอนแขวนลอย มี BOD น้ำเข้าและออก 39 และ 11 mg l⁻¹ แอมโมเนีย
น้ำเข้าและออก 4 mgN l⁻¹ 6) WWTP 6 เป็นระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนแบบตะกอนแขวนลอย มี BOD น้ำเข้าและออก 36 และ
11 mg l⁻¹ แอมโมเนียน้ำเข้าและออก 5 และ 0.1 mgN l⁻¹ 7) NRI เป็นถังปฏิกรณ์ไนตริไฟอิงค์ที่ดำเนินระบบในห้องปฏิบัติการ
และ 8) NRII เป็นถังปฏิกรณ์ไนตริไฟอิงค์ที่ดำเนินระบบในห้องปฏิบัติการ โดยจะกล่าวรายละเอียดสำหรับถังปฏิกรณ์ NRI และ
NRII ในการทดลองที่ 3 ต่อไป

2.1 การตรวจวัดจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB

ทำการตรวจวัดจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ด้วย Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo, USA) กับเครื่อง Mx3005P instrument (Stratagene, USA) ใช้ไพรเมอร์ Arch-*amoA*F (5'-STAATGGTCTGGCTTAGACG-3') และ Arch-*amoA*R (5'-GCGGCCATCCATCTGTTGT-3') (Francis และคณะ 2005) สำหรับตรวจวัดจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และไพรเมอร์ *amoA*1F (5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3') และ *amoA*2R (5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3') (Rotthauwe และคณะ 1997) สำหรับตรวจวัดจำนวนยีน *amoA* ของ AOB ทำปฏิกิริยาที่ปริมาตร 25 µl ซึ่งประกอบไปด้วย 12.5 µl Master Mix (2X) 0.4 µM ของไพรเมอร์แต่ละเส้น 1 µl ของตัวอย่างดีเอ็นเอ ด้วยสภาวะดังนี้ 95 °C 10 min ตามด้วย 30 s 95 °C, 1 min 53 °C, 30 s 72 °C ทั้งหมด 30 รอบ ตามด้วยการตรวจวัดที่ 78 °C 15 s ดีเอ็นเอมาตรฐานเตรียมที่ 10² ถึง 10⁷ copies หลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยาตรวจความเฉพาะเจาะจงของผลิตภัณฑ์ด้วยการทำ melting curve analysis และ agarose gel electrophoresis

3. การทดลองที่ 2 การระบุการออกซิไดซ์แอมโมเนียแบบอโตโทรปของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียจริง ด้วยเทคนิค DNA-SIP

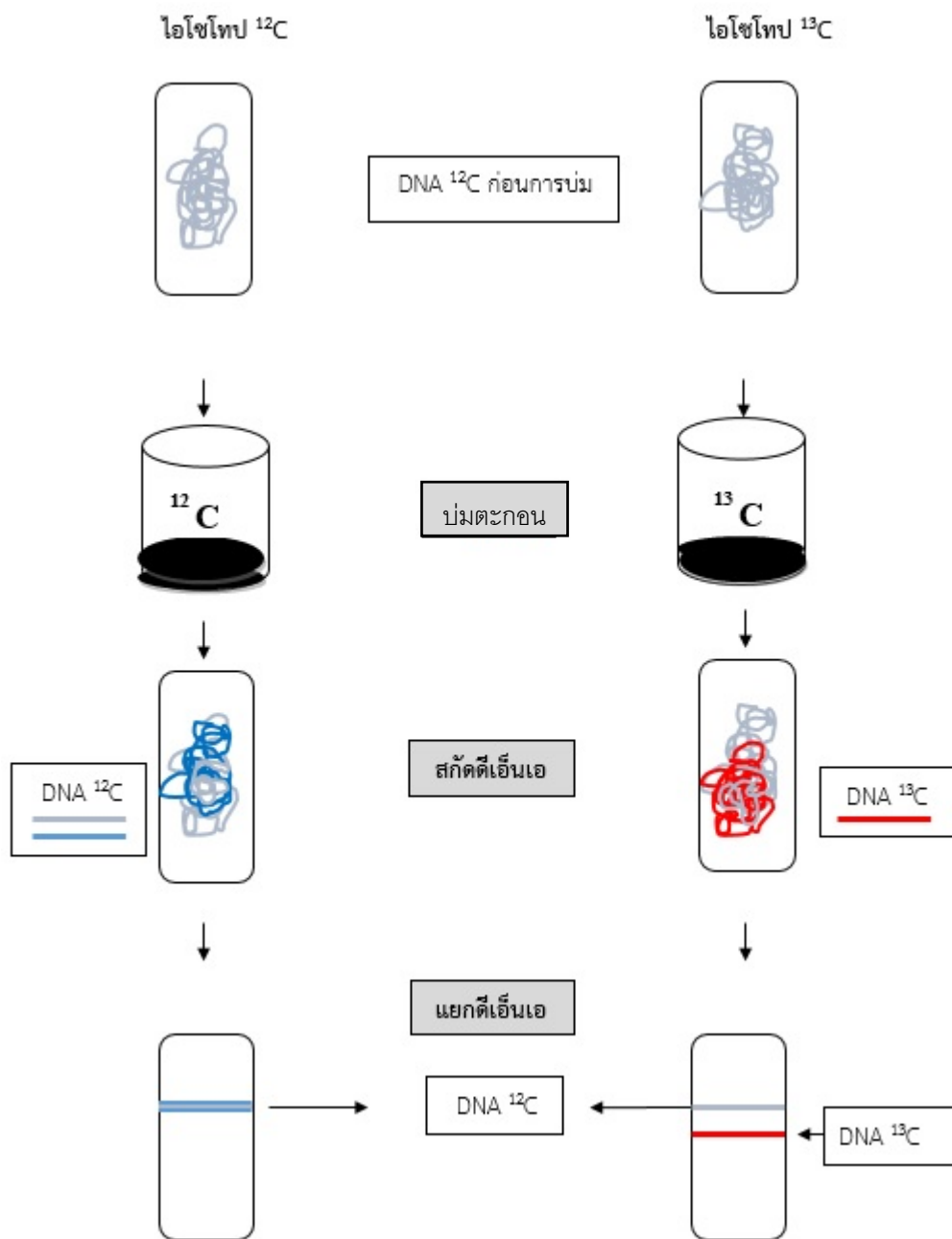
งานวิจัยนี้ใช้เทคนิค DNA stable isotope probing ในการระบุการทำงานแบบอโตโทรป (ใช้แหล่งคาร์บอนจาก HCO₃⁻) ของ AOA และ AOB โดยมีหลักการคือ ดูการกระจายตัวของดีเอ็นเอชนิดเดียวกันที่สร้างจาก HCO₃⁻ ที่มีคาร์บอนไอโซโทปแตกต่างกันระหว่าง ¹²C และ ¹³C โดยหลังการปั่นแยกด้วยเครื่อง Ultracentrifuge ดีเอ็นเอที่ถูกสร้างด้วยคาร์บอนไอโซโทป ¹³C จะมีการกระจายตัวในเกรเดียนต์ (Gradient) ของซีเซียมคลอไรด์ (CsCl) ในช่วงความหนาแน่นสูง ขณะที่ดีเอ็นเอที่ถูกสร้างด้วยคาร์บอนไอโซโทป ¹²C จะกระจายตัวอยู่ในช่วงความหนาแน่นต่ำกว่า ซึ่งกลุ่มดีเอ็นเอที่เกิดจากคาร์บอน

ไอโซโทป ^{13}C เมื่อนำไปศึกษาต่อในระดับสายพันธุ์ด้วยเทคนิค qPCR หรือ Clone library จะทำให้ทราบถึงกลุ่มจุลินทรีย์เป้าหมายที่ทำงานได้จริงในสภาวะและแหล่งคาร์บอนที่กำหนด

3.1 DNA-stable isotope probing

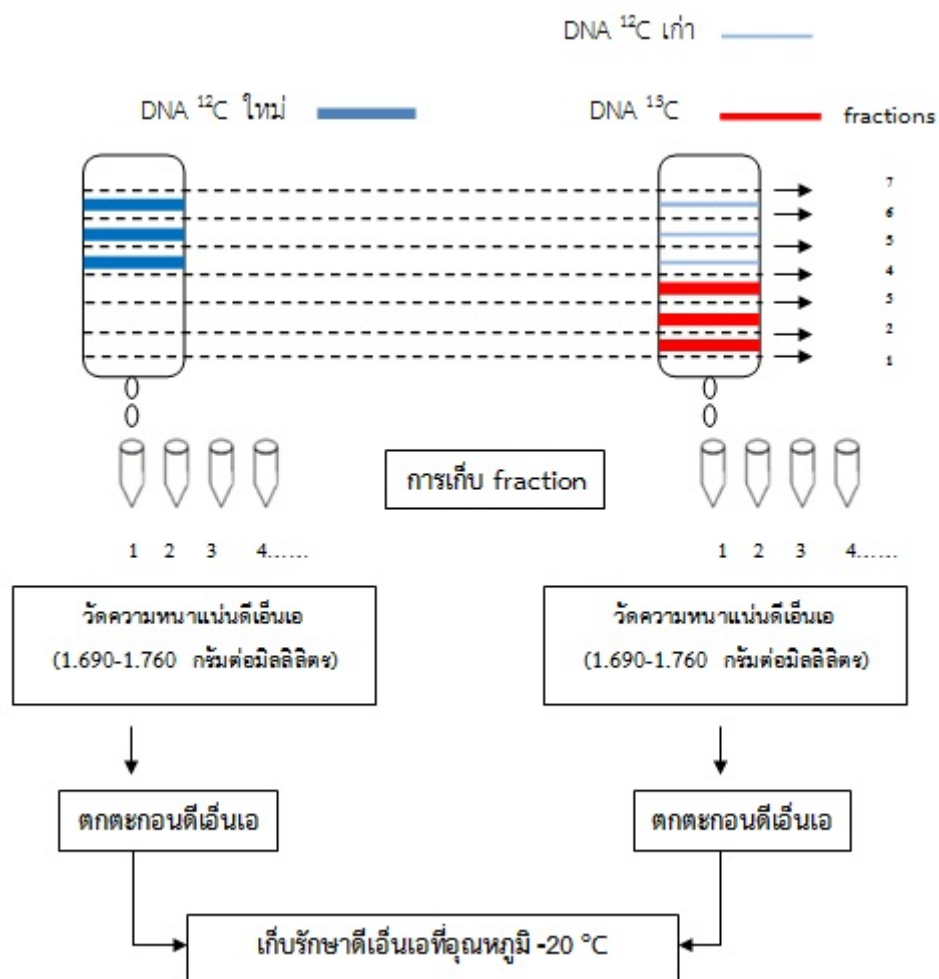
ทำการบ่มตะกอนในถังบ่มแบบไหลต่อเนื่องปริมาตร 1 l โดยให้ความเข้มข้นตะกอนเริ่มต้นในถังบ่มอยู่ที่ 50 mg l^{-1} โดยใน 1 ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบไปด้วย NH_4Cl , NaCl (1.0 g), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.4 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1 g), KCl (0.5 g), KH_2PO_4 (0.2 g), 2 mL of 1M สารละลาย NaHCO_3 , 1 ml nonchelated trace element mixture, 1 ml สารละลาย vitamin, 1 ml สารละลาย thiamin, 1 ml สารละลาย vitamin B12, 1 ml สารละลาย selenite-tungstate (Widdel et al. 1992) ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงมาจาก Konneke และคณะ (2005) และ Tourna และคณะ (2011) ใช้ถังบ่ม 2 ชุดประกอบด้วย $^{12}\text{C-HCO}_3$ และ $^{13}\text{C-HCO}_3$ ความเข้มข้น 1mM เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเดินระบบคู่กัน โดยมีระยะเวลาเก็บน้ำ 4 วัน เปิดเครื่องกวนผสมวันละ 8 ชั่วโมง รายละเอียดอื่น ๆ ปรับมาจาก Niu และคณะ (2013) กล่าวโดยย่อคือ เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้ปราศจาก ^{12}C โดยการไล่อากาศที่ $\text{pH} \leq 3$ โดยใช้อากาศที่ไม่มี CO_2 แล้วปรับ pH กลับมาที่ 7.4-7.8 การเติมอากาศใช้อากาศที่ไม่มี CO_2 โดยเติมวันละ 2 ครั้ง ทำการบ่มในที่มืด $\sim 28^\circ\text{C}$ นอกจากนี้ยังทำการบ่มถังบ่มที่ใช้ $^{13}\text{C-HCO}_3$ เป็นแหล่งคาร์บอนอีกชุดคู่ขนานกัน ระหว่างการบ่ม วัดความเข้มข้นแอมโมเนีย ไนโตรท และไนเตรท ในน้ำเข้าและน้ำออก เก็บตะกอนจากถังบ่มทุก 1 สัปดาห์ มาทำ DNA-SIP

สกัดดีเอ็นเอจากตะกอนด้วย Fast DNA SPIN Kit for Soil (QGiogene, Ohio, USA) จากนั้นวัดปริมาณดีเอ็นเอ แล้วบรรจุดีเอ็นเอลงหลอด 8 mL polyallomer centrifuge tubes โดยเริ่มจากการนำดีเอ็นเอปริมาณ 0.5-5 ไมโครกรัมผสมกับสารละลาย CsCl (7.163 M) และสารละลาย TRIS *GB BUFFER* (0.1M Tris HCl, pH 8.0; 1mM EDTA; 0.1M KCl) ปรับให้ได้ค่า Buoyant density สุดท้ายที่ 1.700 g/mL จากนั้นแทนที่ช่องว่างภายในหลอดที่เหลือด้วย Mineral oil จนเต็มหลอด จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่อง Ultracentrifuge Optima MAX-XP (Beckman, USA) เพื่อแยกชั้นดีเอ็นเอ โดยใช้ โรเตอร์ MLN-80 (Beckman, USA) ตั้งค่าความเร็วรอบ 44,100 รอบต่อวินาที (แรงหนีศูนย์กลางเฉลี่ย $178,000 g_{av}$) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดีเอ็นเอภายในหลอดจะเกิดการแยกชั้นตามน้ำหนักคาร์บอนไอโซโทป ^{12}C และ ^{13}C เมื่อเปรียบเทียบกับระดับชั้นดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันระหว่างหลอดไอโซโทป ^{12}C และ ^{13}C จะพบว่าภายในหลอดไอโซโทป ^{13}C จะพบดีเอ็นเอในระดับเดียวกันกับหลอดไอโซโทป ^{12}C ซึ่งเป็นดีเอ็นเอเดิมภายในเซลล์ก่อนการบ่มอยู่ และมีดีเอ็นเอบางส่วนซึ่งสร้างจากคาร์บอนไอโซโทป ^{13}C ระหว่างการบ่มอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าดีเอ็นเอชนิดเดียวกันเมื่อเทียบกับหลอดไอโซโทป ^{12}C แสดงการแยกดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการทำ DNA stable isotope probing (DNA-SIP)

การเก็บแฟรคชันจะเก็บทางปลายหลอดโดยแบ่งเก็บแฟรคชันละประมาณ 200-250 ไมโครลิตร โดยต้องเก็บให้ปริมาณใกล้เคียงกันทุกหลอด และจำนวนแฟรคชันระหว่าง ^{12}C และ ^{13}C ควรมีจำนวนเท่ากันเพื่อให้สามารถเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่พบในแต่ละแฟรคชันได้ จากนั้นวัดค่าความหนาแน่นของแต่ละแฟรคชันด้วยเครื่อง AR200 digital refractometer (Reichert, USA) จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอแต่ละแฟรคชันด้วย glycogen และ polyethylene glycol (PEG) ล้างดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol และเก็บรักษาดีเอ็นเอในสารละลาย TE buffer ที่อุณหภูมิ -20°C อนาคตจะตรวจสอบจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ด้วยเทคนิค qPCR ตามหัวข้อที่ 2.1



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการเก็บแฟรคชันและการตกตะกอนดีเอ็นเอ

3.2 การวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของยีน *amoA* ของ AOA และ AOB

ใช้ไพรเมอร์ CamoA-19f (5'- ATGGTCTGGYTWAGACG-3') และ CamoA-616r (5'- GCC ATCCABCKRTANGTC CA -3') (Pester และคณะ 2012) สำหรับการวิเคราะห์ ยีน *amoA* ของ AOA และไพรเมอร์ amoA1F (5'- GGGGTTTCTACTGGTGGT-3') และ amoA2R (5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3') สำหรับการวิเคราะห์ ยีน *amoA* ของ AOB (Rotthauwe และคณะ 1997) เตรียมส่วนผสม PCR ด้วย Thermo polymerase (Thermo., USA) และใช้เครื่อง Thermal cycler (Biorad Laboratories, USA) โดยใช้โปรแกรมดังนี้ 2 min 94 °C ตามด้วย 30 s 94 °C, 45 s 53 °C, 45 s 72 °C ทั้งหมด 30-35 รอบ ตามด้วย 10 min 72°C ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย NucleoSpin Extract II Kit (Clontech Laboratories Inc., USA) และทำโคลนนิ่งด้วย pGEM-T Easy vector system (Promega, USA) ส่ง Macrogen Inc., Korea เพื่อวิเคราะห์รหัสพันธุกรรม นำผลที่ได้มาทำ Operational taxonomic units (OTUs) ที่ 99% OTU identity ด้วยโปรแกรม using CD-HIT (Huang et al. 2010) นำรหัสพันธุกรรมที่เป็นตัวแทนไปวิเคราะห์ต้นไม้มีแผนภาพการด้วยโปรแกรม MAGA7 (Kumar et al. 2016)

4. การทดลองที่ 3 “การศึกษาสารยัยยังการทำงานเฉพาะกลุ่มสำหรับการตรวจวัดกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA และ AOB”

4.1 ถังปฏิกรณ์ไนโตรไฟอิง

ถังปฏิกรณ์ไนโตรไฟอิง 2 ถังได้แก่ NRI และ NRII เป็นถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องที่ไม่มีการเวียนตะกอน มีปริมาตร 5 l สำหรับถังปฏิกรณ์ NRI ใช้หัวเชื้อเริ่มต้นจากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน โดยการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์เฉพาะเจาะจงกับยีน *amoA* ของ AOA และ AOB พบ ยีนของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดในตัวอย่าง อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ NRI มีความเข้มข้นแอมโมเนีย เริ่มต้น 28 mgNl⁻¹ และใน 1 ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบไปด้วย NH₄Cl (0.107 g), NaCl (1.0 g), MgCl₂ · 6H₂O (0.4 g), CaCl₂ · 2H₂O (0.1 g), KCl (0.5 g), KH₂PO₄ (0.2 g), 2 mL of 1M สารละลาย NaHCO₃, 1 ml nonchelated trace element mixture, 1 ml สารละลาย vitamin, 1 ml สารละลาย thiamin, 1 ml สารละลาย vitamin B12, 1 ml สารละลาย selenite-tungstate (Widdel et al. 1992) ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงมาจาก Konneke และคณะ (2005) และ Tourna และคณะ (2011) ถังปฏิกรณ์ NRI เติมน้ำที่ระยะเวลาพัก 5 วัน สำหรับถังปฏิกรณ์ NRII ใช้หัวเชื้อเริ่มต้นจากระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรม โดยการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์เฉพาะเจาะจงกับยีน *amoA* ของ AOA และ AOB พบ แต่ AOB ในตัวอย่าง ใน 1 ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบไปด้วย NH₄Cl (1.05g), NaHCO₃ (1.5 g), Na₂HPO₄ (4.05 g), K₂HPO₄ (2.1 g), MgSO₄·7H₂O (0.05 g), CaCl₂·2H₂O (0.01 g) และ FeSO₄·7H₂O (0.09 g) (Rongsayamanont และคณะ 2010) โดยมีความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 420mgNl⁻¹ ถังปฏิกรณ์ NRI เติมน้ำที่ระยะเวลาพัก 4 วัน ถังปฏิกรณ์ ทั้ง 2 ถัง เติมน้ำที่ 27-30 °C pH 7.3-7.8 และ DO มากกว่า 2 mg l⁻¹ ทั้งนี้ได้เติมน้ำประมาณ 3 ปี ก่อนเริ่มการทดลอง ระหว่างการเติมน้ำ 3 ปี ตรวจวัดความเข้มข้นแอมโมเนีย ไนโตรท และไนเตรท ในน้ำออกอย่างสม่ำเสมอ



ภาพที่ 3 ถึงปฏิกรณ์ไนโตรไฟอิง

4.2 การเก็บตัวอย่างตะกอนและการสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างตะกอนจากถังปฏิกรณ์ NRI และ NRII เดือนละครั้ง เป็นระยะเวลา 14 และ 7 เดือนตามลำดับ ใช้ตะกอนน้ำหนักแห้งประมาณ 2 mg ในการสกัดดีเอ็นเอ สำหรับการทำให้ DNA-SIP ใช้ตัวอย่างน้ำ 400 ml จากถังบ่ม DNA-SIP กรองผ่านกระดาษกรอง 0.2 μm และตัดกระดาษกรองเป็นชิ้นเล็ก ๆ ไปสกัดดีเอ็นเอ สกัดดีเอ็นเอด้วย Fast-DNA SPIN kits for soil (QBiogene, USA) ตรวจสอบการสกัดดีเอ็นเอด้วย 2% agarose electrophoresis (Bio-Rad, Spain)

4.3 การตรวจวัดจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB

ดูหัวข้อ 2.1

4.4 การวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของยีน *amoA* ของ AOA และ AOB

ดูหัวข้อ 3.2

4.5 Scanning electron microscopy

ใช้เครื่อง SEM (JEOL, JSM-5410LV, Tokyo, Japan)

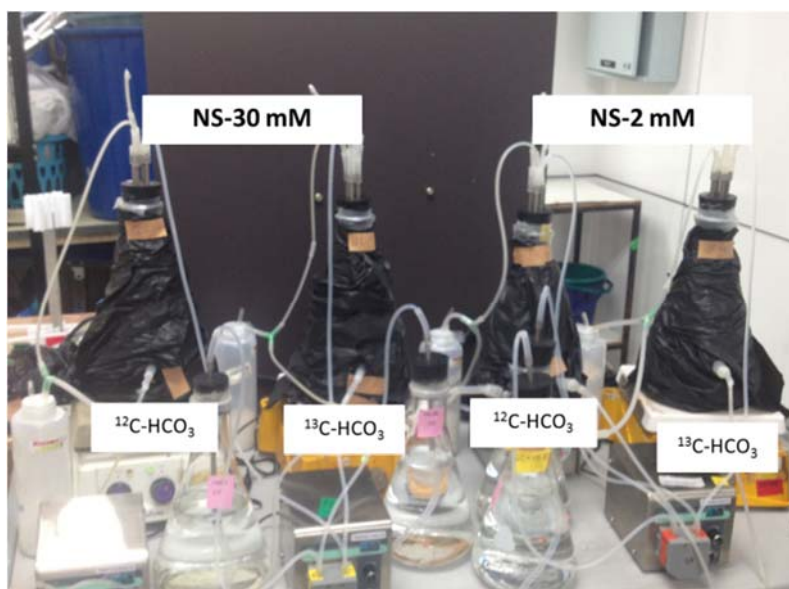
4.6 กิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มี ATU และ PTIO

นำตะกอนจากถังปฏิกรณ์ NRI และ NRII ใส่ขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 ml ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 70 mgMLSS l^{-1} เติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี HEPES ปริมาตร 200 ml ลงในขวด โดยอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgN l^{-1} เติม ATU และ PTIO โดยใช้ความเข้มข้น ATU ที่ 10, 30, 50, 80, 100, 150, 200, 500, 1000 และ 2000 μM ส่วน PTIO ใช้ความเข้มข้น 50, 100 และ 300 μM นอกจากนี้ยังทำการทดลองที่เติม 100 μM ATU ร่วมกับ PTIO ความเข้มข้น 30, 80, 150 และ 2000 μM แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ ทำการบ่มในที่มืด 28°C เก็บตัวอย่างน้ำจากแต่ละซ้ำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นแอมโมเนียจำนวน 3 ซ้ำ

5. การทดลองที่ 4 การระบุกิจกรรมของ AOA และ AOB ด้วยเทคนิค DNA-SIP พร้อมด้วยสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่ม

5.1 DNA-stable isotope probing

ทำการทดลอง DNA-SIP กับตะกอนจากถังปฏิกรณ์ NRI เพื่อตรวจสอบการใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนในการสร้างเซลล์โดย AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์ ทำการบ่มตะกอนในถังบ่มแบบไหลต่อเนื่องปริมาตร 1 l โดยให้ความเข้มข้นตะกอนเริ่มต้นในถังบ่มที่ 70 mg l^{-1} ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเดียวกับที่ใช้กับถังปฏิกรณ์ NRI โดยมีความเข้มข้นแอมโมเนีย 14 mgN l^{-1} ใช้ถังบ่ม 2 ชุดประกอบด้วย $^{12}\text{C-HCO}_3$ และ $^{13}\text{C-HCO}_3$ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเดินระบบคู่กัน ระยะเวลาที่เก็บน้ำของถังบ่มอยู่ที่ 5 วัน รายละเอียดอื่น ๆ ดูหัวข้อ 3.1 นอกจากนี้ยังทำการบ่มถังบ่มที่ใช้ $^{13}\text{C-HCO}_3$ เป็นแหล่งคาร์บอนอีกชุดคู่ขนานกัน โดยถังบ่มนี้มีการเติม ATU ที่ความเข้มข้น 80 μM ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อศึกษาผลของ ATU ที่ความเข้มข้นดังกล่าวต่อการสร้างเซลล์ของ AOA และ AOB



ภาพที่ 4 ถังบ่ม DNA-SIP

6. การทดลองที่ 5 การตรวจวัดกิจกรรมของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียจริงด้วยสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่ม

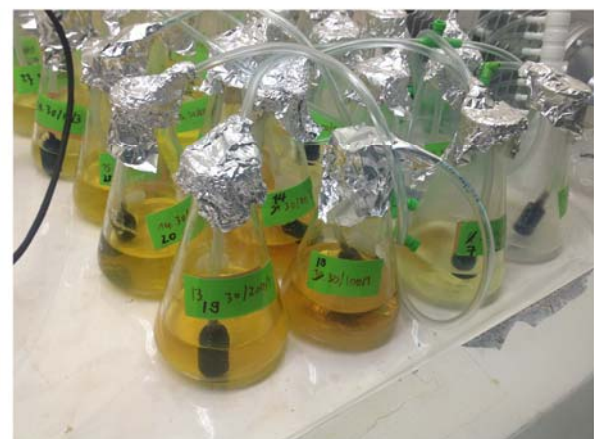
ทำการทดลองเช่นเดียวกับหัวข้อที่ 4.6 โดยใช้ความเข้มข้น ATU ที่ 10, 30, 50, 80, 100, 150, 200, 500, 1000 และ 2000 μM กับตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียจริง

7. การทดลองที่ 6 ผลของสารพาราไตรโทรฟินอลและอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อกิจกรรมของ AOB

การทดลองนี้ถือเป็นส่วนเสริมเพิ่มเติมจากโครงการ โดยเป็นการศึกษาผลของสารพาราไตรโทรฟินอล (Paranitrophenol, PNP) และอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อกิจกรรมของ AOB ในเบื้องต้นโดยใช้ตะกอนจากถังปฏิกรณ์ NRII

7.1 ผลของสารพาราไตรโทรฟินอลต่อกิจกรรมของ AOB

ในแต่ละชุดการทดลองใช้ตะกอนจากถังปฏิกรณ์ NRII โดยให้ความเข้มข้น MLSS เริ่มต้นในชุดทดลอง 70 mg l^{-1} ความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 14 mgN l^{-1} ความเข้มข้นของ PNP ที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ 0, 1, 5, 10, 50, 100, 200 และ 400 mg l^{-1} (ภาพที่ 5) เก็บตัวอย่างน้ำเพื่อวัดความเข้มข้นแอมโมเนีย



ภาพที่ 5 ผลของสารพาราไตรโทรฟินอลต่อกิจกรรมของ AOB

7.2 ผลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อกิจกรรมของ AOB

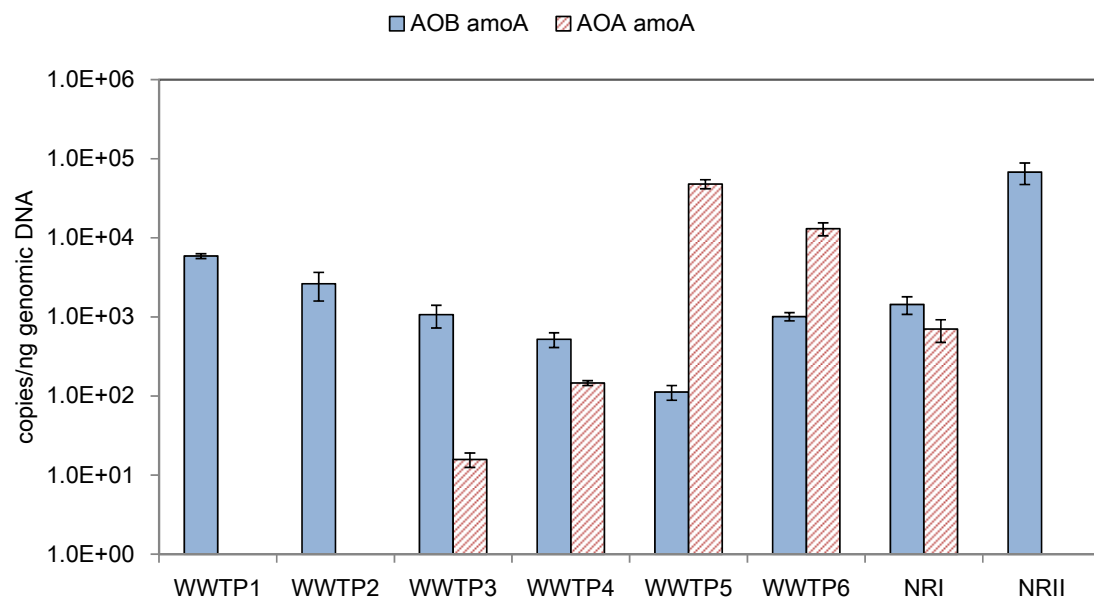
ในแต่ละชุดการทดลองใช้ตะกอนจากถังปฏิกรณ์ NRII โดยให้ความเข้มข้น MLSS เริ่มต้นในชุดทดลอง 50 mg l^{-1} ความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้น 14 mgN l^{-1} ความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ 1, 10 และ 100 mg l^{-1} เก็บตัวอย่างน้ำเพื่อวัดความเข้มข้นแอมโมเนีย

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลองที่ 1

การคัดเลือกระบบบำบัดน้ำเสีย

ในเบื้องต้นได้คัดเลือกระบบบำบัดน้ำเสีย 8 ระบบ โดย 6 ระบบเป็นระบบบำบัดน้ำเสียจริง (WWTP1-WWTP6) และอีก 2 ระบบเป็นถังปฏิกรณ์ไนโตรไฟอิงที่เดินระบบในห้องปฏิบัติการ (NRI และ NRII) โดยระบบ WWTP1 WWTP3 WWTP4 WWTP5 และ WWTP6 เป็นระบบแบบตะกอนแขวนลอย (Suspended-growth system) ส่วนระบบ WWTP2 เป็นระบบแบบเซลล์ตรึง (Attached-growth system) ส่วนระบบ NRI และ NRII เป็นระบบแบบตะกอนแขวนลอย ทำการตรวจวัดจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ในระบบด้วยเทคนิค qPCR ดังแสดงในภาพที่ 1-1 โดยพบทั้ง AOA และ AOB ในระบบ WWTP3 WWTP4 WWTP5 WWTP6 และ NRI สำหรับระบบ WWTP1 WWTP2 และ NRII พบเฉพาะ AOB โดยจำนวน AOA น้อยกว่า LOD (Limit of detection)

จากผลการทดลองได้ข้างต้นได้เลือกตะกอนจากระบบ WWTP3 WWTP4 และ WWTP6 สำหรับการทดลองที่ 2 “การระบุการออกซิไดซ์แอมโมเนียแบบอโตโทรฟของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียจริงด้วยเทคนิค DNA-SIP” เนื่องจากทั้ง 3 ระบบมีทั้ง AOA และ AOB อยู่ร่วมกัน แต่มีสัดส่วนประชากร AOA และ AOB แตกต่างกัน สำหรับการทดลองที่ 3 “การศึกษาสารยัยยังการทำงานเฉพาะกลุ่มสำหรับการตรวจวัดกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA และ AOB” ใช้ตะกอนจากระบบ NRI และ NRII เนื่องจากทั้ง 2 ระบบมีสัดส่วนประชากร AOA และ AOB แตกต่างกันอย่างมาก และที่ผ่านมาได้ใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่ไม่มีสารอินทรีย์ในการเลี้ยงระบบมาเป็นเวลานาน ทำให้จุลินทรีย์กลุ่มเฮเทโรโทรฟในระบบไม่มากเมื่อเทียบกับตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียจริง ทำให้ช่วยลดผลกระทบของจุลินทรีย์กลุ่มเฮเทโรโทรฟต่อการศึกษาสารยัยยังการทำงานเฉพาะกลุ่มได้ ซึ่งช่วยให้ผลการทดลองมีความชัดเจนยิ่งขึ้น สำหรับการทดลองที่ 4 “การระบุกิจกรรมของ AOA และ AOB ด้วยเทคนิค DNA-SIP พร้อมด้วยสารยัยยังการทำงานเฉพาะกลุ่ม” จะทำการทดลองกับตะกอนจากระบบ NRI และ NRII เนื่องจากเป็นการทดลองที่ต่อเนื่องจากการทดลองที่ 3 สำหรับการทดลองที่ 5 “การตรวจวัดกิจกรรมของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียจริงด้วยสารยัยยังการทำงานเฉพาะกลุ่ม” จะทำการศึกษากับตะกอนจากระบบบำบัด WWTP1 WWTP3 WWTP4 WWTP5 และ WWTP6 โดยเลือกตะกอนจากระบบบำบัด WWTP3 WWTP4 และ WWTP6 เนื่องจากเป็นระบบบำบัดที่เลือกสำหรับการทดลองที่ 2 ไว้แล้ว ส่วนสาเหตุที่เลือกตะกอนจากระบบ WWTP1 ด้วย เนื่องจากระบบนี้พบแต่ AOB ซึ่งจะยืนยันผลของสารยัยยังการทำงานเฉพาะกลุ่มต่อ AOB ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น ส่วนที่เลือกตะกอนจากระบบบำบัด WWTP5 ด้วยเนื่องจากเป็นระบบที่พบ AOA สูง สำหรับการทดลองที่ 6 “ผลของสารพาราไตรโอฟินอลและอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อกิจกรรมของ AOB” จะทำการศึกษากับระบบ NRII เท่านั้น โดยการทดลองนี้ถือเป็นส่วนเสริมเพิ่มเติมโครงการ



ภาพที่ 1-1 จำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียและถังปฏิกรณ์ไนตริไฟอิง

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลองที่ 2

การระบุการออกซิไดซ์แอมโมเนียแบบอโตโทรปของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียจริง

ด้วยเทคนิค DNA-SIP

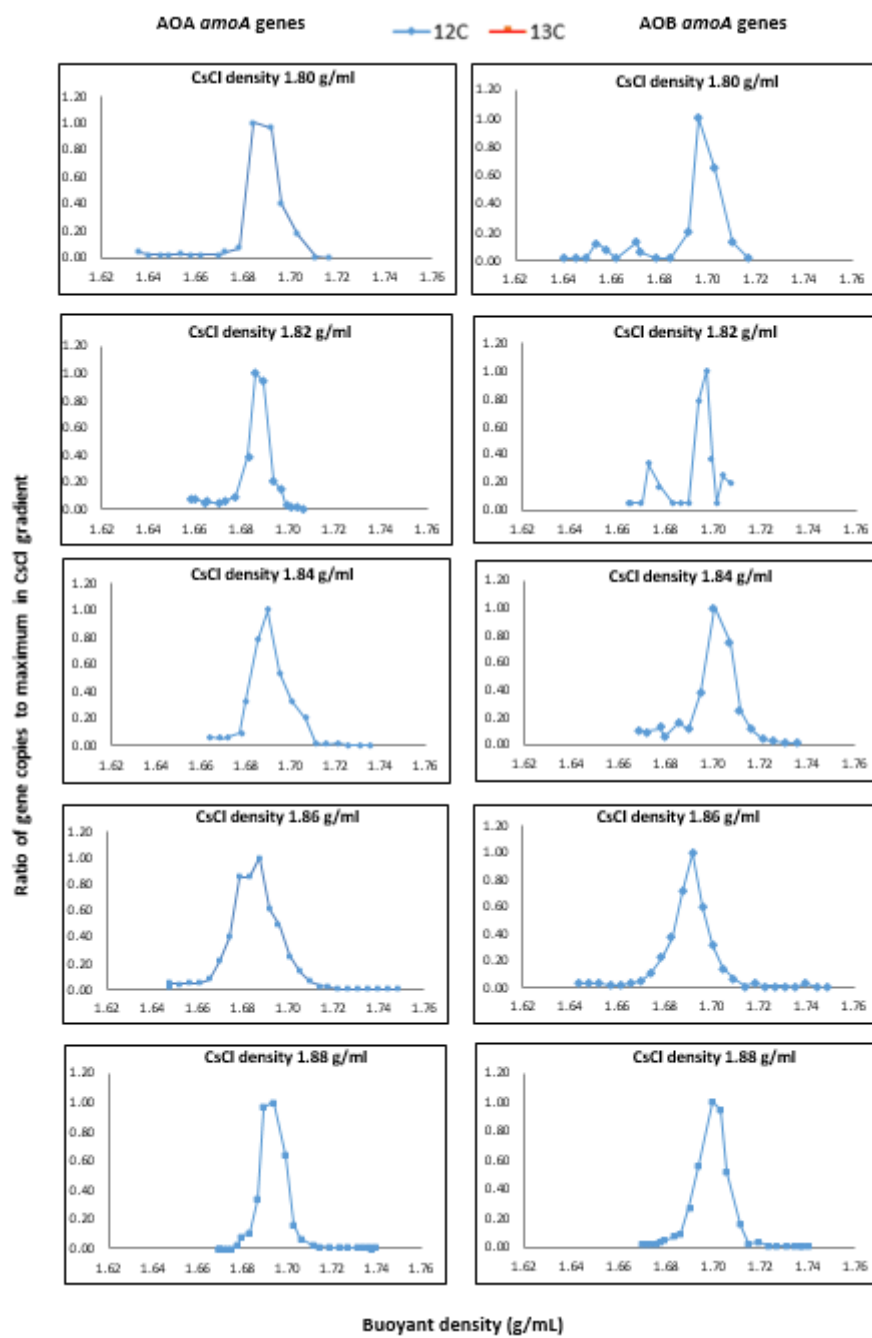
การทดลองนี้เป็นการใช้เทคนิค DNA-SIP ในการระบุการใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนในการสร้างเซลล์ของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียจริง 3 ระบบ ได้แก่ WWTP3 WWTP4 และ WWTP6 หลักการคือการตรวจสอบการกระจายตัวของดีเอ็นเอที่สร้างจาก HCO_3^- ที่มีคาร์บอนไอโซโทปแตกต่างกันระหว่าง $^{12}\text{C}-\text{HCO}_3^-$ และ $^{13}\text{C}-\text{HCO}_3^-$ โดยหลังการปั่นแยกด้วยเครื่อง Ultracentrifuge ดีเอ็นเอที่ถูกสร้างด้วยคาร์บอนไอโซโทป ^{13}C จะมีการกระจายตัวในเกรเดียนต์ของสารละลาย CsCl ในช่วงความหนาแน่นสูง ขณะที่ดีเอ็นเอที่ถูกสร้างด้วยคาร์บอนไอโซโทป ^{12}C จะกระจายตัวอยู่ในช่วงความหนาแน่นต่ำกว่า ซึ่งจะทราบผลเมื่อทำการเก็บแฟรคชัน และทำการตรวจวัดจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ในแต่ละแฟรคชันด้วยเทคนิค qPCR

ทั้งนี้ก่อนเริ่มการทดลองกับตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียจริง ต้องหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการกระจายตัวของดีเอ็นเอเสียก่อน เนื่องจากโรเตอร์ (Rotor) และเครื่อง Ultracentrifuge ที่ใช้ในการทดลองนี้มีลักษณะแตกต่างจากงานวิจัยที่ผ่านมา เช่น องค์การเอียงของโรเตอร์ต่อศูนย์กลาง ทิศทางของหลอดขณะเกิดการหมุนเหวี่ยง เป็นต้น ซึ่งอาจมีผลต่อการแยกตัวของดีเอ็นเอที่ต่างกันออกไป จึงจำเป็นต้องมีการทดลองแปรค่าปัจจัยที่มีผลต่อการแยกดีเอ็นเอ ได้แก่ ความเข้มข้นสารละลาย CsCl และ แรงหนีศูนย์กลาง (G-force) ที่ใช้

1. ผลของความเข้มข้นสารละลาย CsCl

หลักการกระจายตัวของดีเอ็นเอในสารละลาย CsCl ขึ้นอยู่กับ %GC ในดีเอ็นเอของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ สำหรับจุลินทรีย์กลุ่ม AOA และ AOB พบว่ามี %GC เฉลี่ยอยู่ที่ 45 % ดังนั้นการแปรค่าความเข้มข้นสารละลาย CsCl เริ่มต้นก่อนผสมกับดีเอ็นเอเพื่อนำไปปั่นแยกเกรเดียนต์ด้วยเครื่อง Ultracentrifuge จะทำให้เกิดช่วงเกรเดียนต์ของ CsCl แตกต่างกันไป ซึ่งทำให้ทราบค่าความเข้มข้นของสารละลาย CsCl เริ่มต้นที่เหมาะสมที่ครอบคลุมช่วงการกระจายตัวของดีเอ็นเอของ AOA และ AOB ที่เกิดจากคาร์บอนไอโซโทป ^{12}C และ ^{13}C ค่าความหนาแน่นเริ่มต้นของ CsCl ที่ทำการทดลองมีค่าดังนี้ 1.80 1.82 1.84 1.86 และ 1.88 g mL^{-1} ซึ่งทำการปั่นแยกด้วยเครื่อง Ultracentrifuge ที่อุณหภูมิ 20 °C ค่าความเร็วรอบของแรงหนีศูนย์กลาง (G-force) 178,000xg ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 2-1 จากการแปรค่าความหนาแน่นของ CsCl เริ่มต้นก่อนผสมกับดีเอ็นเอและนำไปแยกด้วยเครื่อง Ultracentrifuge พบว่าช่วงเกรเดียนต์การกระจายตัวของ CsCl จะแปรตามความหนาแน่นเริ่มต้นของ CsCl โดยที่ค่าความหนาแน่นเริ่มต้นของ CsCl ต่ำจะทำให้ช่วงเกรเดียนต์ค่าความหนาแน่นของ CsCl ต่ำด้วย พิจารณาจากยอดพีคของคาร์บอนไอโซโทป ^{12}C ของ AOA และ AOB พบว่าทุกค่าความหนาแน่นของ CsCl เริ่มต้น ของยอดกราฟ AOA อยู่ที่ประมาณ 1.69 g mL^{-1} ขณะที่ AOB ยอดกราฟอยู่ที่ประมาณ 1.70 g mL^{-1} จาก

ทฤษฎีระบุว่าหากเซลล์มีการสะสม ^{13}C เข้าสู่เซลล์ 100% การเคลื่อนที่ของกราฟ ^{13}C จะเคลื่อนที่ไปทางขวาโดยยอดกราฟของ ^{13}C จะห่างจากยอดกราฟของ ^{12}C อยู่ 0.036 g mL^{-1} ดังนั้นการเลือกช่วงการกระจายเกรเดียนท์ของ CsCl จึงต้องเลือกช่วงที่ครอบคลุมการเคลื่อนที่ของกราฟ ^{13}C เกิดจากการสะสม ^{13}C เข้าสู่เซลล์ ของ AOA และ AOB ซึ่งมีค่า 1.726 และ 1.736 g mL^{-1} ตามลำดับ จากการพิจารณากราฟ DNA-SIP พบว่าที่ค่าความหนาแน่นเริ่มต้นของ CsCl 1.88 g mL^{-1} (โดยจะได้ค่าความหนาแน่นเมื่อผสมสารละลายทุกตัวแล้วที่ 1.70 g mL^{-1}) เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการแยกดีเอ็นเอของกลุ่มจุลินทรีย์ AOA และ AOB ซึ่งค่าความหนาแน่นดังกล่าวจะถูกใช้เป็นค่าความหนาแน่นเริ่มต้นของ CsCl ในการแปรค่าความเร็วรอบของแรงหนีศูนย์กลางเพื่อหาค่าที่เหมาะสม

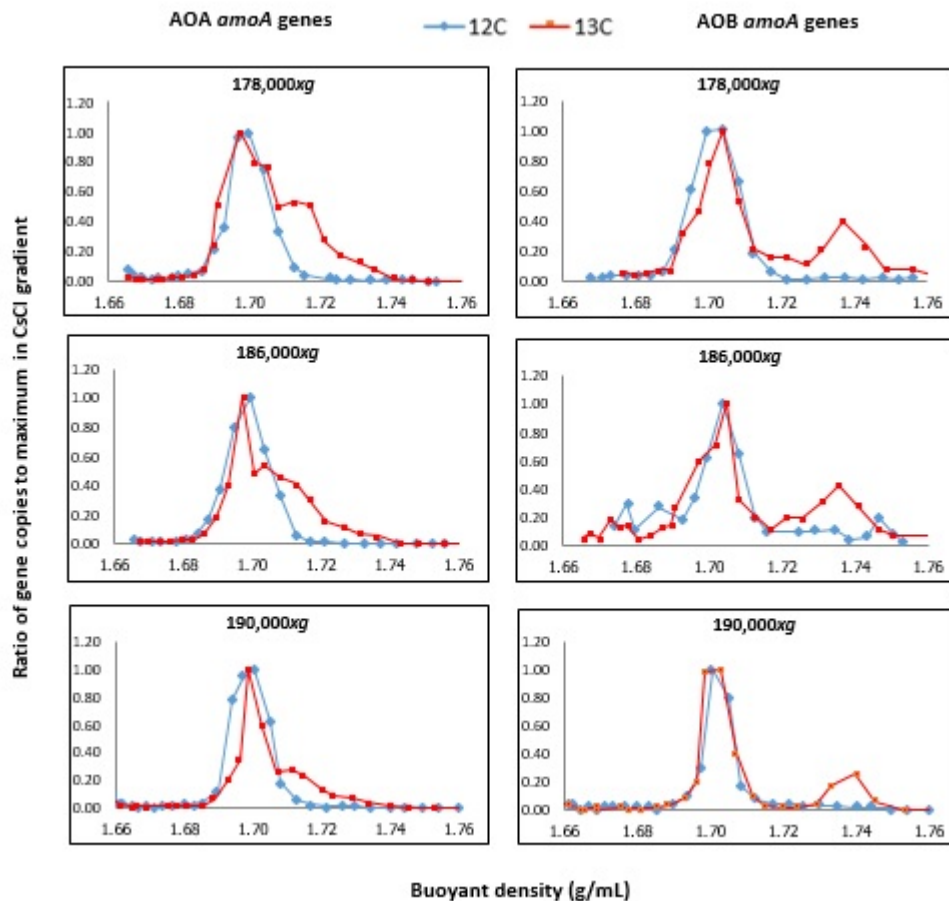


ภาพที่ 2-1 การเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวของดีเอ็นเอสำหรับยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ที่ความหนาแน่นเริ่มต้นของ CsCl ต่างๆ

2. ผลของแรงหนีศูนย์กลาง (G-force)

แรงหนีศูนย์กลางขณะทำการปั่นแยกดีเอ็นเอ มีผลต่อการแยกดีเอ็นเอที่มีการสะสมของคาร์บอนไอโซโทปที่แตกต่างกันระหว่าง ^{12}C และ ^{13}C โดยค่าความเร็วรอบที่ทำการทดลอง มี 3 ค่า ดังนี้ 178,000xg 184,000xg และ 190,000xg สำหรับการทดลองนี้ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างในน้ำประปาที่พบว่าเซลล์มีการสะสมคาร์บอนไอโซโทป ^{12}C และ ^{13}C เข้าสู่เซลล์อย่างแน่นอ ซึ่งผล DNA-SIP จะแสดงการแยกระหว่างกราฟ ^{12}C และ ^{13}C (ภาพที่ 2-2) ผลการแปรค่าแรงหนีศูนย์กลางพบว่า ทั้ง AOA และ AOB มีลักษณะการเคลื่อนที่ของกราฟ ^{12}C และ ^{13}C ที่เหมือนกัน คือ AOA มีพื้นที่ใต้กราฟบางส่วนทางด้านขวาของกราฟ ^{13}C ไม่ซ้อนทับกับกราฟ ^{12}C พื้นที่ดังกล่าวแสดงถึงสัดส่วนดีเอ็นเอที่เกิดจากการสะสมของ ^{13}C ซึ่งหนักกว่าดีเอ็นเอปกติที่สร้างจาก ^{12}C ดังนั้นช่วงค่าความหนาแน่นของช่วงกราฟ ^{13}C ($1.68\text{-}1.74\text{ g mL}^{-1}$) จึงมีค่าสูงกว่าช่วงค่าความหนาแน่นของช่วงกราฟ ^{12}C ($1.68\text{-}1.72\text{ g mL}^{-1}$) ขณะที่ AOB เกิดการแยกพีคระหว่าง กราฟ ^{12}C และ ^{13}C อย่างชัดเจน โดยยอดกราฟของทั้งสองกราฟมีค่าความหนาแน่นต่างกันอยู่ประมาณ 0.04 g mL^{-1} ดังนั้นการพิจารณาเลือกค่าแรงหนีศูนย์กลางจึงเลือกพิจารณาจากผล DNA-SIP ของ AOA เป็นหลัก ซึ่งค่าแรงหนีศูนย์กลางที่มีการแยกของกราฟ ^{13}C ที่ชัดเจนที่สุดคือ 178,000xg และเมื่อมีการปรับค่าแรงหนีศูนย์กลางให้สูงขึ้นพบว่ายอดกราฟ ^{13}C ของ AOA มีการแยกที่น้อยลง

ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้สำหรับการแยกยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ด้วยเครื่อง Ultracentrifuge มีดังนี้ ค่าความหนาแน่นเริ่มต้นของ Cscl 1.88 g mL^{-1} (โดยจะได้ค่าความหนาแน่นเมื่อผสมสารละลายทุกตัวแล้วที่ 1.70 g mL^{-1}) ค่าแรงหนีศูนย์กลาง 178,000xg อุณหภูมิขณะปั่นแยก 20 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการปั่น 72 ชั่วโมง

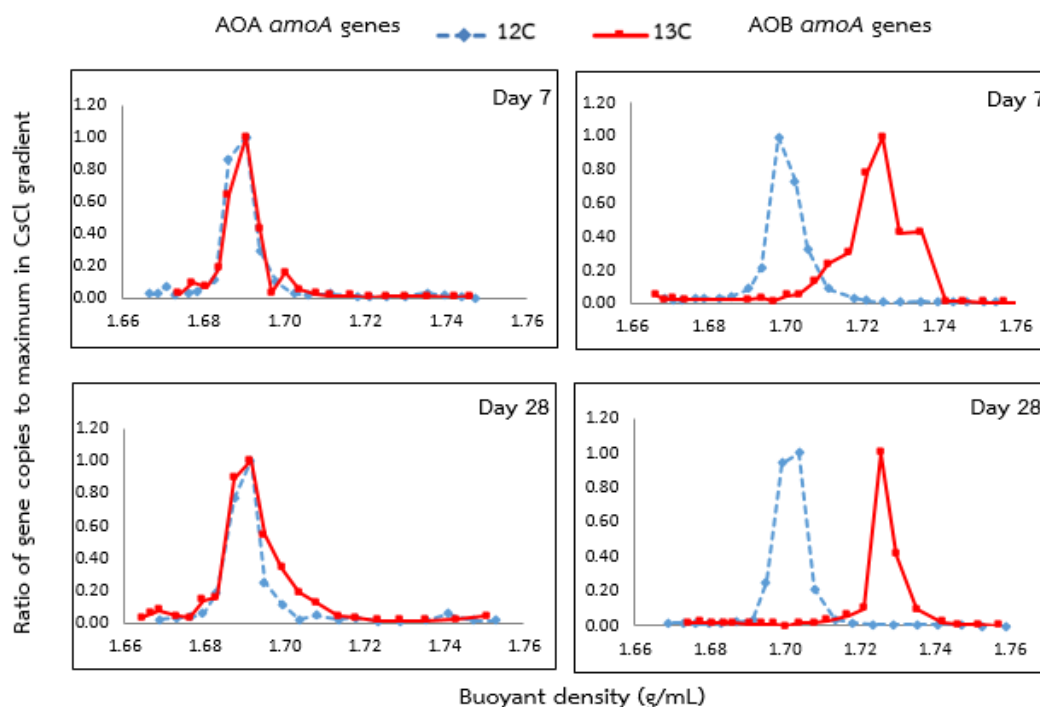


ภาพที่ 2-2 การเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวของดีเอ็นเอสำหรับยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ที่แรงหนีศูนย์กลาง (G-force) ต่างๆ

3. การระบุการออกซิไดซ์แอมโมเนียแบบอโตโทรปของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียจริง

จากผลการทดลองที่ 1 ได้เลือกตะกอนจากระบบ WWTP3 WWTP4 และ WWTP6 มาใช้สำหรับการทดลองที่ เนื่องจากทั้ง 3 ระบบมีทั้ง AOA และ AOB อยู่ร่วมกัน แต่มีสัดส่วนประชากร AOA และ AOB แตกต่างกันโดย WWTP3 มี AOA น้อยกว่า AOB WWTP4 มี AOA ใกล้เคียงกับ AOB และ WWTP6 มี AOA มากกว่า AOB

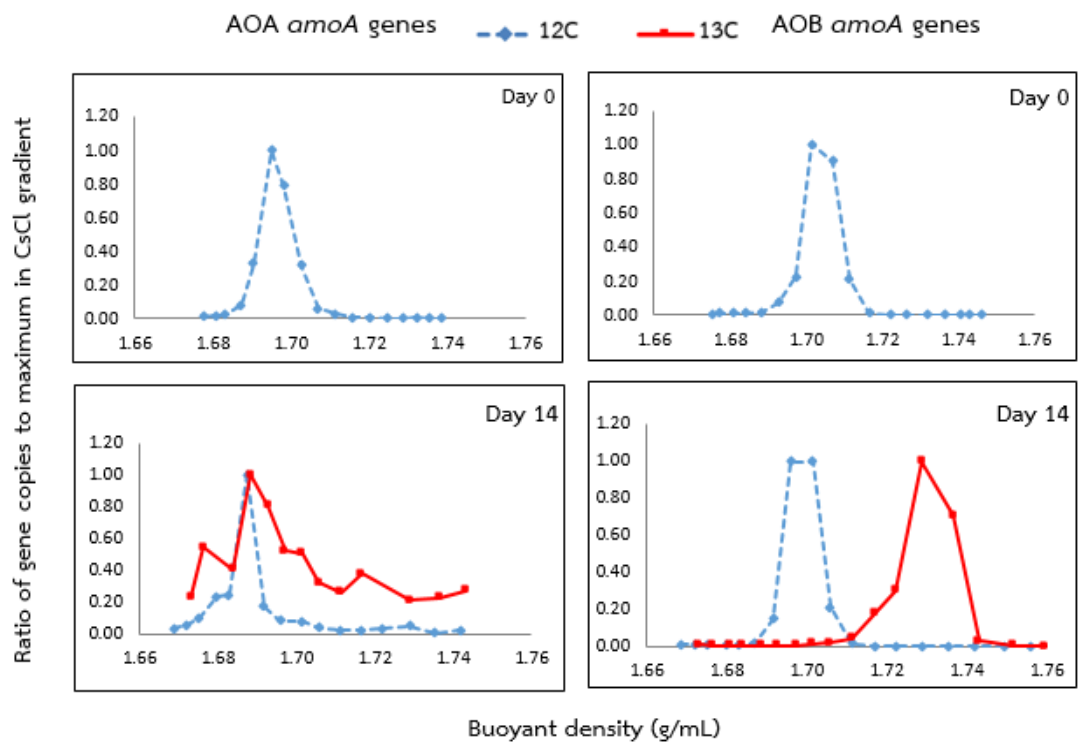
4. การระบุการออกซิไดซ์แอมโมเนียแบบอโตโทรปของ AOA และ AOB ในระบบบำบัด WWTP2



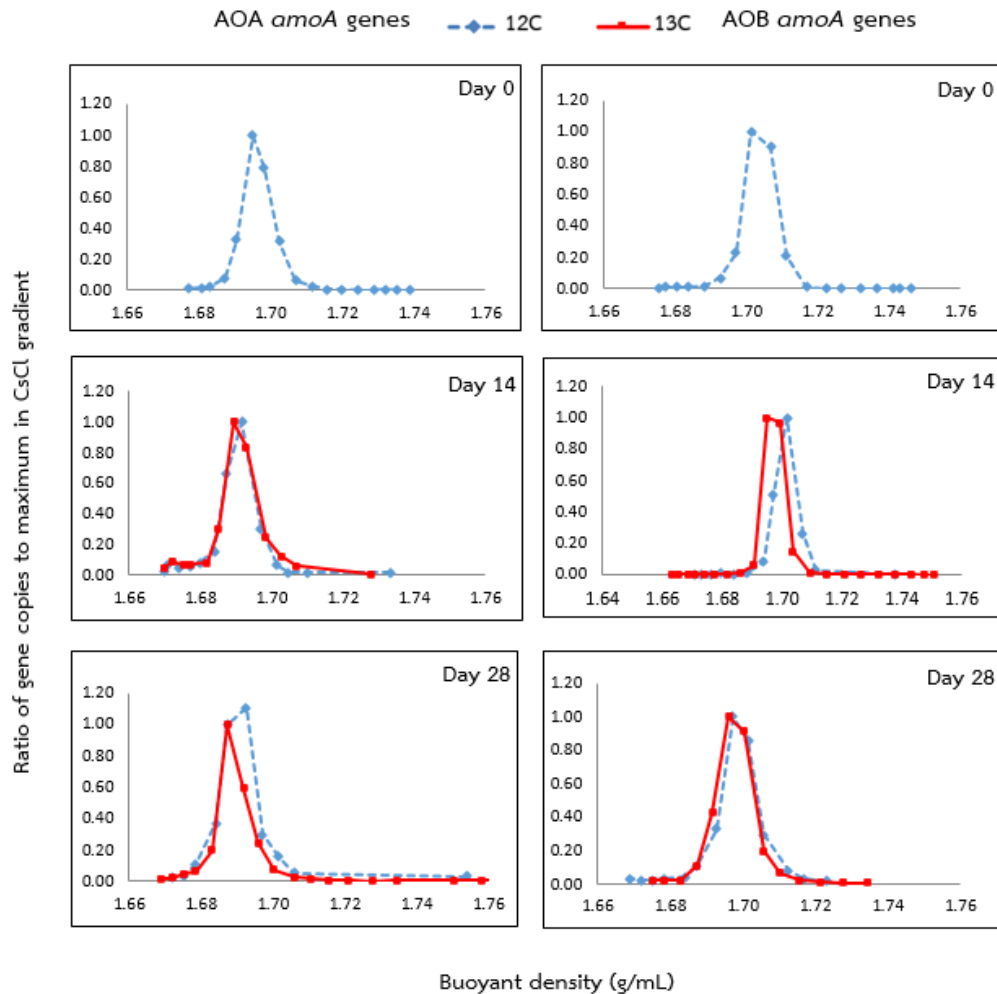
ภาพที่ 2-3 การเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวของดีเอ็นเอสำหรับ ยีน *amoA* ของ AOA (แถวซ้าย) และ ยีน *amoA* ของ AOB (แถวขวา) ของตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP2 ความเข้มข้นแอมโมเนีย $7 \text{ mgNH}_4^+-\text{N/L}$ รอบที่ 1

ภาพที่ 2-3 และ ภาพที่ 2-4 แสดงผลการทำ DNA-SIP จากตัวอย่างตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP2 ในรอบที่ 1 และ 2 โดยใช้ตะกอนที่เก็บจากช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 5 เดือน เพื่อเป็นการทำซ้ำสำหรับยืนยันผลการทดลอง ความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำขาเข้าอยู่ที่ $7 \text{ mgNH}_4^+-\text{N L}^{-1}$ และความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้นในถังบ่มอยู่ที่ $0.5 \text{ mgNH}_4^+-\text{N L}^{-1}$ ผลการทดลองพบว่าในรอบที่ 1 (ภาพที่ 2-3) เมื่อการบ่มผ่านไป 28 วัน ไม่มีการเคลื่อนที่ของกราฟ ^{13}C ของ ยีน *amoA* ของ AOA ขณะที่ ยีน *amoA* ของ AOB มีการเคลื่อนที่ของกราฟ ^{13}C แยกออกจากกราฟ ^{12}C อย่างชัดเจนเมื่อการบ่มผ่านไป 7 วัน และได้ผลการทดลองลักษณะเดียวกันเมื่อทำการบ่มซ้ำรอบที่ 2 (ภาพที่ 2-4)

เมื่อทำการบ่มตะกอนโดยไม่เติมแอมโมเนียให้แก่น้ำขาเข้า แต่มีไบคาร์บอเนตตามเดิม พบว่าเมื่อบ่มตะกอนไป 28 วัน (ภาพที่ 2-5) ไม่มีการเคลื่อนที่ของกราฟ ^{13}C ของทั้งยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า AOB สามารถใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนมาใช้ในการสร้างเซลล์และส่วนประกอบต่างๆของเซลล์เช่น ดีเอ็นเอ ได้ เมื่อมีการใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงาน โดยจะไม่มีการใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนเมื่อไม่มีแอมโมเนีย แสดงให้เห็นว่า AOB มีส่วนร่วมในการออกซิไดซ์แอมโมเนียโดยตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP2 สำหรับ AOA ไม่พบการใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนมาใช้ในการสร้างเซลล์ในสภาวะที่มีแอมโมเนีย แสดงให้เห็นว่า AOA ไม่ได้ร่วมออกซิไดซ์แอมโมเนียในตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP2



ภาพที่ 2-4 การเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวของดีเอ็นเอสำหรับ ยีน *amoA* ของ AOA (แถวซ้าย) และ ยีน *amoA* ของ AOB (แถวขวา) ของตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP2 ความเข้มข้นแอมโมเนีย $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$ รอบที่ 2

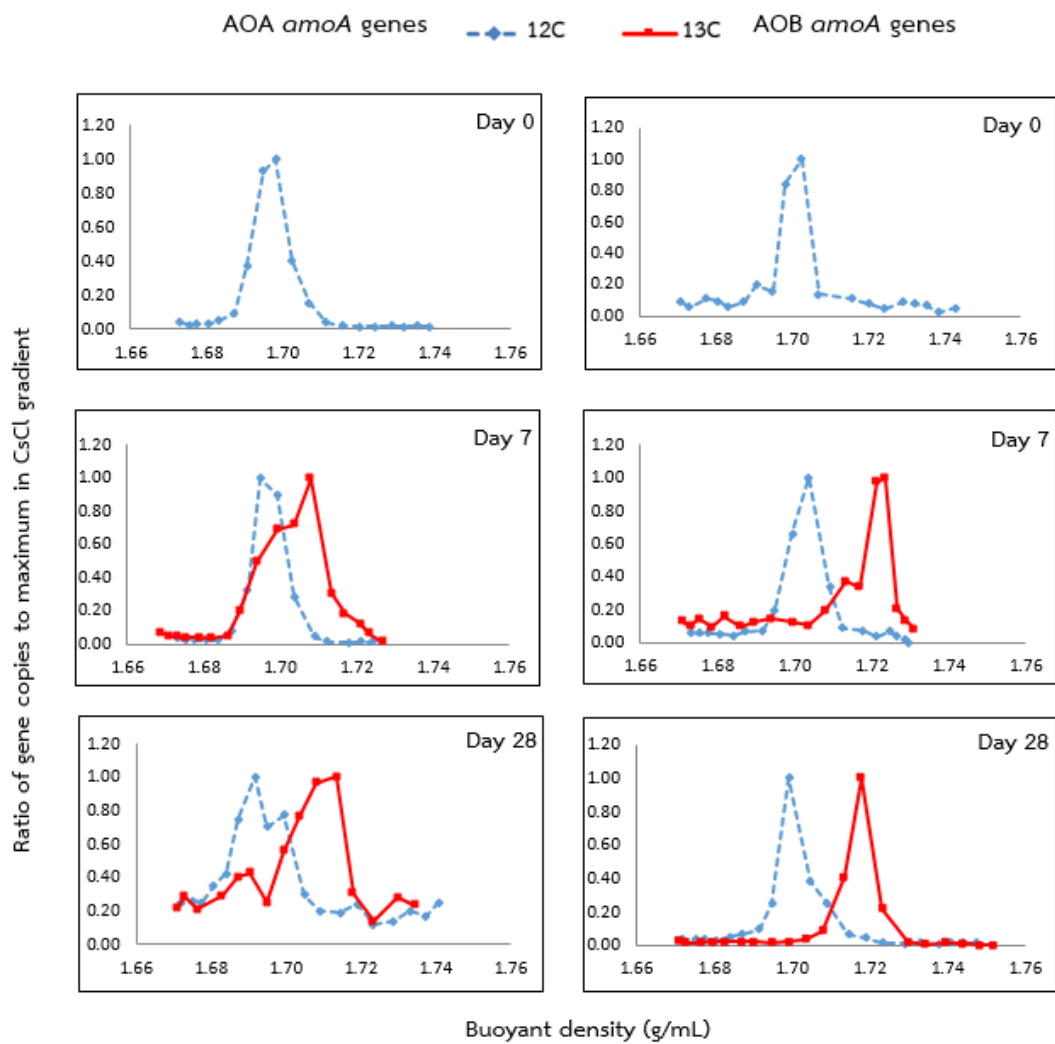


ภาพที่ 2-5 การเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวของดีเอ็นเอสำหรับ ยีน *amoA* ของ AOA (แถวซ้าย) และ ยีน *amoA* ของ AOB (แถวขวา) ของตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP2 ความเข้มข้นแอมโมเนีย $0 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$

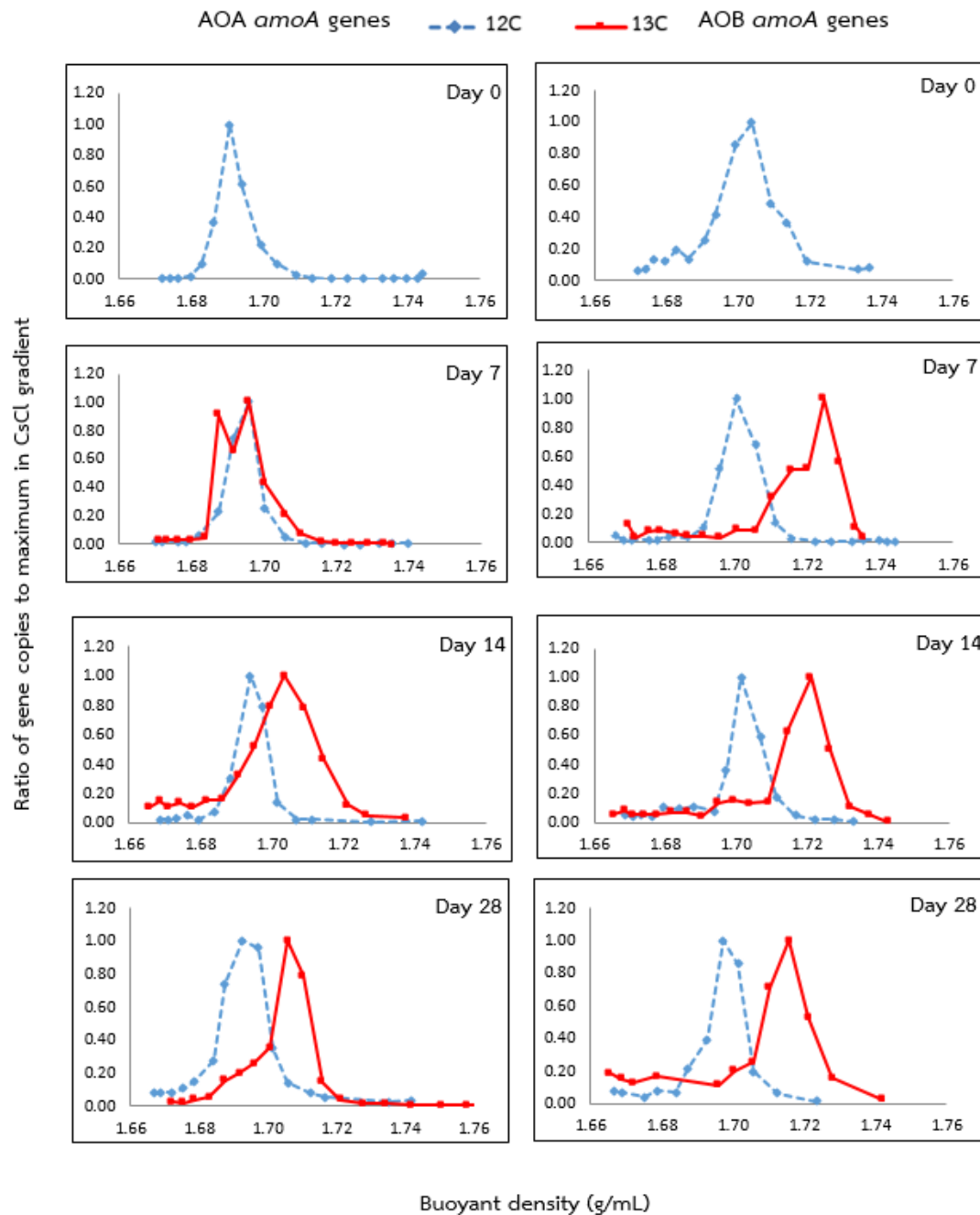
5. การระบุการออกซิไดซ์แอมโมเนียแบบอโตโทรปของ AOA และ AOB ในระบบบำบัด WWTP4

ภาพที่ 2-6 และ ภาพที่ 2-7 แสดงผลการทำ DNA-SIP จากตัวอย่างตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP4 ในรอบที่ 1 และ 2 โดยใช้ตะกอนที่เก็บจากช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 1 เดือน เพื่อเป็นการทำซ้ำสำหรับยืนยันผลการทดลอง ผลการทดลองพบว่าในรอบที่ 1 (ภาพที่ 2-6) เมื่อการบ่มผ่านไป 7 วัน มีการเคลื่อนที่ของกราฟ ^{13}C ของยีน *amoA* ของ AOA และ AOB สำหรับการบ่มซ้ำรอบที่ 2 (ภาพที่ 2-7) ได้ผลในลักษณะเดียวกัน โดยมีการเคลื่อนที่ของกราฟ ^{13}C ของยีน *amoA* ของ AOA ช้ากว่าในรอบที่ 1 โดยพบการเคลื่อนของกราฟในวันที่ 14 สำหรับยีน *amoA* ของ AOB พบการเคลื่อนของกราฟตั้งแต่วันที่ 7 เมื่อทำการบ่มตะกอนโดยไม่เติมแอมโมเนียให้แก่น้ำเข้า แต่มีไบคาร์บอเนตตามเดิม พบว่าเมื่อบ่มตะกอนไป 14 วัน (ภาพที่ 2-8) ไม่มีการเคลื่อนที่ของกราฟ ^{13}C ของยีน *amoA* ของ AOA และ AOB

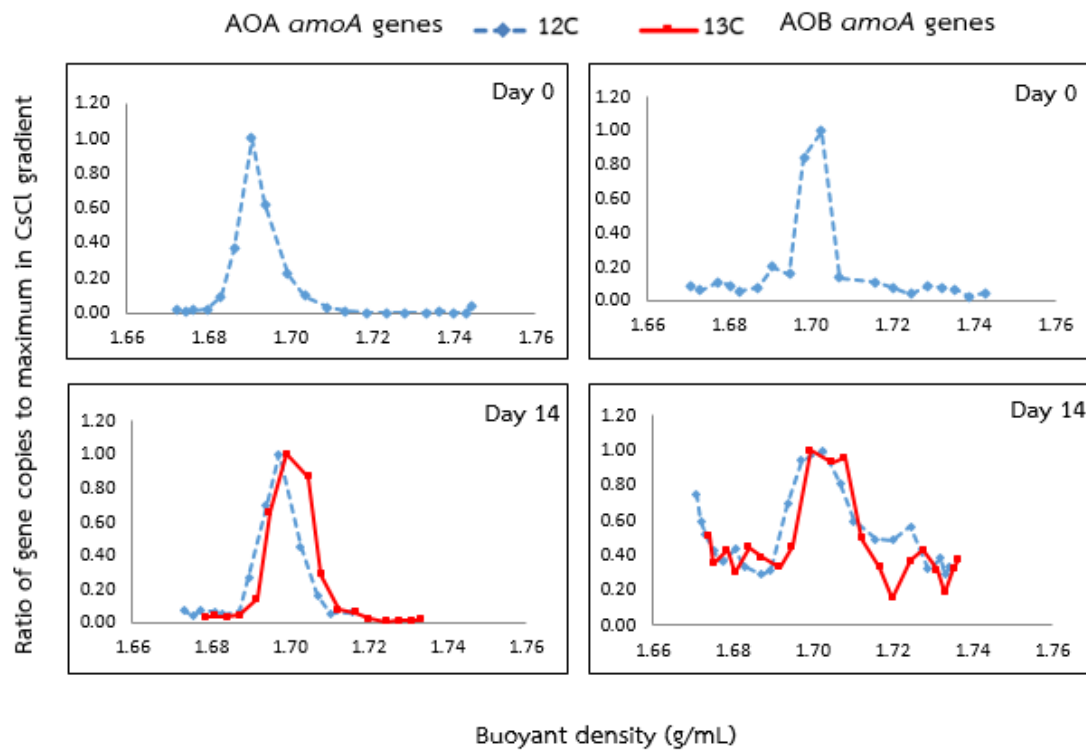
ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าทั้ง AOA และ AOB สามารถใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนมาใช้ในการสร้างเซลล์และส่วนประกอบต่างๆของเซลล์เช่น ดีเอ็นเอ ได้ เมื่อมีการใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงาน โดยจะไม่มีการใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนเมื่อไม่มีแอมโมเนีย แสดงให้เห็นว่า ทั้ง AOA และ AOB มีส่วนร่วมในการออกซิไดซ์แอมโมเนียโดยตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP4



ภาพที่ 2-6 การเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวของดีเอ็นเอสำหรับ ยีน *amoA* ของ AOA (แถวซ้าย) และ ยีน *amoA* ของ AOB (แถวขวา) ของตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP4 ความเข้มข้นแอมโมเนีย $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$ รอบที่ 1



ภาพที่ 2-7 การเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวของดีเอ็นเอสำหรับ ยีน *amoA* ของ AOA (แถวซ้าย) และ ยีน *amoA* ของ AOB (แถวขวา) ของตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP4 ความเข้มข้นแอมโมเนีย $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$ รอบที่ 2

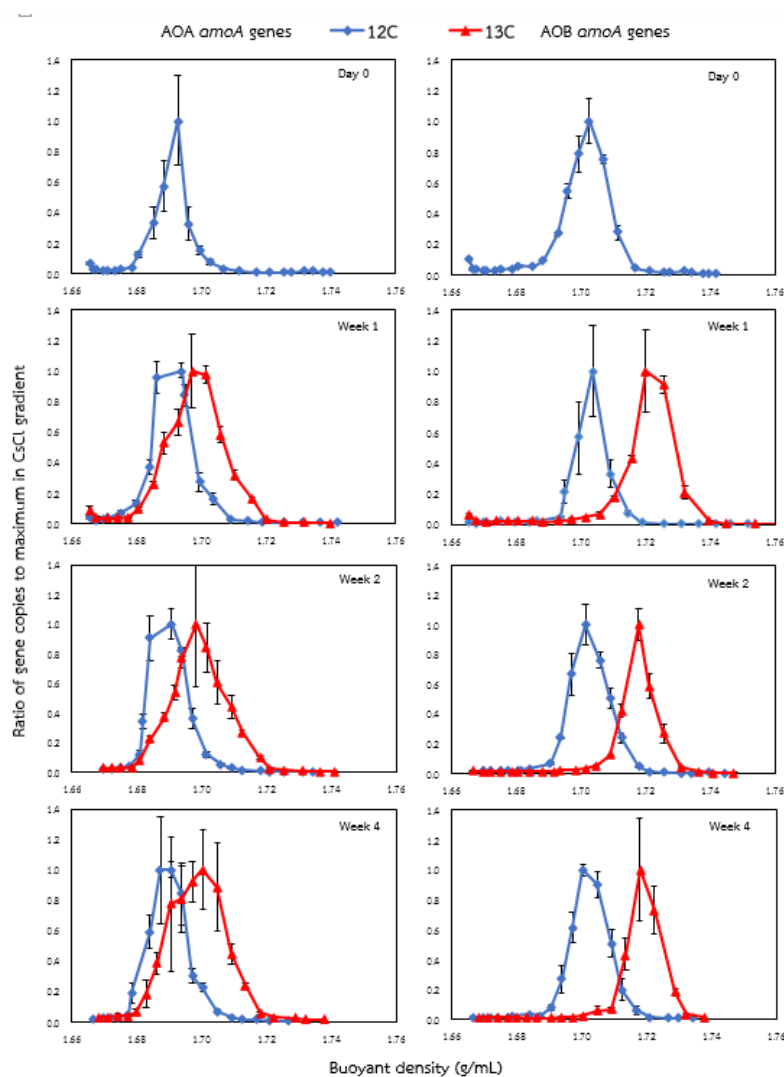


ภาพที่ 2-8 การเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวของดีเอ็นเอสำหรับ ยีน *amoA* ของ AOA (แถวซ้าย) และ ยีน *amoA* ของ AOB (แถวขวา) ของตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP4 ความเข้มข้นแอมโมเนีย 0 mgNH₄⁺-N/L รอบที่

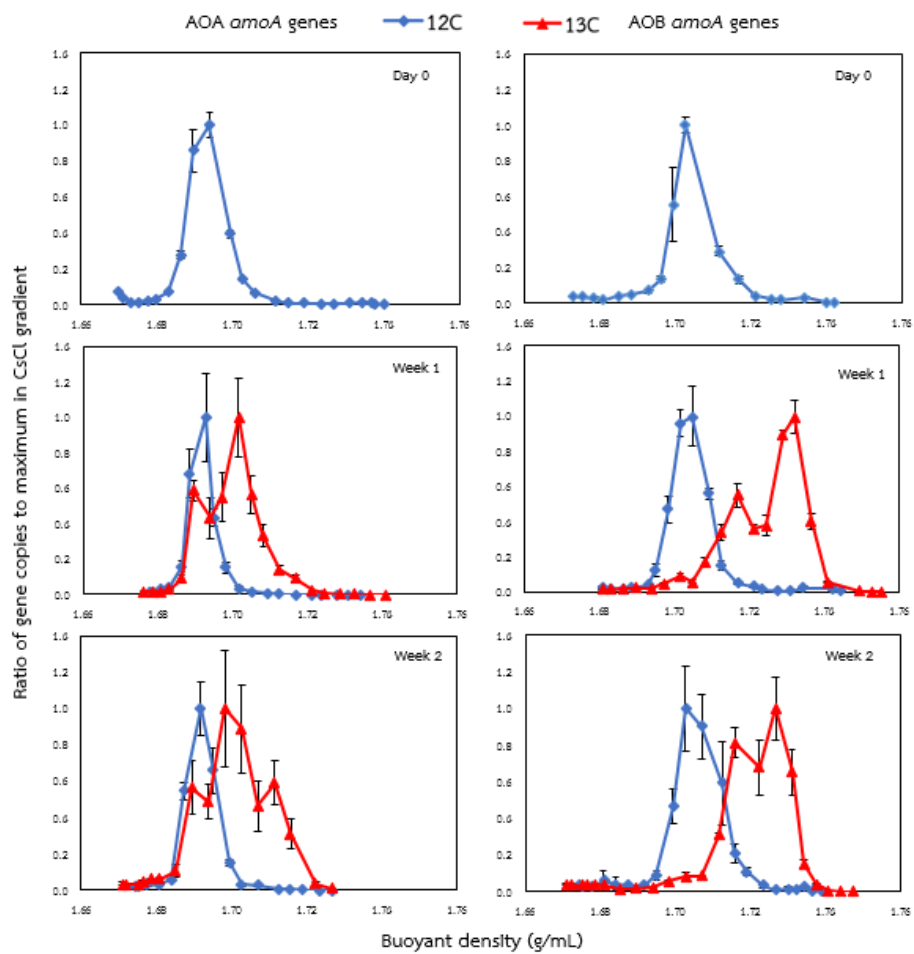
6. การระบุการออกซิไดซ์แอมโมเนียแบบอโตโทรปของ AOA และ AOB ในระบบบำบัด WWTP6

ภาพที่ 2-9 และ ภาพที่ 2-10 แสดงผลการทำ DNA-SIP จากตัวอย่างตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP6 ในรอบที่ 1 และ 2 เพื่อเป็นการทำซ้ำสำหรับยืนยันผลการทดลอง ผลการทดลองพบว่าในรอบที่ 1 (ภาพที่ 2-9) เมื่อการบ่มผ่านไป 1 สัปดาห์ มีการเคลื่อนที่ของกราฟ ^{13}C ของทั้งยีน *amoA* ของ AOA และ AOB สำหรับการบ่มซ้ำรอบที่ 2 (ภาพที่ 2-10) ได้ผลในลักษณะเดียวกัน เมื่อทำการบ่มตะกอนโดยไม่เติมแอมโมเนียให้แก่น้ำเข้า แต่มีไบคาร์บอเนตตามเดิม พบว่าเมื่อบ่มตะกอนไป 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 2-11) ไม่มีการเคลื่อนที่ของกราฟ ^{13}C ของทั้งยีน *amoA* ของ AOA และ AOB

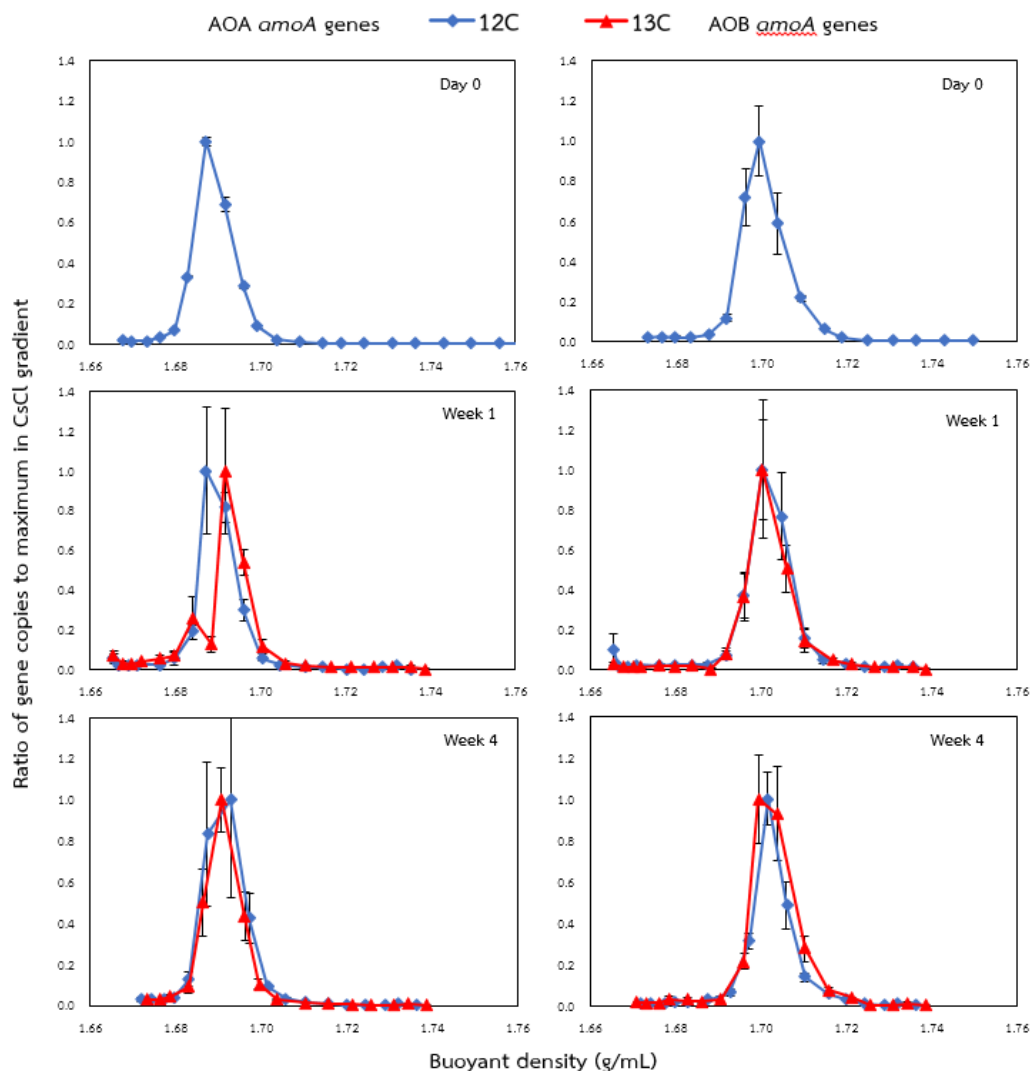
ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าทั้ง AOA และ AOB สามารถใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนมาใช้ในการสร้างเซลล์และส่วนประกอบต่างๆของเซลล์เช่น ดีเอ็นเอ ได้ เมื่อมีการใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงาน โดยจะไม่มีการใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนเมื่อไม่มีแอมโมเนีย แสดงให้เห็นว่า ทั้ง AOA และ AOB มีส่วนร่วมในการออกซิไดซ์แอมโมเนียโดยตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP6



ภาพที่ 2-9 การเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวของดีเอ็นเอสำหรับ ยีน *amoA* ของ AOA (แถวซ้าย) และ ยีน *amoA* ของ AOB (แถวขวา) ของตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP6 ความเข้มข้นแอมโมเนีย $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$ รอบที่ 1



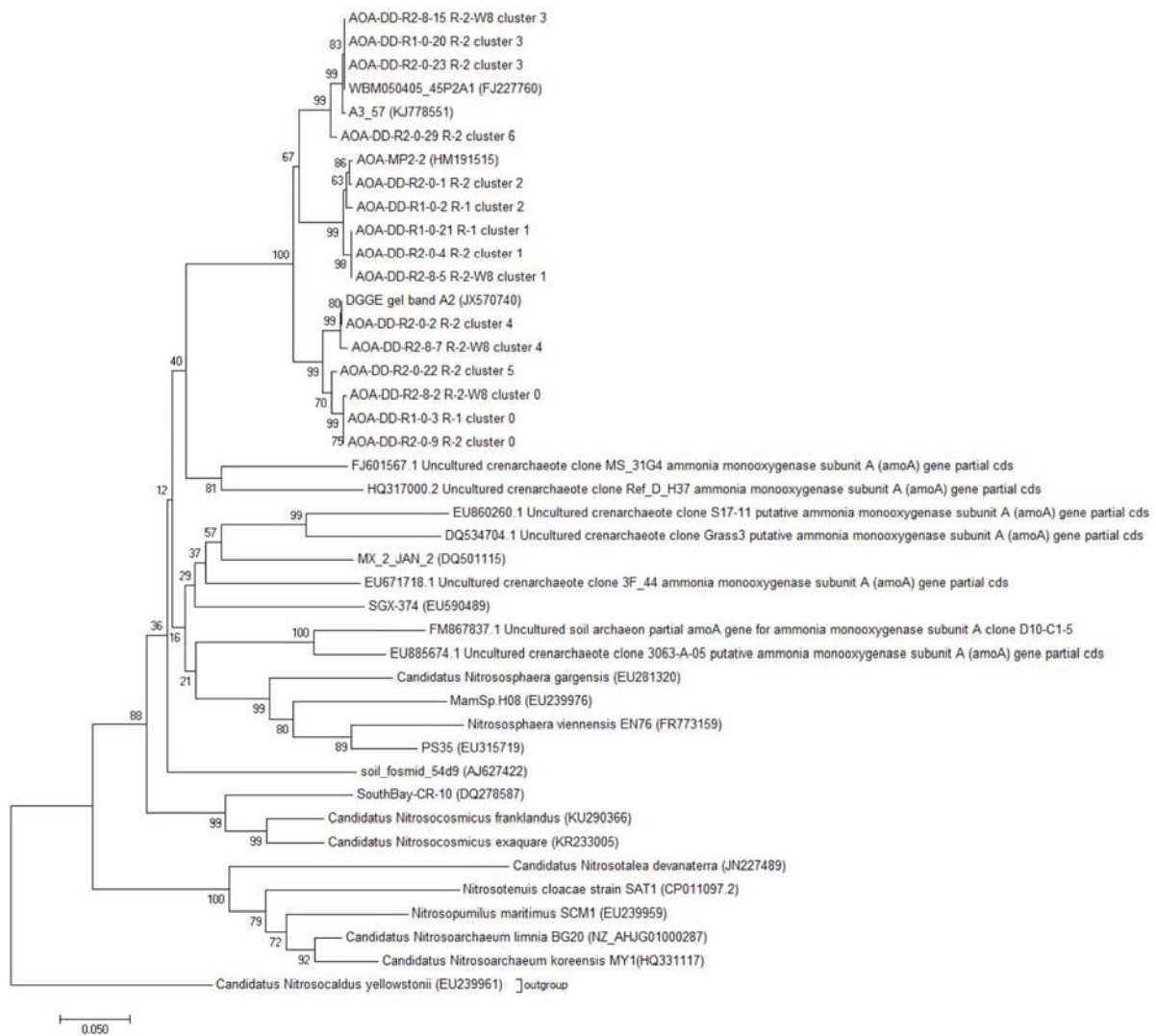
ภาพที่ 2-10 การเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวของดีเอ็นเอสำหรับ ยีน *amoA* ของ AOA (แถวซ้าย) และ ยีน *amoA* ของ AOB (แถวขวา) ของตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP6 ความเข้มข้นแอมโมเนีย $7 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N/L}$ รอบที่ 2



ภาพที่ 2-11 การเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวของดีเอ็นเอสำหรับ ยีน *amoA* ของ AOA (แถวซ้าย) และ ยีน *amoA* ของ AOB (แถวขวา) ของตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP6 ความเข้มข้นแอมโมเนีย 0 mgNH₄⁺-N/L

7. การวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของยีน *amoA* ของ AOA ในระบบบำบัด WWTP6

ในการทดลองนี้ได้เลือกตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP6 มาวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของยีน *amoA* ของ AOA จากตัวอย่างที่เก็บในรอบที่ 1 และ 2 ของระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP6 ผลการทดลองพบว่า AOA ที่พบ อยู่ใน subcluster ภายใน group 1.1b Thaumarcheota (ภาพที่ 2-12) แสดงให้เห็นว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากร AOA ในตัวอย่างที่เก็บทั้ง 2 รอบ งานตีพิมพ์ในอดีตพบ AOA subcluster นี้ในระบบบำบัดน้ำเสียอื่น (Limpiyakorn และคณะ 2011) อย่างไรก็ตามยังไม่พบ AOA ที่ทำการเพาะเลี้ยงได้ใน subcluster นี้ AOA ที่ทำการเพาะเลี้ยงได้จากระบบบำบัดน้ำเสียจะจัดอยู่ใน subcluster อื่นโดยมี *Candidatus Nitrosotenuis cloacae* ซึ่งมาจากระบบบำบัดน้ำเสียในจีน จัดอยู่ใน group 1.1a Thaumarcheota (Li และคณะ 2016) และ *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare* ที่เพาะเลี้ยงได้จากระบบบำบัดน้ำเสียในแคนาดาจัดอยู่ในกลุ่ม *Nitrososphaera* sister cluster ใน group 1.1b Thaumarcheota (Sauder และคณะ 2017) สำหรับ AOA ใน group 1.1b Thaumarcheota ที่มีทั้งหมด จะเพาะเลี้ยงมาจากตัวอย่างที่ไม่ได้มาจากระบบบำบัดน้ำเสีย ยกตัวอย่างเช่น *Candidatus Nitrososphaera gargensis* จากน้ำพุร้อน (Hatzenpichler และคณะ 2008), *Candidatus Nitrososphaera viennensis* จากดิน (Tournu และคณะ 2011) โดย AOA ที่พบใน WWTP6 ถูกจัดอยู่ในกิ่งของต้นไม้วิวัฒนาการที่แตกต่างจาก AOA ที่เป็นตัวแทนของ group 1.1b Thaumarcheota ซึ่งหมายความว่า AOA ที่พบใน WWTP6 น่าจะมีลักษณะสมบัติต่างจาก AOA ที่เป็นตัวแทนของ group 1.1b Thaumarcheota



ภาพที่ 2-12 ต้นไม้วิวัฒนาการ คำนวณจากยีน *amoA* ของ AOA จากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP6 โดยรหัสพันธุกรรมที่ได้จากการทดลองนี้จะมีชื่อขึ้นต้นด้วย AOA-DD

8. การพัฒนาไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน *amoA* ของ AOA ที่พบในระบบบำบัด WWTP6

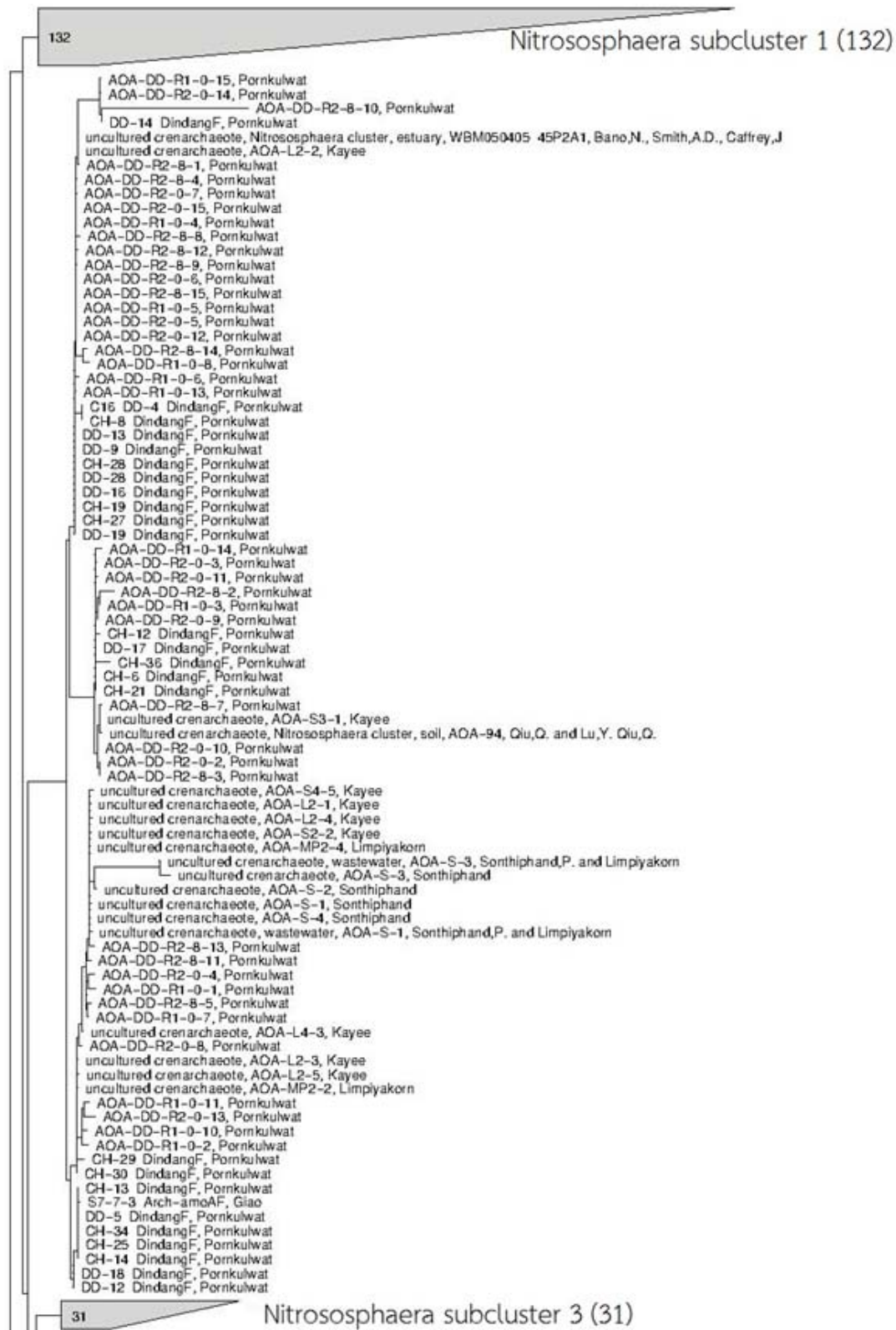
ผลการวิเคราะห์หัตถพันธุกรรมของยีน *amoA* ของ AOA ในระบบบำบัด WWTP6 พบว่า AOA ทั้งหมดจัดรวมกันอยู่ใน subcluster เดียวกัน ซึ่งอยู่ภายใน group 1.1b Thaumarcheota การทดลองในส่วนนี้จึงทำการออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับ AOA ใน subcluster นี้ เพื่อยืนยันว่า AOA ใน subcluster นี้มีการเจริญเติบโตแบบออโตโทรฟขณะที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียจริง ทั้งนี้เนื่องจากไพรเมอร์ Arch-*amoA*F และ Arch-*amoA*R และไพรเมอร์ CamoA-19f และ CamoA-616r ที่ใช้ในการทดลองก่อนหน้านี้ครอบคลุม AOA ทั้งหมด ทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่าผลจาก DNA-SIP มาจาก AOA กลุ่มนี้หรือไม่

การออกแบบไพรเมอร์ใช้โปรแกรม ARB (Department of Microbiology, Technische Universität München [<http://www.arb-home.de>]) และฐานข้อมูลยีน *amoA* ของ AOA จาก Pester และคณะ (2012) ซึ่งไพรเมอร์ที่ได้ประกอบด้วยลำดับเบส ดังนี้

Forward primer- 5' TACTGGGCKACCAGAAGA 3'

Reverse primer- 5' TAACGCAACGGGACTGTT 3'

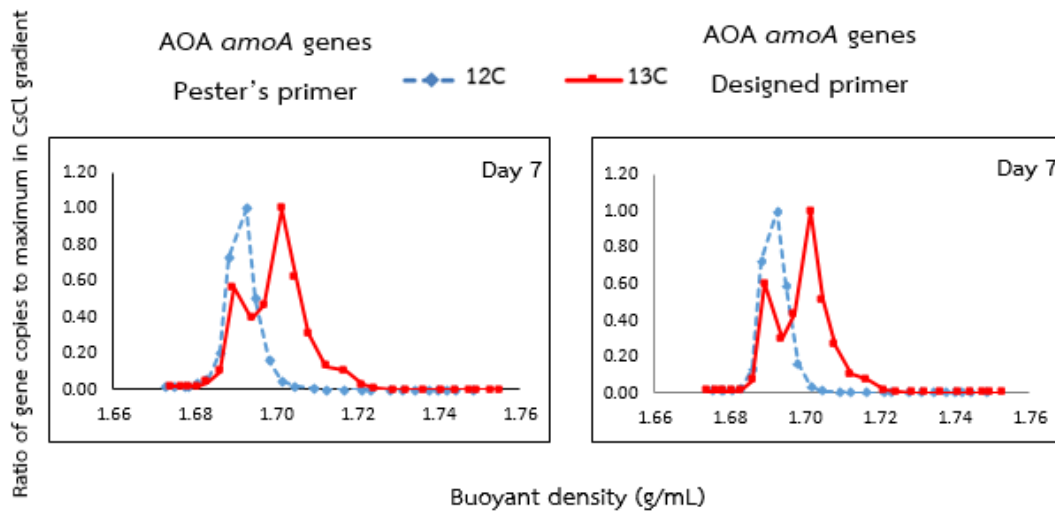
จากนั้นได้ทำการตรวจสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่โดย การทำ PCR-sequencing กับตัวอย่างตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP4 และ WWTP6 โดยทำโคลนนิ่งและเลือกโคลนประมาณ 20 โคลนสำหรับแต่ละตัวอย่างไปถอดรหัสพันธุกรรม จากนั้นนำรหัสพันธุกรรมไปใส่ในต้นไม้วิวัฒนาการที่ทำไว้ก่อนหน้านี้กับยีน *amoA* ของ AOA ด้วยฐานข้อมูลของ Pester และคณะ (2012) ซึ่งบรรจุรหัสพันธุกรรมของตัวอย่าง WWTP6 ที่ได้จากไพรเมอร์ CamoA-19f และ CamoA-616r (ภาพที่ 2-13) ผลการทดลองพบว่ารหัสพันธุกรรมที่ได้จากไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ทั้งหมด ตกอยู่ใน subcluster เดียวกันภายใน group 1.1b Thaumarcheota ดังที่พบด้วยไพรเมอร์ CamoA-19f และ CamoA-616r โดยไม่มีรหัสพันธุกรรมใดอยู่นอก subcluster นี้เลย แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่มีความเฉพาะเจาะจงกับ AOA ใน subcluster นี้เท่านั้น



ภาพที่ 2-13 ต้นไม้วิวัฒนาการคำนวณจากยีน *amoA* ของ AOA จากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP4 และ WWTP6 ที่ได้จากไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ และไพรเมอร์ CamoA-19f และ CamoA-616r โดยคำนวณร่วมกับฐานข้อมูลของ Pester และคณะ

(2012)

จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ไปใช้กับตัวอย่าง DNA-SIP ที่ทำกับระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP6 ความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgNH₄⁺-N/L รอบที่ 2 ที่ระยะเวลาการบ่ม 7 วัน (ภาพที่ 2-10) โดยผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 2-14 ซึ่งพบว่ากราฟที่ได้จากไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ มีลักษณะการกระจายตัวเช่นเดียวกับกราฟที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ที่ CamoA-19f และ CamoA-616r ซึ่งเป็นการยืนยันว่า AOA ใน subgroup นี้มีการเจริญเติบโตแบบอโตโทรฟขณะที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียจริง



ภาพที่ 2-14 การเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวของดีเอ็นเอสำหรับ ยีน *amoA* ของ AOA ที่ตรวจวัดด้วยไพรเมอร์ CamoA-19f และ CamoA-616r (ภาพซ้าย) และไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ (ภาพขวา) ของตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP6 ความเข้มข้นแอมโมเนีย 7 mgNH₄⁺-N/L รอบที่ 2

9. งานวิจัยอื่นที่ศึกษาการออกซิไดซ์แอมโมเนียแบบอโตโทรฟของจุลินทรีย์กลุ่ม AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสีย

งานวิจัยในอดีตพบว่า AOA ที่อยู่ในกลุ่มอื่นๆ นอกเหนือจากที่พบในระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP6 สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียโดยใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาด้วยเทคนิค DNA-SIP พบว่า *Candidatus Nitrosotenuis cloacae* ซึ่งอยู่ใน group 1.1a Thaumarcheota สามารถเจริญเติบโตแบบอโตโทรฟได้ (Li และคณะ 2016) ผลการศึกษาด้วยเทคนิค CARD-FISH-MAR พบว่า *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare* ซึ่งอยู่ใน group 1.1b Thaumarcheota ก็สามารถนำ ¹⁴C-HCO₃⁻ เข้าสู่เซลล์ขณะที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียได้ (Sauder และคณะ 2017) อย่างไรก็ตาม Mußmann และคณะ (2011) พบว่า AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียโรงกลั่นไม่ได้ใช้ ¹⁴C-HCO₃⁻ จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH-MAR โดยจะเห็นได้ว่างานวิจัยที่เกี่ยวกับกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสียมีอยู่อย่างจำกัด และได้ผลที่ได้มีความขัดแย้งกัน ซึ่งผลการทดลองที่ 2 กับระบบบำบัดน้ำเสีย 3 ระบบ พบว่า AOA ในระบบบำบัด 2 ระบบจาก 3 ระบบ มีส่วนร่วมในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย ซึ่งเป็นการช่วยเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียมากยิ่งขึ้น

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลองที่ 3

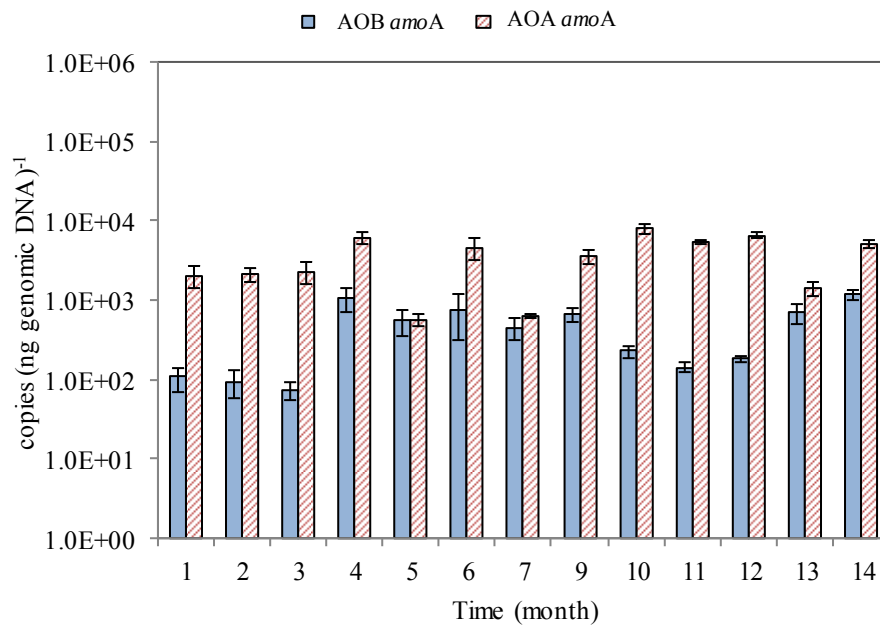
การศึกษาสารยับยั้งการทำงานของเฉพาะกลุ่มสำหรับการตรวจวัดกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA และ AOB

การทดลองนี้เป็นการศึกษาสารยับยั้งการทำงานของเฉพาะกลุ่ม เพื่อใช้สำหรับการตรวจวัดกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA และ AOB ในระบบเชื้อผสม (Mixed culture systems) ได้แก่ ตัวอย่างจากระบบสิ่งแวดล้อมต่างๆ และตัวอย่างจากระบบทางวิศวกรรม สารยับยั้งการทำงานของเฉพาะกลุ่มที่ทำการศึกษาคือ ATU และ PTIO โดย ATU มีเป้าหมายยับยั้งเอนไซม์ AMO ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย โดยจะทำหน้าที่ยับยั้ง Copper chelating ที่เอนไซม์ AMO (Shen และคณะ 2013) และ PTIO เป็นสารที่เป็น NO scavenger โดย NO เป็นผลิตภัณฑ์ระหว่างกลางของการออกซิไดซ์แอมโมเนียไปเป็นไนโตรของ AOA (Walker และคณะ 2010) การศึกษาทำกับตะกอนจากถังปฏิกรณ์ NRI และ NRII เนื่องจากตะกอนจากทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์ มีสัดส่วนประชากร AOA และ AOB แตกต่างกันอย่างชัดเจน และที่ผ่านมาได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารอินทรีย์ในการเลี้ยงระบบมาเป็นเวลานาน ทำให้มีจุลินทรีย์กลุ่มเฮโทโทรฟในระบบไม่มากเมื่อเทียบกับตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียจริง ทำให้ช่วยลดผลกระทบของจุลินทรีย์กลุ่มเฮโทโทรฟต่อการศึกษาศาสาณียับยั้งการทำงานของเฉพาะกลุ่มได้

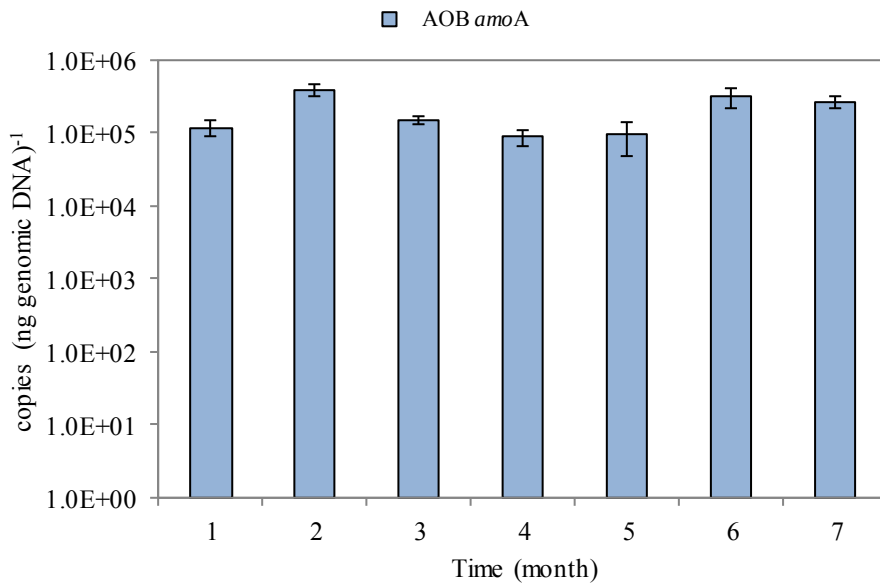
1. จำนวนและกลุ่มประชากร AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์ NRI และ NRII

ตลอดระยะเวลาของการทดลอง ความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำออกของถังปฏิกรณ์ NRI อยู่ที่ $0.07 \pm 0.03 \text{ mgN l}^{-1}$ ความเข้มข้นไนโตรอยู่ที่ $< \text{LOD}$ (0.1 mgN l^{-1}) ความเข้มข้นไนโตรอยู่ที่ $26.17 \pm 4.44 \text{ mgN l}^{-1}$ ซึ่งสอดคล้องกับความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำเข้า ผลการตรวจวัดจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ทุกๆเดือนด้วยเทคนิค qPCR พบว่าจำนวนยีน *amoA* ของ AOA อยู่ที่ $5.53 \times 10^2 \pm 9.34 \times 10^1$ ถึง $7.88 \times 10^3 \pm 1.17 \times 10^3 \text{ copies ng genomic DNA}^{-1}$ โดยจำนวนยีน *amoA* ของ AOB อยู่ที่ $7.38 \times 10^1 \pm 1.79 \times 10^1$ ถึง $1.16 \times 10^3 \pm 1.39 \times 10^2 \text{ copies ng genomic DNA}^{-1}$ (ภาพที่ 3-1a) จำนวนยีน *amoA* ของ AOA มากกว่า จำนวนยีน *amoA* ของ AOB โดยเฉลี่ย 16 เท่าตลอดการทดลอง การวิเคราะห์ต้นไม้วิวัฒนาการ จากตัวอย่างที่เก็บในเดือนที่ 1 และ 6 ของการทดลองแสดงในรูปที่ ภาพที่ 3-2 และ ภาพที่ 3-3 ผลการศึกษาพบว่า AOA ที่พบในถังปฏิกรณ์ NRI ทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่ม *Nitrososphaera* sister cluster ซึ่งเป็นสมาชิกใน Group 1.1b Thaumarchaeota (ภาพที่ 3-2) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากร AOA ในทั้งสองช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง ส่วน AOB ที่พบจัดอยู่ในกลุ่ม *Nitrosomonas europaea* cluster *Nitrosomonas communis* cluster และ *Nitrosomonas oligotropha* cluster (ภาพที่ 3-3) โดย AOB ส่วนใหญ่ที่พบในเดือนที่ 1 จัดอยู่ในกลุ่ม *Nitrosomonas oligotropha* cluster และ *Nitromonas europaea* cluster ในเดือนที่ 6 ผล Scanning electron micrograph แสดงในรูปที่ ภาพที่ 3-4 โดยพบเซลล์บางเซลล์มีรูปร่างแบบทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ $0.8 \mu\text{m}$ เกาะกันเป็นกลุ่ม นอกจากนี้ยังพบเซลล์แบบแท่งซึ่งมีความยาวหลากหลายขนาด

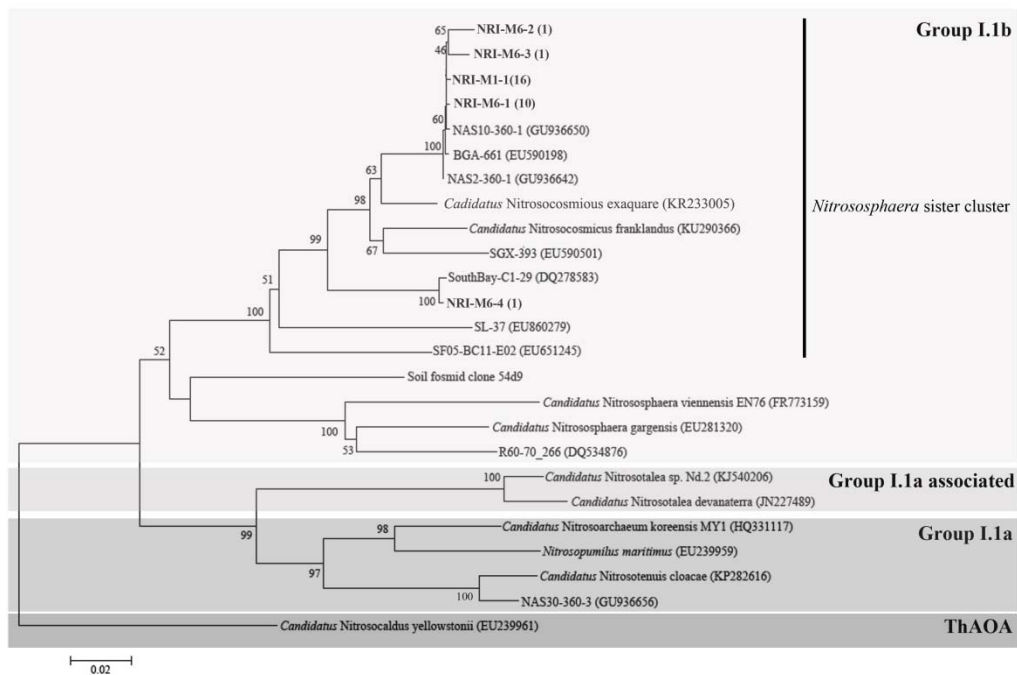
(a)



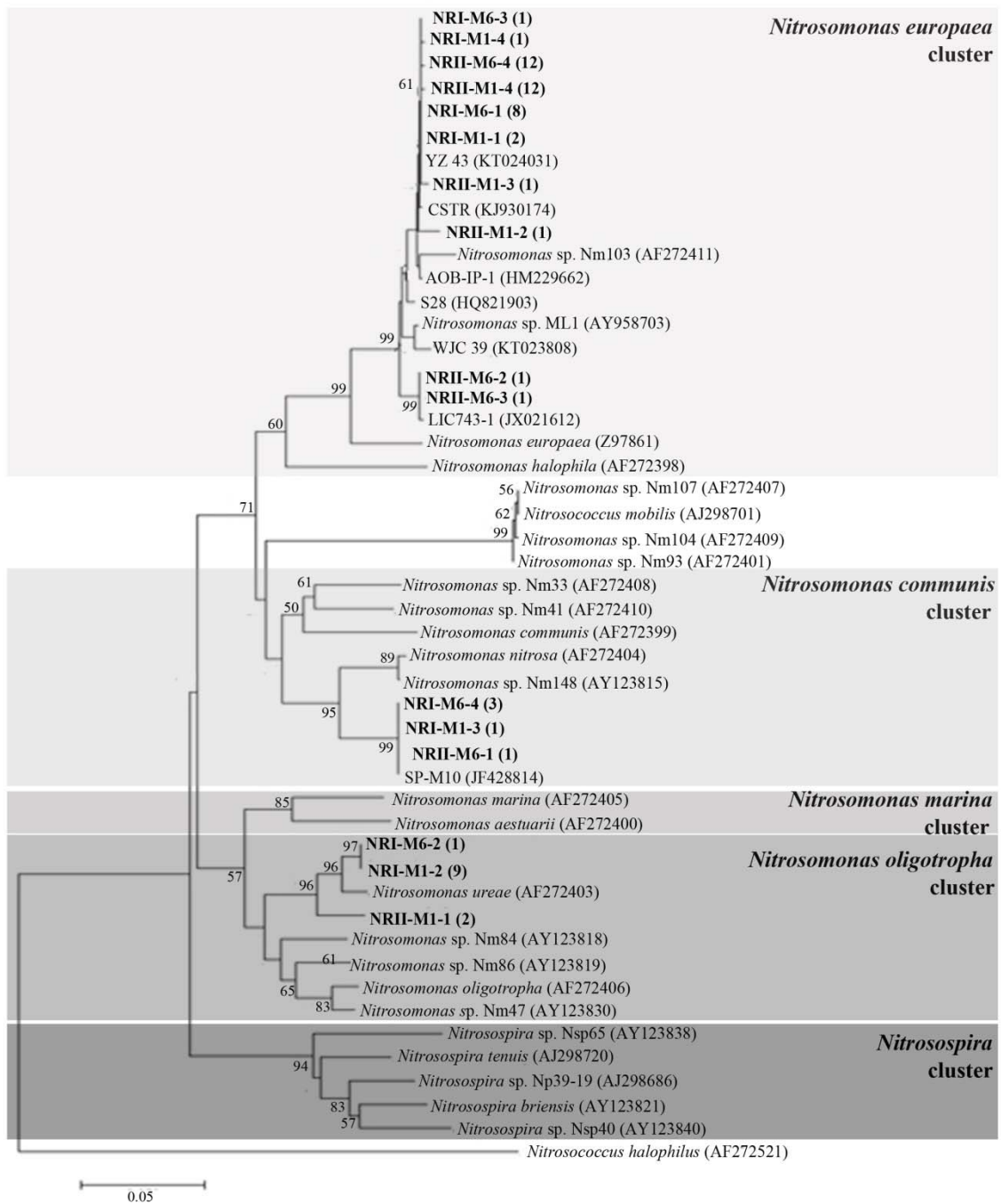
(b)



ภาพที่ 3-1 จำนวนยีน *amoA* ของ AOA and AOB ใน a) NRI and b) NRII

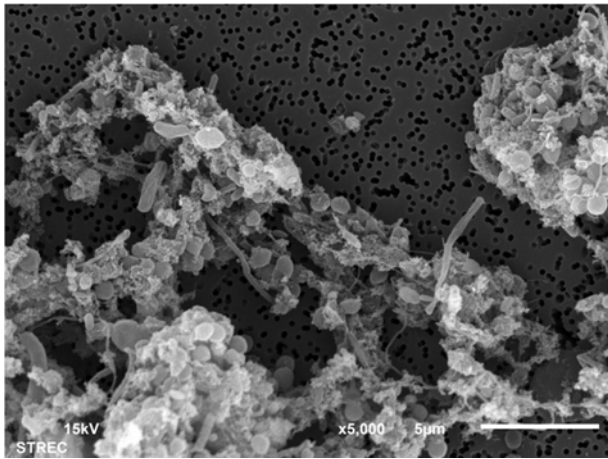


ภาพที่ 3-2 ต้นไม้วิวัฒนาการ คำนวณจากยีน *amoA* ของ AOA

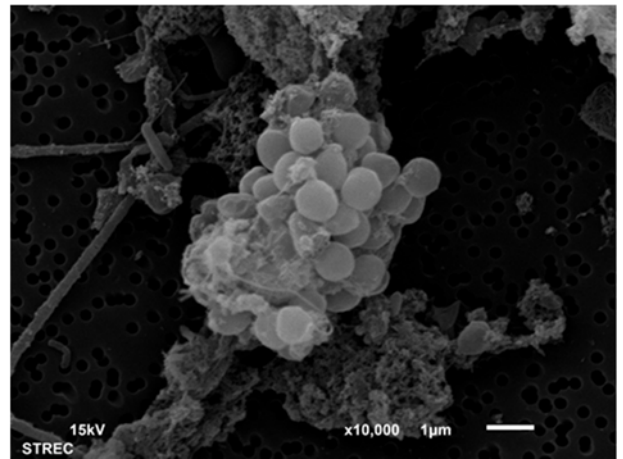


ภาพที่ 3-3 ต้นไม้วิวัฒนาการ คำนวณจากยีน *amoA* ของ AOB

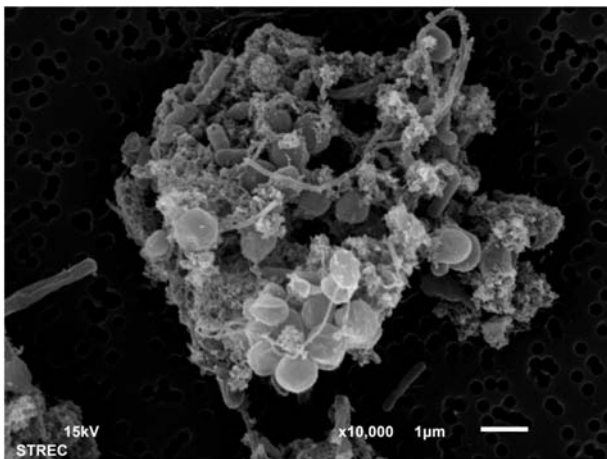
(a)



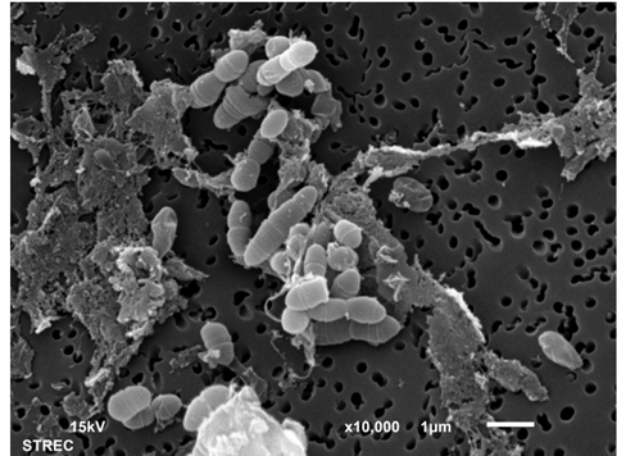
(b)



(c)

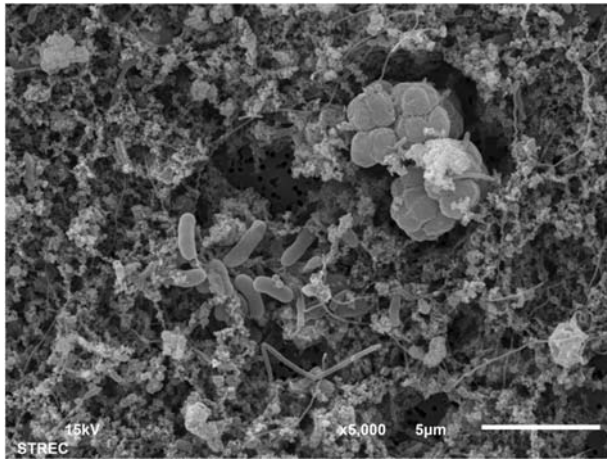


(d)

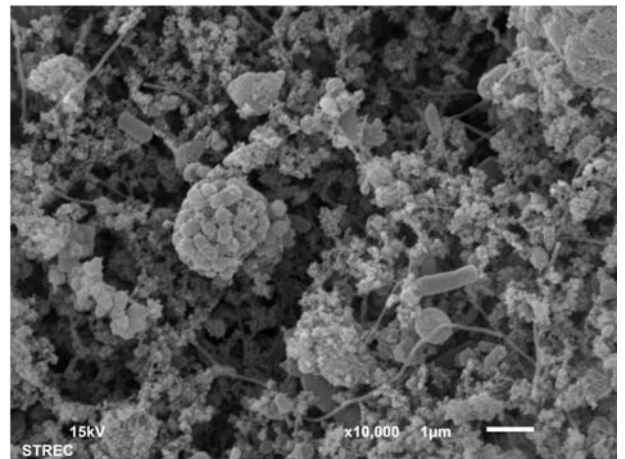


ภาพที่ 3-4 Scanning electron micrograph ของ NRI (a) scale bar 5 µM. (b-e) scale bar 1 µM

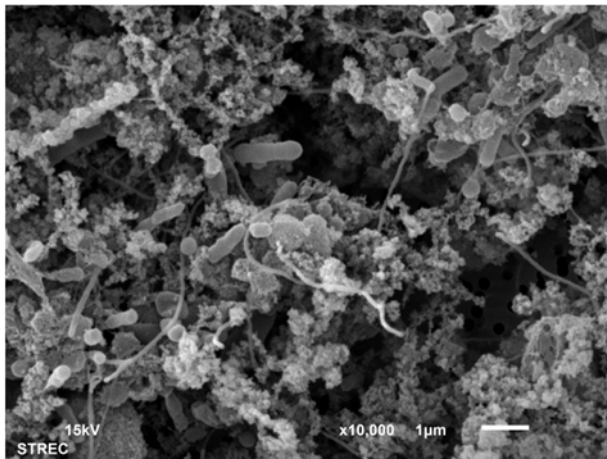
(a)



(b)



(c)



ภาพที่ 3-5 Scanning electron micrograph ของ NR11 (a) scale bar 5 μm. (b-e) scale bar 1 μm

สำหรับถึง NRII ความเข้มข้นแอมโมเนียในถังอยู่ที่ $14.19 \pm 9.54 \text{ mgN l}^{-1}$ ความเข้มข้นไนโตรอยู่ที่ $6.24 \pm 6.79 \text{ mgN l}^{-1}$ และไนเตรอยู่ที่ $370.12 \pm 26.19 \text{ mgN l}^{-1}$ โดยผลรวมความเข้มข้นแอมโมเนีย ไนโตร และไนเตรทในน้ำออกใกล้เคียงกับในน้ำเข้า จำนวนยีน *amoA* ของ AOA ต่ำกว่า LOD ที่ประมาณ $4.29 \text{ copies ng genomic DNA}^{-1}$ ตลอดการทดลอง (ภาพที่ 3-1b) จำนวนยีน *amoA* ของ AOB อยู่ที่ $8.76 \times 10^4 \pm 2.08 \times 10^4$ ถึง $3.85 \times 10^5 \pm 6.56 \times 10^4 \text{ copies ng genomic DNA}^{-1}$ AOB ที่พบอยู่ในกลุ่ม *Nitrosomonas europaea* cluster *Nitrosomonas communis* cluster และ *Nitrosomonas oligotropha* cluster (ภาพที่ 3-3) โดยมี *Nitrosomonas europaea* cluster เป็นกลุ่มเด่นทั้งสองช่วงเวลา SEM แสดงเซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะแท่งซึ่งมีความยาวหลากหลายขนาด

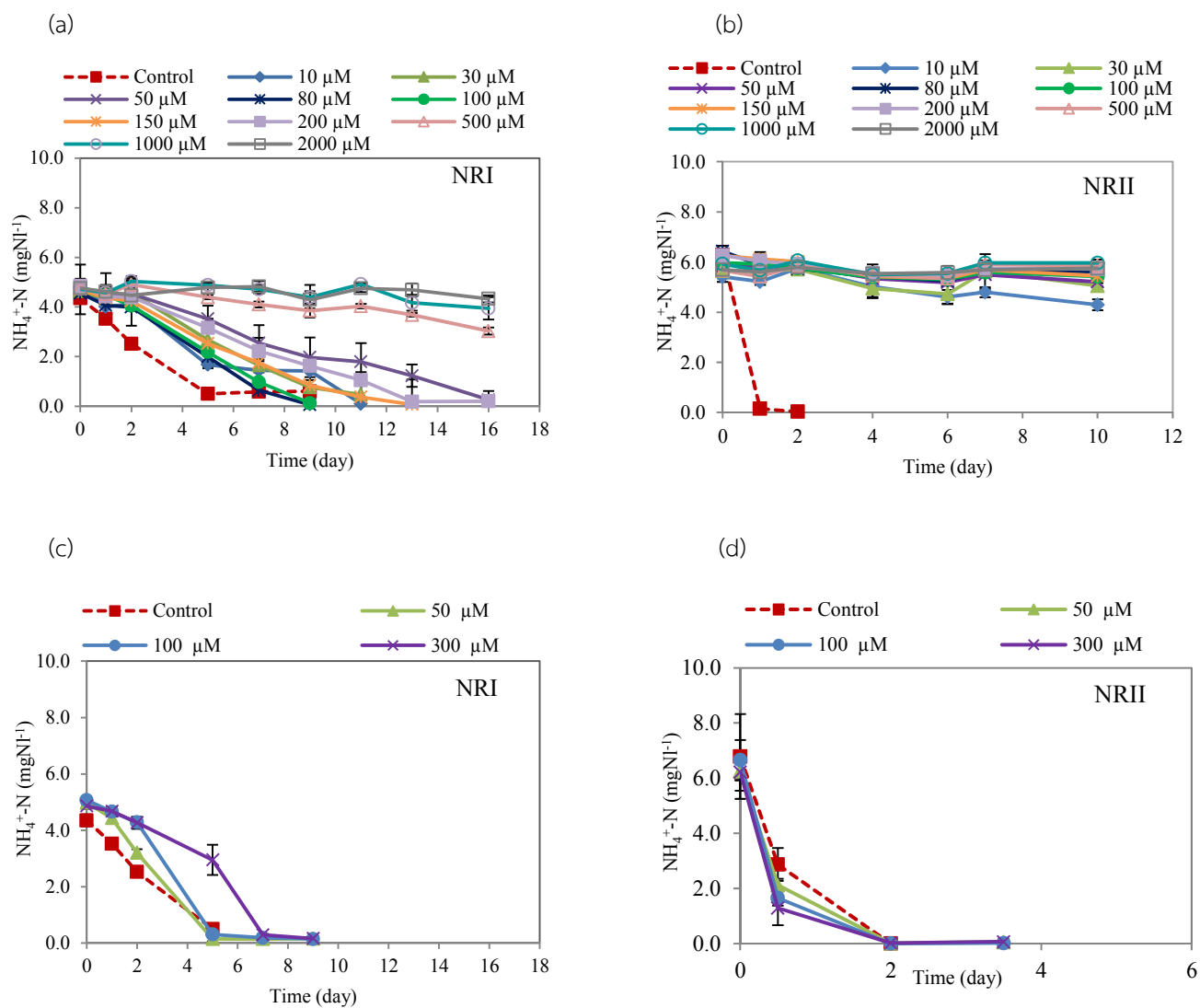
ถึงปฏิกรณ์ NRI และ NRII ใช้ตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียและเดินระบบด้วยสภาวะที่ต่างกัน โดยถึงปฏิกรณ์ NRI ใช้ตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนที่พบทั้ง AOA และ AOB อยู่ร่วมกัน นอกจากนี้ยังเดินระบบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบอนินทรีย์ ที่มีธาตุอาหารและวิตามินหลากหลายชนิด ซึ่งใช้ในการเพาะเลี้ยง AOA ในอดีต (Konneke และคณะ 2005; Tourna และคณะ 2011) นอกจากนี้ถึงปฏิกรณ์ NRI ยังเดินระบบเพื่อให้ความเข้มข้นแอมโมเนียอยู่ในระดับต่ำ โดยงานวิจัยในอดีตใช้ความเข้มข้นแอมโมเนียเริ่มต้นที่ $\leq 7 \text{ mgN/L}$ ในการเพาะเลี้ยง AOA (Konneke และคณะ 2005; Lehtovira-Morley และคณะ 2016; Sauder และคณะ 2017) สภาวะต่างๆที่กล่าวมาในข้างต้นน่าจะเป็นสาเหตุที่สนับสนุนการเจริญเติบโตของ AOA ในถึงปฏิกรณ์ NRI ในทางกลับกัน ถึงปฏิกรณ์ NRII ใช้ตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียที่พบแต่ AOB โดยไม่พบ AOA อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีธาตุอาหารจำกัด และเดินระบบให้มีแอมโมเนียในถังมีความเข้มข้นสูง ซึ่งน่าจะเป็นการสนับสนุนการเจริญเติบโตของ AOB ในระบบ

ผลการวิเคราะห์ต้นไม้วิวัฒนาการพบว่ายีน *amoA* ของ AOA ที่พบในถึงปฏิกรณ์ NRI อยู่ในกลุ่ม *Nitrososphaera* sister cluster ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Group 1.1b *Thaumacheota* จนถึงปัจจุบัน *Candidatus Nitrosocosmicus franklandus* และ *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare* ถือเป็น AOA ที่เป็นตัวแทนของกลุ่ม *Nitrososphaera* sister cluster โดย *Candidatus Nitrosocosmicus franklandus* ได้มาจากตัวอย่างดินในสก็อตแลนด์ (Laura และคณะ 2016) ส่วน *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare* ได้มาจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบจานหมุนชีวภาพ (Rotating biological contactors) ในแคนาดา (Sauder และคณะ 2017) สำหรับยีน *amoA* ที่ได้จาก ถึงปฏิกรณ์ NRI มีความเหมือน 90-95% กับ *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare* และ 89-91% กับ *Candidatus Nitrosocosmicus franklandus* ผลจาก Scanning electron micrograph แสดงให้เห็นเซลล์บางเซลล์ในถึงปฏิกรณ์ NRI เป็นทรงกลม เส้นผ่านศูนย์กลางโดยประมาณ $0.8 \mu\text{m}$ เกาะกันอยู่เป็นกลุ่ม โดยเคยมีการพบเซลล์และการเกาะกลุ่มในลักษณะเดียวกันนี้กับ *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare* ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางโดยประมาณอยู่ที่ $1.3 \mu\text{m}$ (Sauder และคณะ 2017) อย่างไรก็ตามผลจาก Scanning electron microscope ไม่สามารถระบุได้ว่าเซลล์ทรงกลมที่พบนี้ จะเกี่ยวข้องกับ AOA เนื่องจากไม่สามารถใช้ Scanning electron microscope ในการระบุชนิดของจุลินทรีย์ในระบบเซลล์ผสม (Mixed culture system) ได้

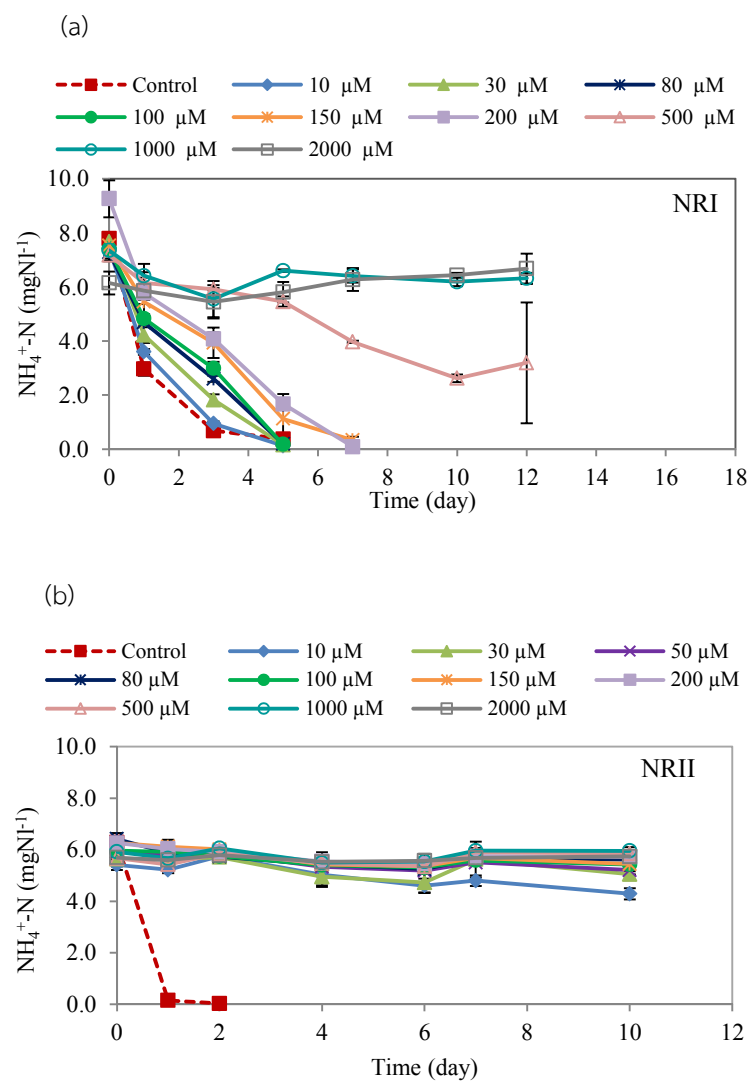
ยีน *amoA* ของ AOB ที่พบในถังปฏิกรณ์ NRI และ NRII อยู่ในกลุ่ม *Nitrosomonas europaea* cluster *Nitrosomonas communis* cluster และ *Nitrosomonas oligotropha* cluster ในอดีต AOB ทั้ง 3 กลุ่มนี้เคยพบในระบบบำบัดน้ำเสียและถังปฏิกรณ์ไนตริไฟอิง (Sonthiphand และคณะ 2011, Limpiyakorn และคณะ 2011)

2. กิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียภายใต้สภาวะที่มี ATU และ PTIO

การทดลองกับ ATU ได้ทำทดลองกับตะกอนจากถังปฏิกรณ์ NRI และ NRII ใน 2 ช่วงเวลา โดยเก็บตัวอย่างในเดือนที่ 2 และ 12 สำหรับถังปฏิกรณ์ NRI (ภาพที่ 3-6a และ ภาพที่ 3-7a ตามลำดับ) และในเดือนที่ 2 และ 6 สำหรับถังปฏิกรณ์ NRII (ภาพที่ 3-6b และ ภาพที่ 3-7b ตามลำดับ) สำหรับถังปฏิกรณ์ NRII ซึ่งพบเฉพาะ AOB อย่างเดียว ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้น ATU ตั้งแต่ 10 μM ขึ้นไป สามารถยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ NRII ลงได้โดยสมบูรณ์ ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ NRI ซึ่งพบทั้ง AOA และ AOB ต้องใช้ ATU ที่ความเข้มข้นเกิน 500 μM ขึ้นไปในการยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียที่โดยสมบูรณ์ โดย ATU ที่ความเข้มข้น 10-200 μM ยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ได้บางส่วน งานวิจัยในอดีตของ Martens-Habbena และคณะ (2015) พบว่ากิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนีย ของ *Nitrosomonas europaea* *Nitrosomonas oligotropha* *Nitrosomonas ureae* *Nitrosomonas cryotolerans* และ *Nitrospira multiformis* ถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น ATU >3.3 μM ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองกับตะกอนจากถังปฏิกรณ์ NRII ที่พบเฉพาะ AOB อย่างเดียว ช่วงความเข้มข้นของ ATU ที่สามารถยับยั้ง AOB โดยสมบูรณ์ดังที่กล่าวมานี้ มีผลเพียงเล็กน้อยต่อ AOA กล่าวคือ ATU ที่ความเข้มข้น <100 μM ไม่ยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ *Candidatus Nitrosotenuis cloacae* และ *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare* ซึ่งมาจากระบบบำบัดน้ำเสีย (Li และคณะ 2016 and Sauder และคณะ 2017) โดยหากต้องการยับยั้ง AOA โดยสมบูรณ์ ต้องใช้ความเข้มข้น ATU สูงกว่านี้ ยกตัวอย่างเช่น *Nitrosopumilus maritimus* strain HCA1 และ *Candidatus Nitrosotenuis cloacae* สามารถถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น ATU 700 และ 1000 μM ตามลำดับ (Martens-Habbena และคณะ 2015; Li และคณะ 2016) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของตะกอนจากถังปฏิกรณ์ NRI ที่พบทั้ง AOA และ AOB อยู่ร่วมกันในถัง ซึ่งต้องใช้ ATU เกิน 500 μM ในการยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียโดยสมบูรณ์ และผลการทดลองส่วนนี้ยังระบุได้อีกว่า การใช้ ATU ที่ความเข้มข้นระหว่าง 10-200 μM น่าจะสามารถตรวจวัดการทำงานของ AOA ที่อยู่ในระบบได้ เนื่องจาก AOB ที่อยู่ในระบบจะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้น ATU ในช่วงนี้แล้ว ดังผลที่ได้จากถังปฏิกรณ์ NRII



ภาพที่ 3-6 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นแอมโมเนียภายใต้ (a) ATU สำหรับถึงปฏิกรณ์ NRI ที่เก็บตะกอนในเดือนที่ 2 (b) ATU สำหรับถึงปฏิกรณ์ NRII ที่เก็บตะกอนในเดือนที่ 2 (c) PTIO สำหรับถึงปฏิกรณ์ NRI เก็บตะกอนในเดือนที่ 2 และ (d) PTIO สำหรับถึงปฏิกรณ์ NRII เก็บตะกอนในเดือนที่ 3



ภาพที่ 3-7 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นแอมโมเนียภายใต้ ATU (a) สำหรับถังปฏิกรณ์ NRI ที่เก็บตะกอนในเดือนที่ 12 และ (b) สำหรับถังปฏิกรณ์ NR II ที่เก็บตะกอนในเดือนที่ 6

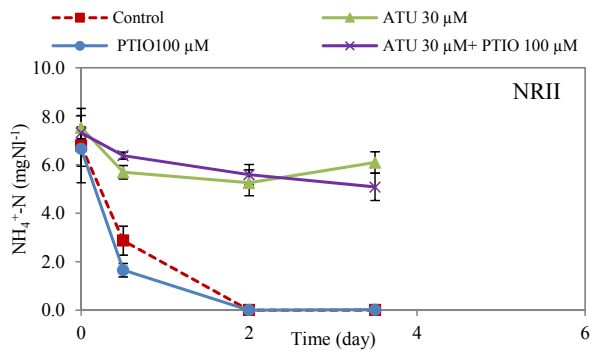
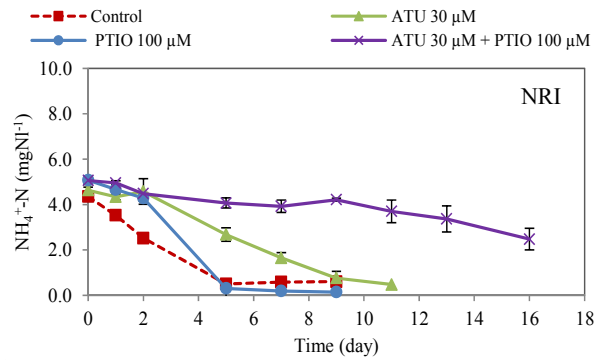
การทดลองกับ PTIO ได้ใช้ PTIO ที่ความเข้มข้น 50 100 และ 300 μM กับตะกอนจากถังปฏิกรณ์ NRI และ NRII ที่เก็บในเดือนที่ 2 และ 3 ตามลำดับ (ภาพที่ 3-6c และ d) ผลการทดลองพบว่า PTIO ทั้ง 3 ความเข้มข้นที่ใช้ไม่สามารถยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ NRII ที่พบเฉพาะ AOB เพียงอย่างเดียวได้ สำหรับถังปฏิกรณ์ NRI ที่พบทั้ง AOA และ AOB ไม่พบการยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนีย ที่ความเข้มข้น PTIO 50 และ 100 μM โดยมีการยับยั้งบางส่วนที่ความเข้มข้น PTIO 300 μM ผลการทดลองในอดีตพบว่า PTIO ไม่มีผลต่อการยับยั้ง AOB โดย Martens-Habben และคณะ (2015) พบว่ากิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ *Nitrosomonas europaea* *Nitrosomonas oligotropha* *Nitrosomonas ureae* *Nitrosomonas cryotolerans* และ *Nitrospira multiformis* ไม่ถูกยับยั้งที่ PTIO 100 μM ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของถังปฏิกรณ์ NRII ในทางกลับกัน PTIO มีผลต่อการยับยั้ง AOA เป็นอย่างมาก *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare* สามารถถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ที่ PTIO ที่ความเข้มข้น 100 μM (Seuder และคณะ 2017) และ PTIO ความเข้มข้น 100 μM ยับยั้ง *Nitrosopumilus maritimus* strain HCA1 และ stain SCM1 ได้โดยสมบูรณ์ (Martens-Habben และคณะ 2015)

เนื่องจากถังปฏิกรณ์ NRI พบทั้ง AOA และ AOB อยู่ร่วมกัน การเติม PTIO เพียงอย่างเดียวจะไม่สามารถยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์นี้ได้โดยสมบูรณ์ จึงได้ทำการทดลองเติม PTIO ที่ความเข้มข้น 100 μM ควบคู่กับ ATU ที่ความเข้มข้น 30 80 150 และ 2000 μM โดยได้ทำการทดลองกับตะกอนจากถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ถัง โดยใช้ตะกอนที่เก็บในเดือนที่ 2 และ 3 สำหรับถังปฏิกรณ์ NRI และ NRII ตามลำดับ (ภาพที่ 3-8) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียเกิดขึ้นโดยสมบูรณ์ เมื่อเติม PTIO ที่ความเข้มข้น 100 μM ควบคู่กับ ATU ทุกๆ ความเข้มข้นที่ทำการศึกษา ซึ่งหมายความว่า PTIO ที่ความเข้มข้น 100 μM สามารถยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA ในถังปฏิกรณ์ NRI ได้โดยสมบูรณ์ เนื่องจาก ATU ที่ความเข้มข้น ≥ 10 μM เพียงพอต่อการยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOB ในระบบแล้ว

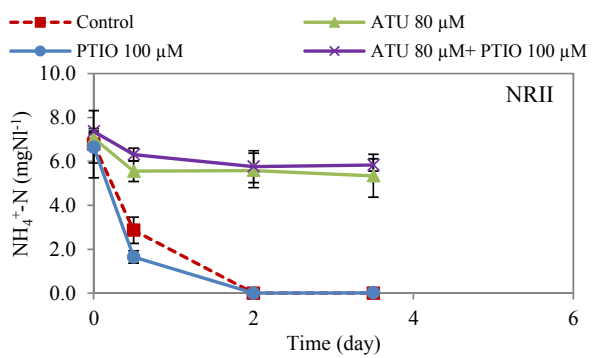
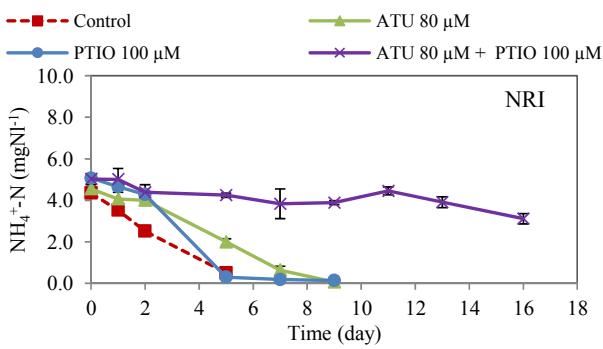
3. การมีส่วนร่วมของ AOA และ AOB ในกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ NRI และ NRII

ผลการทดลองที่ 3 แสดงให้เห็นว่าในถังปฏิกรณ์ NRI ทั้ง AOA และ AOB มีส่วนร่วมในกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของถังปฏิกรณ์ ดังจะเห็นได้จากเมื่อเติม ATU ความเข้มข้น 30, 80, 150 μM กิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียยังคงเหลืออยู่ แต่เมื่อเติม PTIO ความเข้มข้น 100 μM ร่วมกับ ATU ความเข้มข้น 30, 80, 150 μM กิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียทั้งหมดหมดถูกยับยั้งลง ส่วนถังปฏิกรณ์ NRII AOB เป็นผู้ทำกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ ดังจะเห็นได้จากเมื่อเติม ATU ที่ความเข้มข้น ≥ 10 μM กิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียทั้งหมดถูกยับยั้งลง

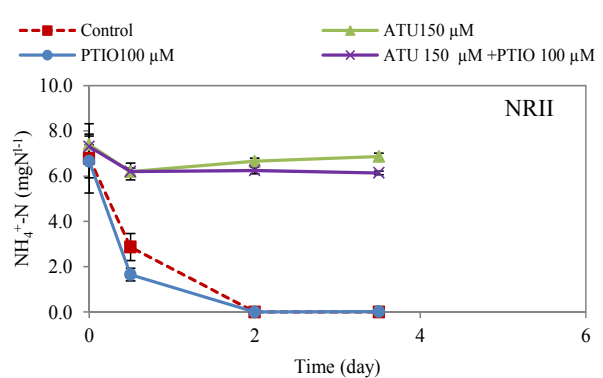
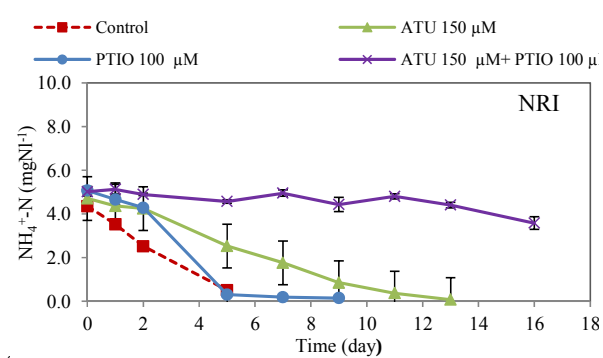
(a) ATU 30 μM + PTIO 100 μM



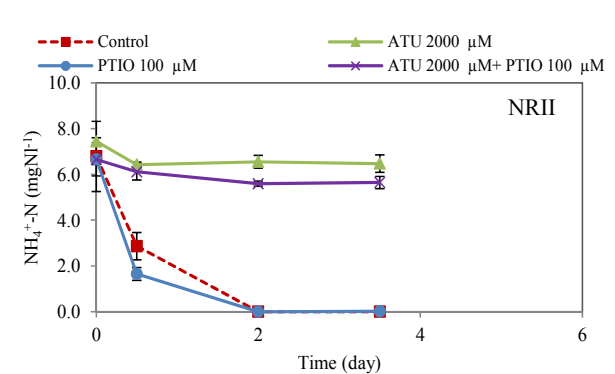
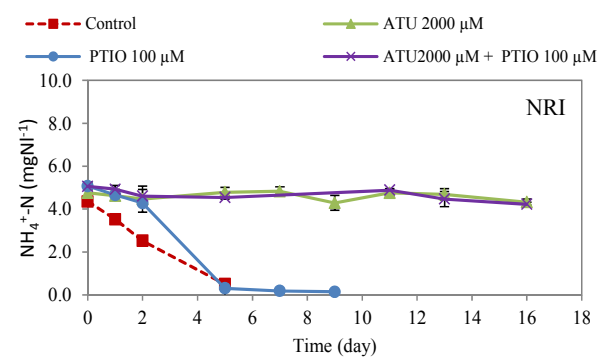
(b) ATU 80 μM + PTIO 100 μM



(c) ATU 150 μM + PTIO 100 μM



(d) ATU 2000 μM + PTIO 100 μM



ภาพที่ 3-8 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นแอมโมเนียภายใต้ ATU และ PTIO ที่ความเข้มข้น ATU ต่างๆ สำหรับถังปฏิกรณ์ NRI และ NRII ที่เก็บตัวอย่างในเดือนที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลองที่ 4

การระบุกิจกรรมของ AOA และ AOB ด้วยเทคนิค DNA-SIP พร้อมด้วยสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่ม

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนในการสร้างเซลล์ AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์ NRI และศึกษาผลของ ATU ต่อการสร้างเซลล์ AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์ดังกล่าว โดยใช้เทคนิค DNA-SIP ด้วยการติด ^{13}C ที่ HCO_3^- ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนระหว่างการบ่มด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงาน ความเข้มข้นของ ATU ที่ใช้ในการทดลองคือ $80\text{ }\mu\text{M}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ยืนยันจากการทดลองที่ 3 แล้วว่ายับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOB โดยสมบูรณ์ และ ATU ที่ความเข้มข้นนี้ไม่น่าจะยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA

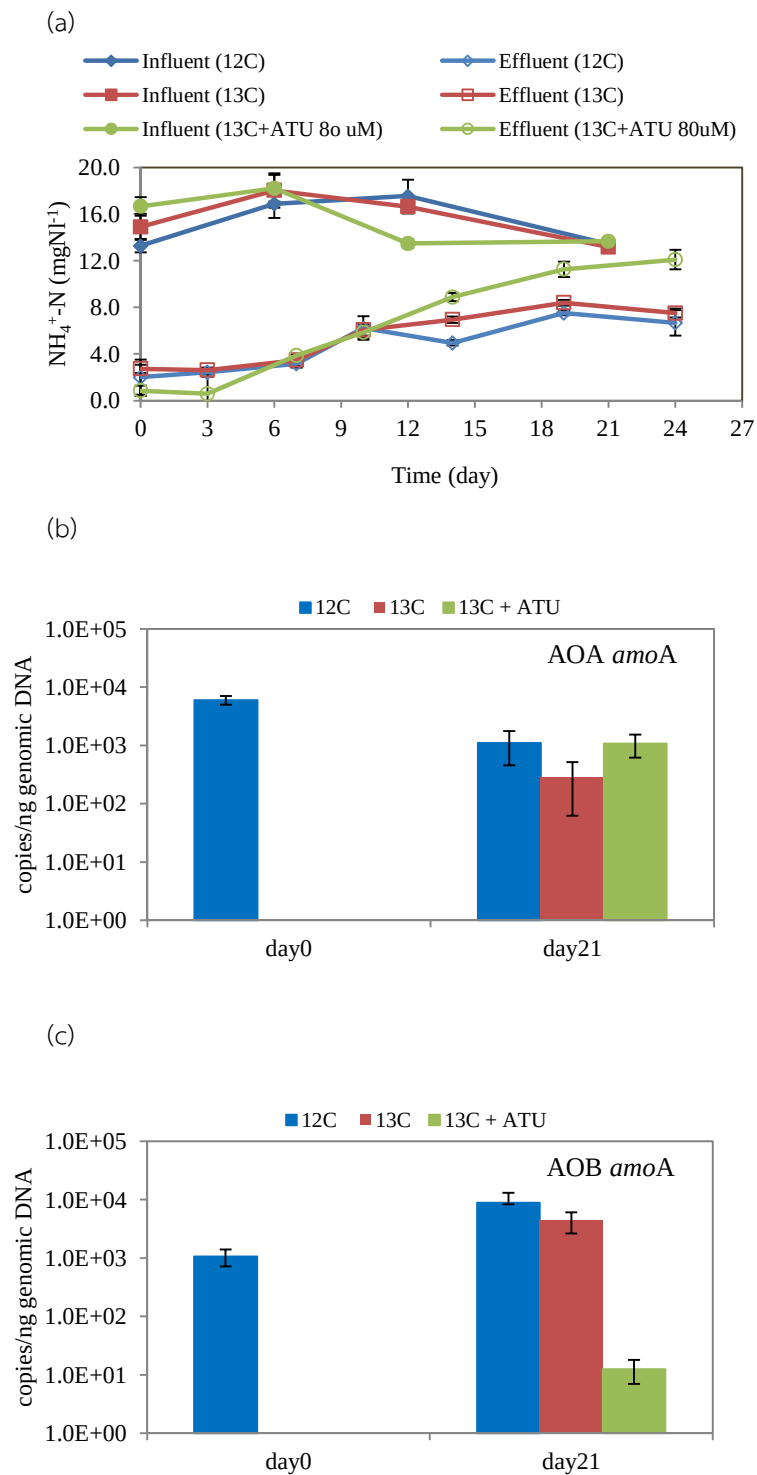
1. การใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนในการสร้างเซลล์ AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์ NRI

ทำการบ่มตะกอนจากถังปฏิกรณ์ NRI เป็นเวลา 30 วัน ความเข้มข้นแอมโมเนีย ไนโตรท และไนเตรท ในน้ำเข้าจะน้ำออกของถังบ่มแสดงดัง ภาพที่ 4-1a จำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ซึ่งตรวจวัดด้วยเทคนิค qPCR ระหว่างการบ่มแสดงดังภาพที่ 4-1b และ ภาพที่ 4-1c ตามลำดับ ในวันที่ 21 ของการบ่ม จำนวนยีน *amoA* ของ AOA มีจำนวนไม่ต่างจากเมื่อเริ่มทำการทดลองมากนัก แสดงให้เห็นว่า AOA มีการเจริญเติบโตและรักษาจำนวนเซลล์ในระบบไว้ได้ ถึงแม้ว่าระบบเป็นแบบไหลต่อเนื่องซึ่งมีการทิ้งเซลล์ออกจากระบบตลอดเวลา ผลการตรวจนับจำนวนยีน *amoA* ของ AOB เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับ AOA

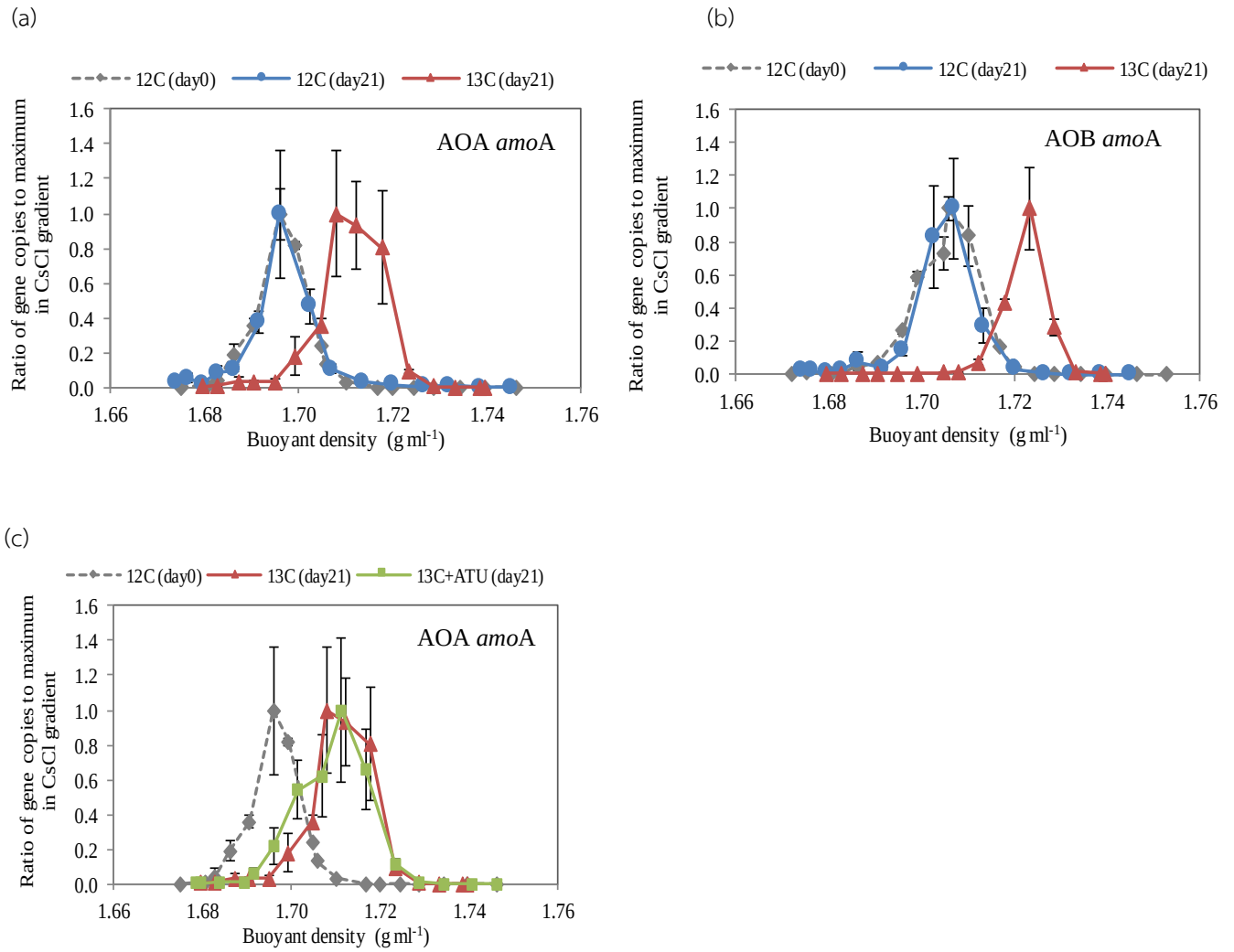
จากนั้นได้ทำการปั่นแยกดีเอ็นเอจากตัวอย่างตะกอนที่เก็บจากถังบ่มในวันเริ่มการทดลองและวันที่ 21 ของการบ่มด้วยเครื่อง Ultracentrifuge เพื่อให้เกิดการแยกดีเอ็นเอในสารละลาย CsCl แล้วทำการเก็บแฟรคชัน จากนั้นทำการตรวจวัดจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ในแต่ละแฟรคชันด้วยเทคนิค qPCR

ภาพที่ 4-2a และ ภาพที่ 4-2b แสดง DNA-SIP profiles ของจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ในแต่ละแฟรคชัน ในวันที่ 21 ของการบ่ม ยอดกราฟของยีน *amoA* ของ AOA สำหรับชุดบ่มด้วย $^{12}\text{C-HCO}_3^-$ ปรากฏที่ 1.6961 g ml^{-1} ซึ่งยอดกราฟนี้มีการเคลื่อนไปที่ 1.7114 g ml^{-1} ในชุดบ่มด้วย $^{13}\text{C-HCO}_3^-$ (ภาพที่ 4-2a) ซึ่งเป็นการเคลื่อนตัวไปในทิศทางที่มี Buyout density สูงขึ้น แสดงให้เห็นว่ายีน *amoA* ของ AOA มีน้ำหนักมากขึ้นจากการที่เซลล์นำ $^{13}\text{C-HCO}_3^-$ มาใช้ในการสร้างส่วนประกอบต่างๆของเซลล์ อาทิเช่น ดีเอ็นเอ สำหรับยีน *amoA* ของ AOB ผลที่ได้มีลักษณะเดียวกันคือ ในวันที่ 21 ของการบ่ม ยอดกราฟของยีน *amoA* ของ AOB เคลื่อนตัวจาก 1.7070 g ml^{-1} สำหรับชุดบ่มด้วย $^{12}\text{C-HCO}_3^-$ ไปที่ 1.7234 g ml^{-1} สำหรับชุดบ่มด้วย $^{13}\text{C-HCO}_3^-$ (ภาพที่ 4-2b) ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ AOB นำ $^{13}\text{C-HCO}_3^-$ มาใช้ในการสร้างส่วนประกอบของเซลล์ เช่นเดียวกัน

ผลการทดลอง DNA-SIP แสดงให้เห็นว่าเซลล์ของ AOA และ AOB มีการนำ ^{13}C ไปเป็นส่วนประกอบในการสร้างยีน *amoA* ซึ่งหมายความว่า AOA และ AOB สามารถเจริญเติบโตแบบ chemolithoautotrophy ซึ่งใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งพลังงาน (แอมโมเนีย) และแหล่งคาร์บอน (HCO_3^-) ได้ งานวิจัยในอดีตพบว่า *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare*, ซึ่งมีรหัสพันธุกรรมของยีน *amoA* ใกล้เคียงกับ AOA ที่พบในถังปฏิกรณ์ NRI ดังการทดลองที่ 3 สามารถใช้ HCO_3^- เป็นแหล่งคาร์บอนระหว่างการออกซิไดซ์แอมโมเนียเช่นเดียวกัน หากแต่ *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare* ยังสามารถใช้สารอินทรีย์อีกหลายตัวมากระตุ้นการเจริญเติบโตได้ (Sauder และคณะ 2017) DNA-SIP แสดงให้เห็นว่า *Candidatus Nitrosotenuis cloacae* ก็สามารถเจริญเติบโตแบบออโตโทรปได้เช่นเดียวกัน (Li และคณะ 2016) ผลการทดลองในส่วนนี้จึงช่วยยืนยันการมีส่วนร่วมของ AOA และ AOB ในกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ NRI และ NRII จากการทดลองที่ 3 ได้เป็นอย่างดี



ภาพที่ 4-1 การเปลี่ยนแปลง (a) ความเข้มข้นแอมโมเนีย (b) จำนวนยีน *amoA* ของ AOA (c) จำนวนยีน *amoA* ของ AOB ระหว่างการบ่ม DNA-SIP โดยใช้ตะกอนจากถังปฏิกรณ์ NRI ที่เก็บในเดือนที่ 4



ภาพที่ 4-2 การเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวของดีเอ็นเอสำหรับ (a) ยีน *amoA* ของ AOA ภายใต้สภาวะที่ไม่มี ATU (b) ยีน *amoA* ของ AOB ภายใต้สภาวะที่ไม่มี ATU และ (c) ยีน *amoA* ของ AOA ภายใต้สภาวะที่มี ATU ความเข้มข้น 80 μM โดยใช้ตะกอนจากถังปฏิกรณ์ NRI ที่เก็บในเดือนที่ 4

2. ผลของ ATU ที่ความเข้มข้น 80 μM ต่อการสร้างเซลล์ของ AOA และ AOB ในถังปฏิกรณ์

ทำการบ่มตะกอนจากถังปฏิกรณ์ NRI ด้วย ATU ที่ความเข้มข้น 80 μM และ $^{13}\text{C-HCO}_3^-$ เป็นเวลา 30 วัน พร้อมกับการทดลองที่ไม่มีการเติม ATU ($^{12}\text{C-HCO}_3^-$ และ $^{13}\text{C-HCO}_3^-$) ดังแสดงผลในหัวข้อก่อนหน้านี้ ความเข้มข้นแอมโมเนีย ไนโตรทและไนเตรทในน้ำเข้าและน้ำออกของถังบ่มแสดงดัง ภาพที่ 4-1a จำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ซึ่งตรวจวัดด้วยเทคนิค qPCR ระหว่างการบ่มแสดงดังภาพที่ 4-1b และ ภาพที่ 4-1c ตามลำดับ ในวันที่ 21 ของชุดทดลองที่บ่มด้วย ATU ที่ความเข้มข้น 80 μM จำนวนยีน *amoA* ของ AOA มีจำนวนไม่ต่างจากเมื่อเริ่มทำการทดลองและชุดทดลองที่ไม่มีการเติม ATU มากนัก แสดงให้เห็นว่า AOA มีการเจริญเติบโตและรักษาจำนวนเซลล์ในระบบไว้ได้ แม้จะมี ATU ที่ความเข้มข้น 80 μM อยู่ในระบบ และระบบเป็นแบบไหลต่อเนื่องซึ่งมีการทิ้งเซลล์ออกจากระบบตลอดเวลา ผลการตรวจนับจำนวนยีน *amoA* ของ AOB เป็นไปในทิศทางตรงกันข้ามคือ จำนวนยีน *amoA* ของ AOB ในชุดทดลองที่มีการเติม ATU ที่ความเข้มข้น 80 μM มีจำนวนน้อยกว่าเมื่อเริ่มทำการทดลองและชุดทดลองที่ไม่มีการเติม ATU แสดงให้เห็นว่า AOB ไม่สามารถเจริญเติบโตและรักษาจำนวนเซลล์ในระบบไว้ได้ ซึ่งหมายความว่า ATU ที่ความเข้มข้น 80 μM ยับยั้งการเจริญเติบโตของ AOB

ภาพที่ 4-2c แสดง DNA-SIP profiles ของจำนวนยีน *amoA* ของ AOA ในแต่ละแฟรคชัน โดยไม่สามารถแสดง DNA-SIP profiles ของจำนวนยีน *amoA* ของ AOB ได้เนื่องจากจำนวนยีน *amoA* ของ AOB ในแต่ละแฟรคชันมีค่าน้อยกว่า LOD อันเนื่องมาจากจำนวนเซลล์ที่ลดลงระหว่างการบ่มภายใต้ ATU ที่ความเข้มข้น 80 μM ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ในวันที่ 21 ของการบ่ม ยอดกราฟของยีน *amoA* ของ AOA สำหรับชุดบ่มด้วย $^{12}\text{C-HCO}_3^-$ ปรากฏที่ 1.6961 g ml^{-1} ซึ่งยอดกราฟนี้มีการเคลื่อนไปที่ 1.7114 g ml^{-1} ในชุดบ่มด้วย $^{13}\text{C-HCO}_3^-$ (ภาพที่ 4-2 c) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับชุดบ่มที่ไม่มีการเติม ATU โดยการเคลื่อนตัวไปในทิศทางที่มี Buyout density สูงขึ้น แสดงให้เห็นว่ายีน *amoA* ของ AOA มีน้ำหนักมากขึ้นจากการที่เซลล์นำ $^{13}\text{C-HCO}_3^-$ มาใช้ในการประกอบประกอบของเซลล์ เช่น ดีเอ็นเอ แม้จะมี ATU ที่ความเข้มข้น 80 μM ในระบบก็ตาม

ผลการทดลองในส่วนนี้จึงช่วยยืนยันว่า ATU ที่ความเข้มข้น 80 μM ยับยั้งการเจริญเติบโตของ AOB แต่ไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของ AOA ซึ่งช่วยสนับสนุนผลจากการทดลองที่ 3 ที่นำ ATU มาใช้ในการศึกษาการมีส่วนร่วมของ AOA และ AOB ในกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ NRI และ NRII

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลองที่ 5

การตรวจวัดกิจกรรมของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียจริงด้วยสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่ม

ในการทดลองที่ 3 “การศึกษาสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่มสำหรับการตรวจวัดกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA และ AOB” พบว่า ATU ที่ความเข้มข้น 10-200 μM สามารถนำมาใช้ในการศึกษากิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA ในระบบเชื้อผสม (Mixed culture system) ที่มี AOA และ AOB อยู่ร่วมกันได้ ดังนั้นการทดลองนี้จึงเป็นการนำ ATU มาศึกษากับระบบบำบัดน้ำเสีย 5 ระบบ ได้แก่ WWTP1 WWTP3 WWTP4 WWTP5 และ WWTP6 โดยศึกษาระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP3 WWTP4 และ WWTP6 เนื่องจากได้ใช้ตอนก่อนจากระบบทั้ง 3 ในการทดลองที่ 2 “การระบุการออกซิไดซ์แอมโมเนียแบบอโตโทรฟของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสียจริงด้วยเทคนิค DNA-SIP” ไว้ก่อนแล้ว โดยได้เพิ่มตะกอนจากระบบ WWTP1 เข้ามาในการทดลองที่ 5 ด้วย เนื่องจากระบบนี้พบแต่ AOB ซึ่งจะช่วยยืนยันผลของสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่มต่อ AOB ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังจะทำการทดลองกับตะกอนจากระบบ WWTP5 ด้วย

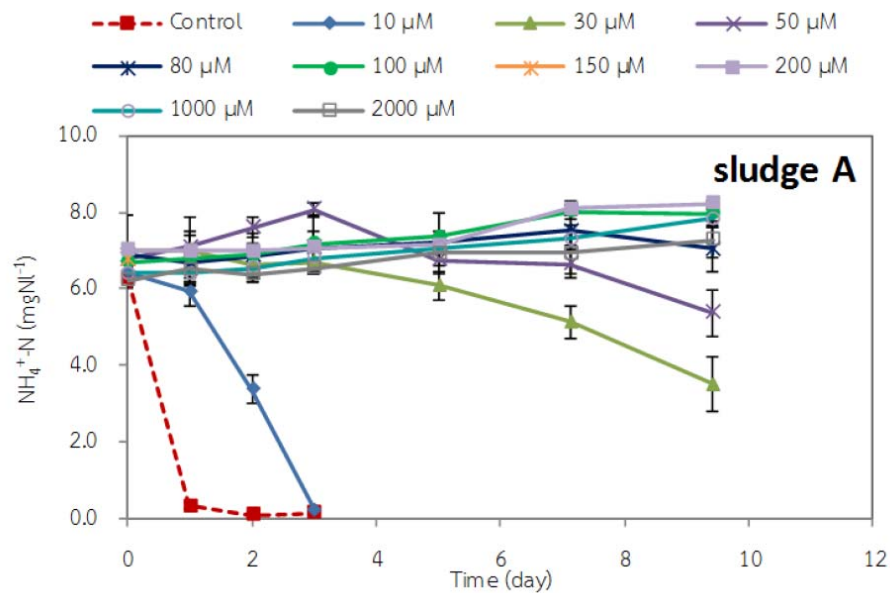
1. กิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียจริงภายใต้สภาวะที่มี ATU

ตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP1 พบเฉพาะ AOB เท่านั้น ในชุดควบคุมที่ไม่มี ATU พบการลดลงของแอมโมเนียจนเหลือใกล้ 0 mgN l^{-1} ในระยะเวลา 1 วัน (ภาพที่ 5-1) ส่วนชุดทดลองที่ใส่ ATU ความเข้มข้น 10 μM ความเข้มข้นแอมโมเนียลดลงจนเหลือใกล้ 0 mgN l^{-1} ในระยะเวลา 3 วัน สำหรับชุดทดลองที่ใส่ ATU ความเข้มข้น > 50 μM พบการยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียได้โดยสมบูรณ์ ซึ่งค่อนข้างสอดคล้องกับผลจากการทดลองที่ 3 กับถังปฏิกรณ์ NRII ที่พบเฉพาะ AOB

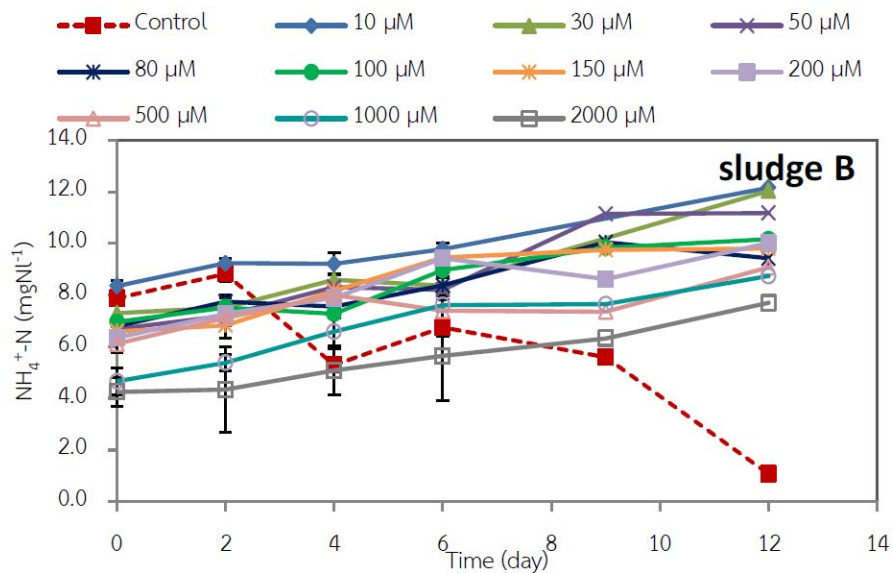
ตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP3 และ WWTP4 พบจำนวนยีน *amoA* ของ AOB มากกว่า AOA สำหรับตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP3 ความเข้มข้นแอมโมเนียในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม ATU ลดลงจนเหลือใกล้ 0 mgN l^{-1} ในระยะเวลา 12 วัน (ภาพที่ 5-2) ATU ที่ความเข้มข้น 10-2000 μM สามารถยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียได้โดยสมบูรณ์ สำหรับตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP4 ความเข้มข้นแอมโมเนียในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม ATU ลดลงจนเหลือใกล้ 0 mgN l^{-1} ใน 10 วัน (ภาพที่ 5-3) ATU ที่ความเข้มข้น 10-500 μM พบการลดลงของแอมโมเนียเล็กน้อย เมื่อ ATU > 500 μM กิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์

ตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP5 และ WWTP6 พบจำนวนยีน *amoA* ของ AOA มากกว่า AOB สำหรับตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP5 ความเข้มข้นแอมโมเนียในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม ATU ลดลงจนเหลือใกล้ 0 mgN l^{-1} ในระยะเวลา 2 วัน (ภาพที่ 5-4) ATU ที่ความเข้มข้น 10-500 μM สามารถยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียได้บางส่วน โดยการยับยั้งจะมากขึ้นเมื่อความเข้มข้น ATU สูงขึ้น เมื่อ ATU > 1000 μM กิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียถูก

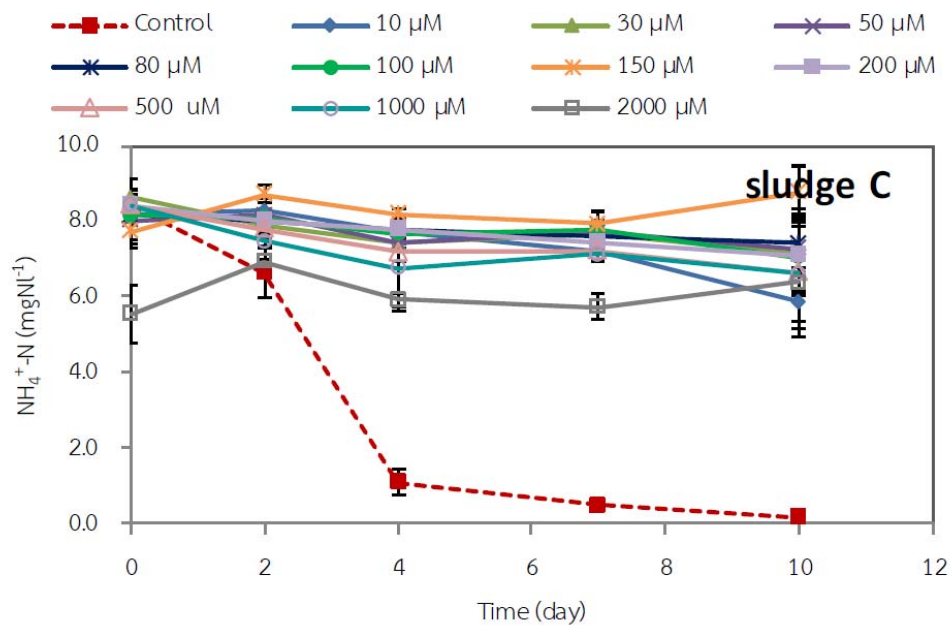
ยับยั้งโดยสมบูรณ์ สำหรับตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP6 พบว่าตะกอนค่อนข้างอ่อนไหวกับ ATU มากกว่าตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP5 ทั้งนี้เนื่องจากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP6 มีสัดส่วน AOA:AOB น้อยกว่า



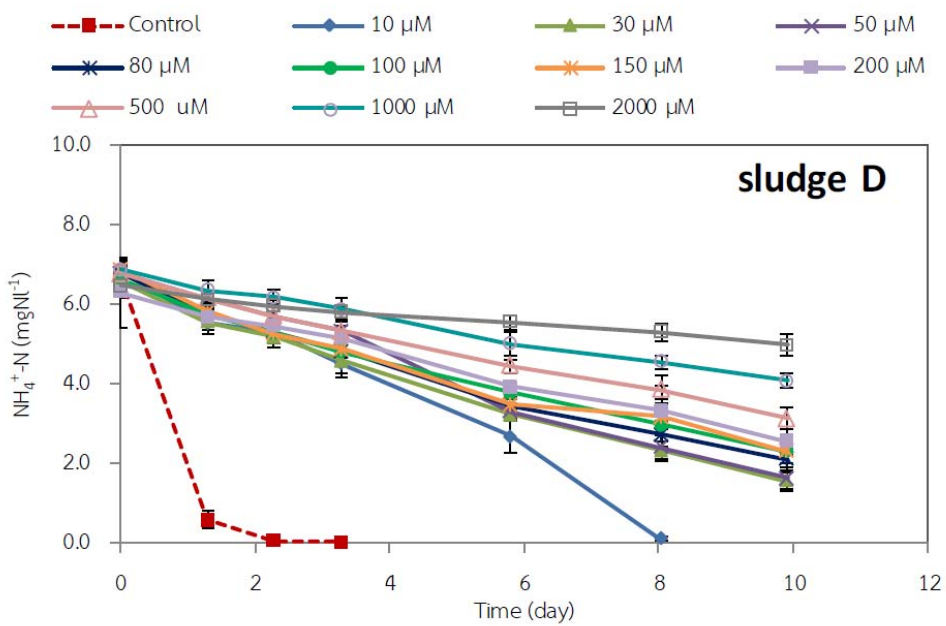
ภาพที่ 5-1 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นแอมโมเนียภายใต้ ATU สำหรับระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP1



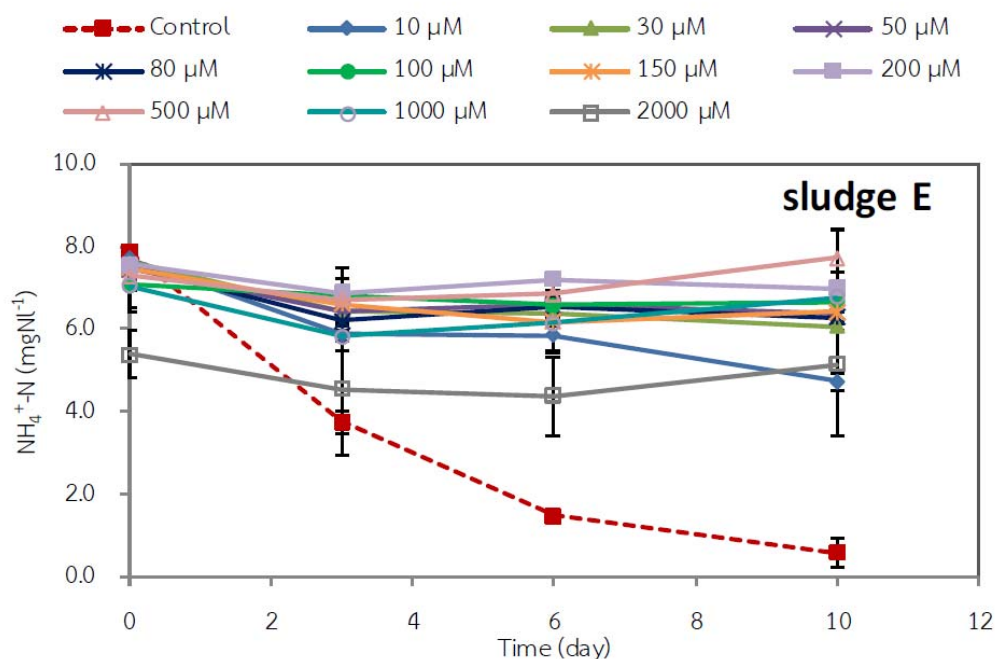
ภาพที่ 5-2 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นแอมโมเนียภายใต้ ATU สำหรับระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP3



ภาพที่ 5-3 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นแอมโมเนียภายใต้ ATU สำหรับระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP4



ภาพที่ 5-4 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นแอมโมเนียภายใต้ ATU สำหรับระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP5



ภาพที่ 5-5 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นแอมโมเนียภายใต้ ATU สำหรับระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP6

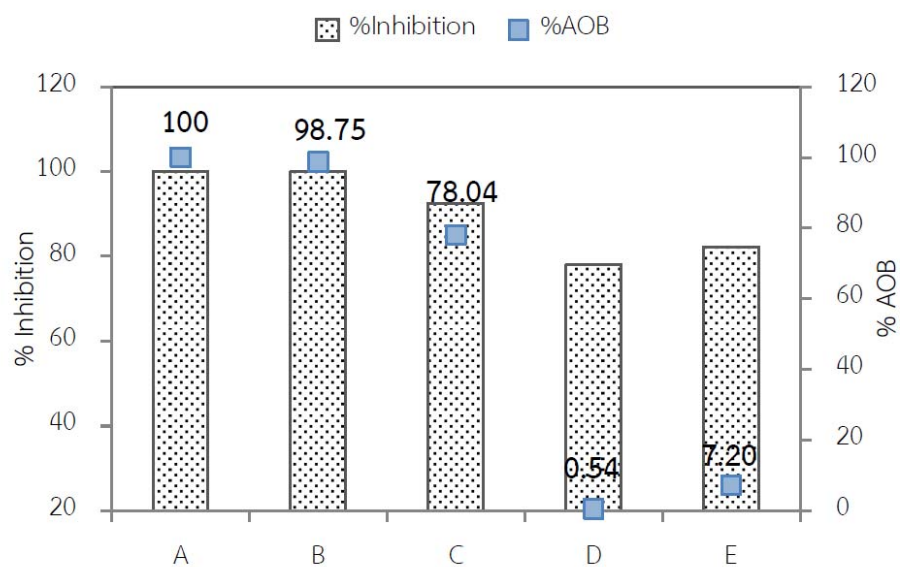
2. การมีส่วนร่วมของ AOA และ AOB ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียในตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียจริง

จากผลการทำ DNA-SIP ในการทดลองที่ 4 พบว่า ATU ที่ความเข้มข้น 80 μM ยับยั้งกิจกรรมของ AOB เป็นหลัก โดยไม่ยับยั้งกิจกรรมของ AOA จึงได้ทำการคำนวณผลจากภาพที่ 5-1 ถึง 5-5 ที่ได้จาก ATU ความเข้มข้น 80 μM โดยแสดงเป็นความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียกับเปอร์เซ็นต์ AOB ในตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย โดยแสดงดังภาพที่ 5-6 ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียคำนวณเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม ATU ที่เวลาที่แอมโมเนียเข้าใกล้ 0 mgN l^{-1}

เปอร์เซ็นต์ AOB ในตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียมีค่าเรียงจากมากไปน้อยดังนี้ WWTP1 (100%) WWTP3 (98.75%) WWTP4 (78.04%) WWTP6 (7.20%) และ WWTP5 (0.54%) โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียมีความสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์ AOB ในตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย มีค่าเรียงจากมากไปน้อยดังนี้ WWTP1 (100%) WWTP3 (100%) WWTP4 (92.57%) WWTP6 (82.25%) WWTP5 (78.05%)

สำหรับระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP1 WWTP3 WWTP4 ซึ่งมีจำนวน AOB มากกว่า AOA ผลการทดลองด้วย ATU แสดงให้เห็นว่า AOB เป็นผู้ทำหน้าที่หลักในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย สำหรับระบบบำบัด WWTP5 และ WWTP6 ซึ่งพบ AOA มากกว่า AOB ผลการทดลองด้วย ATU แสดงให้เห็นว่า AOB ยังคงเป็นผู้ทำหน้าที่หลักในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย โดย AOA มีส่วนร่วมในการออกซิไดซ์แอมโมเนียประมาณ 20% (ภาพที่ 5-6) ทั้งนี้ผลการทดลองในส่วนนี้มีทั้งความสอดคล้องและข้อขัดแย้งกับการทดลองที่ 2 ที่ตรวจสอบการใช้สารอินทรีย์คาร์บอนของ AOA และ AOB ในสภาวะที่มีแอมโมเนีย กับตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย 3 ระบบด้วยเทคนิค DNA-SIP โดยในระบบที่ไม่พบการเจริญเติบโตแบบออกซิโททรอปของ AOA ใน

สภาวะที่มีแอมโมเนียจากการตรวจสอบด้วย DNA-SIP ก็ไม่พบการมีส่วนร่วมของ AOA ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียเมื่อตรวจสอบด้วย ATU ด้วยเช่นกัน แต่สำหรับอีก 2 ระบบที่พบการเจริญเติบโตแบบบอโตโทรปของ AOA ในสภาวะที่มีแอมโมเนียจากการตรวจสอบด้วย DNA-SIP กลับพบว่า AOA มีส่วนร่วมในการออกซิไดซ์แอมโมเนียในหนึ่งระบบ (โดยเป็นการมีส่วนร่วมในสัดส่วนที่น้อย) และไม่มีส่วนร่วมในการออกซิไดซ์แอมโมเนียในอีกระบบจากการตรวจสอบด้วย ATU ทั้งนี้ อาจเป็นไปได้ว่าวิธีการเดินระบบในการทดลองทั้ง 2 การทดลองมีความแตกต่างกัน กล่าวคือในการทดลอง DNA-SIP ได้ใช้ถังบ่มแบบไหลต่อเนื่องซึ่งมีการให้อาหารเลี้ยงเชื้อแก่ระบบในระดับต่ำตลอดเวลา และมีการปรับสภาวะของระบบให้มีความเหมาะสมกับจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มตลอดเวลาเช่นกัน ในขณะที่การทดลองกับ ATU ทำในขวดทดลองในลักษณะที่ละเท ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นแอมโมเนียจาก 7 mgNl^{-1} และลดลงตามเวลา ซึ่งโดยรวมมีค่าสูงกว่าในถังบ่มแบบไหลต่อเนื่องสำหรับ DNA-SIP ซึ่งอาจเหมาะสมกับ AOA มากกว่า ทั้งนี้มีความเป็นไปได้อีกเช่นกันว่า AOA ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียอาจมีจำนวนมากเกินกว่าความจำเป็นที่ต้องใช้ในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย งานวิจัยในอดีตพบว่า AOA บางสายพันธุ์สามารถดำรงชีวิตได้นอกเหนือจากการเจริญเติบโตแบบบอโตโทรป โดยสามารถใช้สารอินทรีย์คาร์บอนในการสร้างเซลล์แบบจุลินทรีย์เฮเทอโรโทรปได้ (Tourna และคณะ 2011; Sauder และคณะ 2017) Tourna และคณะ 2011 พบว่าสารอินทรีย์บางชนิดที่ความเข้มข้นต่ำ ยกตัวอย่างเช่น 0.1 mM ของไพรูเวท สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของ *Nitrososphaera viennensis* ได้ Sauder และคณะ 2017 พบว่า *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare* ซึ่งคัดแยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียสามารถถูกกระตุ้นด้วย malate และ succinate จึงเป็นไปได้เช่นกันว่าสารอินทรีย์บางตัวในระบบบำบัดน้ำเสีย WWTP5 และ WWTP6 อาจสนับสนุนการเจริญเติบโตของ AOA ในระบบ ให้มีจำนวนมากเกินจริง โดยจำนวนยีน *amoA* ที่พบอาจไม่ได้สัมพันธ์กับกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียมากนัก งานวิจัยกับระบบบำบัดน้ำเสียจริงก็พบว่า AOA บางกลุ่มอาจไม่ได้ใช้สารอินทรีย์คาร์บอนในการสร้างเซลล์เช่นกัน Mußmanna และคณะ (2011) ไม่พบการตรึง $^{14}\text{CO}_2$ ในเซลล์ AOA ในระบบบำบัดน้ำเสียโรงกลั่นเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค MAR-FISH Sauder et al (2017) พบว่า AOA ที่ใกล้เคียงกับ *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare* ในไบโอฟิล์มของระบบบำบัดน้ำเสีย ไม่ใช่ HCO_3^- ในการสร้างเซลล์เช่นกัน จึงเป็นไปได้ว่า AOA กลุ่มนี้อาจใช้สารอินทรีย์คาร์บอนในการสร้างเซลล์ ทำให้จำนวนมากเกินกว่าความจำเป็นที่ต้องใช้ในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย



ภาพที่ 5-6 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียด้วย ATU ที่ความเข้มข้น 80 μ M กับเปอร์เซ็นต์ AOB ในตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย (A) WWTP1 (B) WWTP3 (C) WWTP4 (D) WWTP5 และ (E) WWTP6

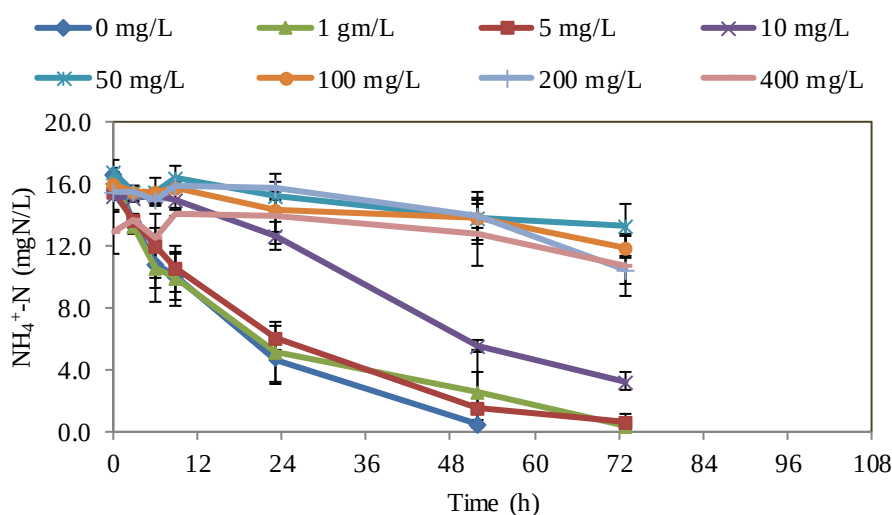
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลองที่ 6

ผลของสารพาราไตริฟินอลและอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อกิจกรรมของ AOB

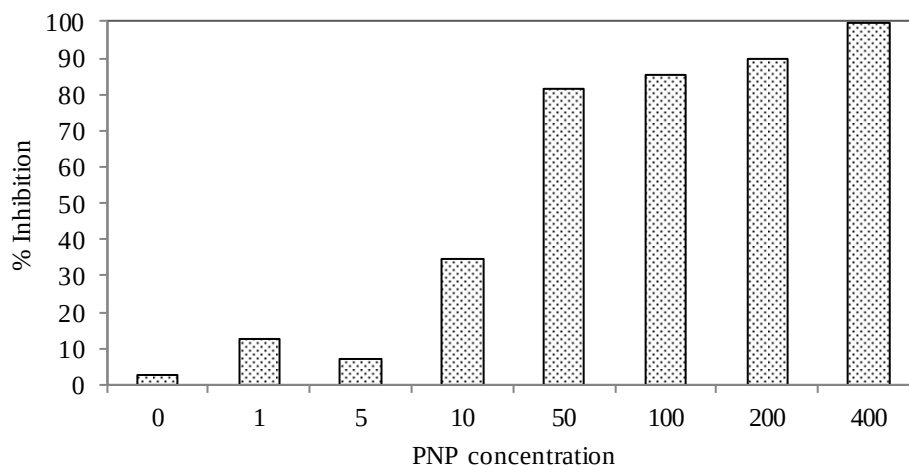
การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของสารพาราไตริฟินอลและอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อกิจกรรมของ AOB โดยใช้ตะกอนจากถังปฏิกรณ์ NRII

6.1 ผลของสารพาราไตริฟินอลต่อกิจกรรมของ AOB

ความเข้มข้นแอมโมเนียในชุดควบคุม ลดลงเหลือ 0 mgNL⁻¹ ในเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 6-1) ในขณะที่เมื่อเติมพาราไตริฟินอลที่ความเข้มข้นต่างๆ จะส่งผลต่อกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียดังนี้คือ ที่ความเข้มข้นพาราไตริฟินอล 1 และ 5 mgL⁻¹ ความเข้มข้นแอมโมเนียจะลดลงเป็น 0 mgNL⁻¹ โดยใช้ระยะเวลานานกว่าในชุดควบคุมคือ 72 ชั่วโมง และในช่วงระยะเวลาเดียวกัน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นพาราไตริฟินอลเป็น 10 mgL⁻¹ พบว่าความเข้มข้นแอมโมเนียจะลดลงเหลือ 3 mgNL⁻¹ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นพาราไตริฟินอลเป็น 50-400 mgL⁻¹ ความเข้มข้นแอมโมเนียจะลดลงเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียที่ความเข้มข้นพาราไตริฟินอลต่างๆพบว่า พาราไตริฟินอลที่ 400 mgL⁻¹ ให้ผลการยับยั้งการออกซิไดซ์แอมโมเนียมากที่สุด รองลงไปได้แก่ที่ 200 100 10 1 และ 5 mgL⁻¹ ตามลำดับ (ภาพที่ 6-2) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารพาราไตริฟินอลสามารถยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOB และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นพาราไตริฟินอลความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียจะเพิ่มสูงขึ้น



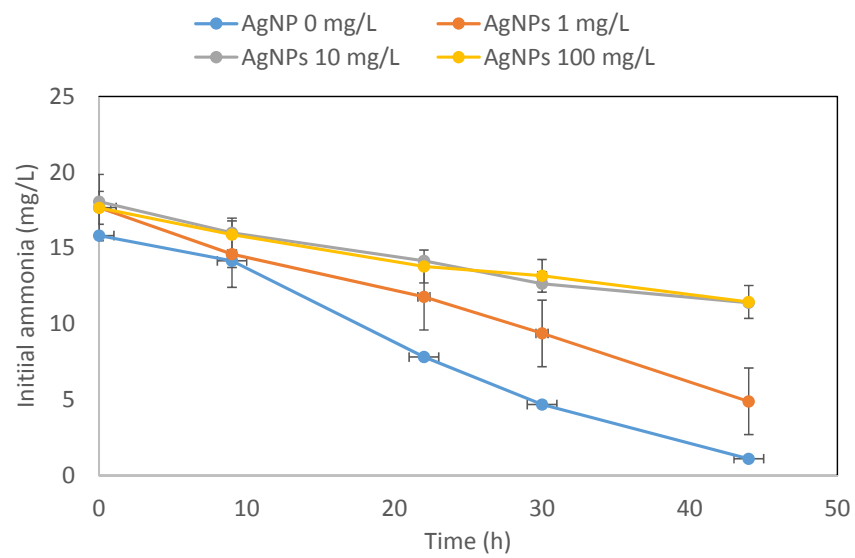
ภาพที่ 6-1 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นแอมโมเนียที่ความเข้มข้นพาราไตริฟินอลต่างๆ



ภาพที่ 6-2 เปอร์เซนต์การยับยั้งการออกซิไดซ์แอมโมเนียที่ความเข้มข้นพาราไตรฟีนอลต่างๆ

6.2 ผลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อกิจกรรมของ AOB

ความเข้มข้นแอมโมเนียในชุดควบคุมลดลงเหลือใกล้ 0 mgNL⁻¹ ในเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 6-3) ในขณะที่เมื่อเติมอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ความเข้มข้นต่างๆ จะส่งผลต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนียดังนี้คือ ที่ความเข้มข้นอนุภาคซิลเวอร์นาโน 1 mgL⁻¹ พบการยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียบางส่วน และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นอนุภาคซิลเวอร์นาโนเป็น 10 และ 100 mgL⁻¹ พบว่ากิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียส่วนใหญ่ถูกยับยั้ง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนสามารถยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนีย และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นอนุภาคซิลเวอร์นาโนความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียจะเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งในอนาคตต้องหาวิธีป้องกันการยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสีย เพื่อป้องกันการลดลงของประสิทธิภาพการกำจัดไนโตรเจนของระบบ เมื่อมีอนุภาคซิลเวอร์นาโนในน้ำเข้าระบบ ยกตัวอย่างเช่น การใช้ระบบเซลล์ตรึงแทนระบบเซลล์แขวนลอย ซึ่งจะช่วยป้องกันจุลินทรีย์จากสารพิษได้ดีกว่า



ภาพที่ 6-3 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นแอมโมเนียที่ความเข้มข้นอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่างๆ

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสีย โดยอาศัยเทคนิค 2 เทคนิคได้แก่ DNA-stable isotope probing (DNA-SIP) และสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่ม AOA และ AOB

ในเบื้องต้นได้คัดเลือกระบบบำบัดน้ำเสีย 8 ระบบ มาตรวจวัดจำนวนยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ด้วยเทคนิค qPCR โดยพบทั้ง AOA และ AOB ในระบบบำบัด 5 ระบบ และพบเฉพาะ AOB โดยมีจำนวน AOA น้อยกว่า LOD (Limit of detection) ในระบบบำบัด 3 ระบบ

จากนั้นได้ใช้เทคนิค DNA-SIP ในการระบุการใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนในการสร้างเซลล์ของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสีย 3 ระบบ โดยทำการบ่มตะกอนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $^{12}\text{C-HCO}_3^-$ และ $^{13}\text{C-HCO}_3^-$ ภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีแอมโมเนีย เพื่อดูการกระจายตัวของยีน *amoA* ของ AOA และ AOB ที่สร้างจาก HCO_3^- ที่มีคาร์บอนไอโซโทปแตกต่างกัน ในเบื้องต้นได้หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการกระจายตัวของดีเอ็นเอก่อน โดยได้แปรค่าปัจจัยที่มีผลต่อการแยกดีเอ็นเอ ได้แก่ ความเข้มข้นสารละลาย CsCl และ แรงหนีศูนย์กลาง (G-force) และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการแยกดีเอ็นเอคือ ค่าความหนาแน่นเริ่มต้นของ CsCl 1.88 g mL^{-1} (โดยจะได้ค่าความหนาแน่นหลังผสมสารละลายทุกตัวที่ 1.70 g mL^{-1}) ค่าแรงหนีศูนย์กลาง $178,000 \times g$ อุณหภูมิขณะปั่นแยก 20 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการปั่น 72 ชั่วโมง เมื่อใช้สภาวะดังกล่าวกับตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียทั้ง 3 ระบบพบว่า AOB ในตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียทั้ง 3 ระบบ มีการใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนในการสร้างเซลล์และส่วนประกอบต่างๆของเซลล์เช่นดีเอ็นเอ ในสภาวะที่มีแอมโมเนีย ซึ่งหมายความว่า AOB มีส่วนร่วมในการออกซิไดซ์แอมโมเนียในตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียทั้ง 3 ระบบ สำหรับ AOA พบการใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนในการสร้างเซลล์ในตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย 2 ระบบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า AOA มีส่วนร่วมในการออกซิไดซ์แอมโมเนียในตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียทั้ง 2 ระบบนี้ ผลการวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของยีน *amoA* ของ AOA ในตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียหนึ่งในสองระบบที่พบว่า AOA มีส่วนร่วมในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย พบว่า AOA ทั้งหมดในตะกอนจากระบบดังกล่าวอยู่ใน subcluster ภายใน group 1.1b Thaumarcheota จึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับ AOA ใน subcluster นี้ เพื่อยืนยันว่า AOA ใน subcluster นี้ มีการเจริญเติบโตแบบออโตโทรฟขณะที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียจริง ผลการตรวจสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ด้วยการทำ PCR-sequencing กับตัวอย่างตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย 2 ระบบที่ AOA มีส่วนร่วมในการออกซิไดซ์แอมโมเนียพบว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่มีความเฉพาะเจาะจงกับ AOA ใน subcluster นี้เท่านั้น และเมื่อนำไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่นี้ไปใช้กับตัวอย่างจากการทำ DNA-SIP กับระบบบำบัดน้ำเสียดังกล่าว ยืนยันได้ว่า AOA ใน subgroup นี้ มีการเจริญเติบโตแบบออโตโทรฟขณะที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียจริง

งานวิจัยนี้ได้ใช้ ATU เป็นสารยับยั้งการทำงานของ AOB และ PTIO เป็นสารยับยั้งการทำงานของ AOA โดยทำการศึกษากับตะกอนจากถังปฏิกรณ์ไนตริไฟอิง 2 ถัง โดยถังปฏิกรณ์ทั้ง 2 ถังมีส่วนประชากร AOA ต่อ AOB แตกต่างกัน

โดยพบ AOA มากกว่า AOB ในถังปฏิกรณ์หนึ่ง ในขณะที่อีกถังปฏิกรณ์พบเฉพาะ AOB เท่านั้น และที่ผ่านมาได้ใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่ไม่มีสารอินทรีย์ในการเลี้ยงระบบมาเป็นเวลานาน ทำให้มีจุลินทรีย์กลุ่มเฮโทโทรฟในระบบมีไม่มากเมื่อเทียบกับตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียจริง ทำให้ช่วยลดผลกระทบของจุลินทรีย์กลุ่มเฮโทโทรฟต่อการศึกษาสารยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่มได้ ทั้งนี้ AOA ที่พบในถังปฏิกรณ์ไนตริไฟอิงอยู่ใน *Nitrososphaera* sister cluster ซึ่งเป็นสมาชิกใน Group 1.1b Thaumarchaeota ผลการทดลองพบว่า ATU ที่ความเข้มข้น $\geq 10 \mu\text{M}$ เพียงพอต่อการยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOB ในขณะที่ต้องใช้ ATU ความเข้มข้น $> 500 \mu\text{M}$ ในการการยับยั้งกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA และสามารถใช้อูที่ความเข้มข้นระหว่าง 10-200 μM มาตรวจวัดการทำงานของ AOA ที่อยู่ในระบบที่มี AOA และ AOB อยู่ร่วมกันได้

การใช้เทคนิค DNA-SIP ในการระบุการใช้สารอินทรีย์คาร์บอนในการสร้างเซลล์ของ AOA และ AOB กับตะกอนจากถังปฏิกรณ์ไนตริไฟอิงทั้ง 2 ถังพบว่าทั้ง AOA และ AOB มีการนำ ^{13}C ไปเป็นส่วนประกอบในการสร้างยีน *amoA* ซึ่งหมายความว่า AOA และ AOB สามารถเจริญเติบโตแบบ chemolithoautotrophy ซึ่งใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งพลังงานและ HCO_3^- เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผลการทดลองนี้ช่วยยืนยันการมีส่วนร่วมของ AOA และ AOB ในกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียในถังปฏิกรณ์ไนตริไฟอิงทั้ง 2 ถัง ได้เป็นอย่างดี เมื่อมีการเติม ATU ที่ความเข้มข้น 80 μM ร่วมกับการทำ DNA-SIP พบว่า ATU ที่ความเข้มข้น 80 μM ยับยั้งการเจริญเติบโตของ AOB แต่ไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของ AOA ซึ่งช่วยสนับสนุนผลจากการทดลองก่อนหน้านี้ ที่

จากนั้นได้ใช้อูมาใช้ในการตรวจวัดกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียของ AOA และ AOB ในระบบบำบัดน้ำเสีย 5 ระบบ สำหรับระบบที่มีจำนวน AOB มากกว่า AOA พบว่า AOB เป็นจุลินทรีย์หลักที่ทำหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนีย และสำหรับระบบที่พบ AOA มากกว่า AOB กลับพบว่า AOB เป็นจุลินทรีย์หลักในการออกซิไดซ์แอมโมเนียเช่นกัน โดย AOA มีส่วนร่วมในการออกซิไดซ์แอมโมเนียประมาณ 20% ซึ่งน้อยกว่าสัดส่วนที่ปรากฏในระบบ ทั้งนี้ผลการทดลองในส่วนนี้มีทั้งความสอดคล้องและขัดแย้งกับการทดลอง DNA-SIP กับตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย 3 ระบบ โดยในระบบที่ไม่พบการเจริญเติบโตแบบออโตโทรฟของ AOA ในสถานะที่มีแอมโมเนียจากการตรวจสอบด้วย DNA-SIP ก็ไม่พบการมีส่วนร่วมของ AOA ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียเมื่อตรวจสอบด้วย ATU ด้วยเช่นกัน แต่สำหรับอีก 2 ระบบที่พบการเจริญเติบโตแบบออโตโทรฟของ AOA ในสถานะที่มีแอมโมเนียจากการตรวจสอบด้วย DNA-SIP กลับพบว่า AOA มีส่วนร่วมในการออกซิไดซ์แอมโมเนียในหนึ่งระบบ (โดยเป็นการมีส่วนร่วมในสัดส่วนที่น้อย) และไม่มีส่วนร่วมในการออกซิไดซ์แอมโมเนียในอีกระบบจากการตรวจสอบด้วย ATU ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าวิธีการเดินระบบในการทดลอง DNA-SIP และ ATU มีความแตกต่างกัน ซึ่งในการทดลอง DNA-SIP ได้ใช้ถังบ่มแบบไหลต่อเนื่องซึ่งมีการให้อาหารเลี้ยงเชื้อแก่ระบบในระดับต่ำตลอดเวลา ในขณะที่การทดลองกับ ATU ทำในขวดทดลองในลักษณะที่ละเหยซึ่งโดยรวมมีค่าความเข้มข้นแอมโมเนียสูงกว่าในถังบ่มแบบไหลต่อเนื่องสำหรับ DNA-SIP ซึ่งอาจเหมาะสมกับ AOA มากกว่า และยังมีความเป็นไปได้อีกเช่นกันว่า AOA ที่พบในระบบบำบัดน้ำเสียอาจมีจำนวนมากเกินกว่าความจำเป็นที่ต้องใช้ในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย งานวิจัยในอดีตพบว่า AOA บางสายพันธุ์สามารถดำรงชีวิตได้นอกเหนือจาก

การเจริญเติบโตแบบออโตโทรป โดยสามารถใช้สารอินทรีย์คาร์บอนในการสร้างเซลล์แบบจุลินทรีย์เฮเทอโรโทรปได้ โดยสารอินทรีย์บางชนิดที่ความเข้มข้นต่ำสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของ AOA ได้ ยกตัวอย่างเช่น pyruvate malate และ succinate (Touna และคณะ 2011; Sauder และคณะ 2017) โดยสารอินทรีย์บางตัวในระบบบำบัดน้ำเสียที่ทำการศึกษามองสนับสนุนการเจริญเติบโตของ AOA ในระบบ ให้มีจำนวนมากเกินจริง โดยจำนวนที่พบอาจไม่ได้สัมพันธ์กับกิจกรรมการออกซิไดซ์แอมโมเนียมากนัก อย่างไรก็ตามผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า AOA มีส่วนร่วมในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย แต่อาจไม่ใช่จุลินทรีย์หลักที่ทำหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งควรทำการศึกษาเพิ่มเติมด้วยเทคนิคอื่นๆต่อไป

สำหรับผลของสารพาราไตริฟินอลและอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อกิจกรรมของ AOB โดยใช้ตะกอนจากถังปฏิกรณ์ในตรีไฟท์ที่พบเฉพาะ AOB พบว่า พาราไตริฟินอลและอนุภาคซิลเวอร์นาโนสามารถยับยั้งการออกซิไดซ์แอมโมเนียและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นพาราไตริฟินอลและอนุภาคซิลเวอร์นาโน ความสามารถในการยับยั้งการออกซิไดซ์แอมโมเนียจะเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้การทดลองนี้ถือเป็นส่วนเสริมของโครงการซึ่งต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Bai, Y., Sun, Q., Wen, D., Tang, X., 2012. Abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in industrial and domestic wastewater treatment systems. *FEMS Microbiology Ecology* 80 (2), 323-330.
- De la Torre JR, Walker CB, Ingalls AE, Könneke M, Stahl DA., 2008 Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environmental Microbiology* 10(3), 810–818.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (41), 14683–14688.
- Gao, J.-F., Luo, X., Wu, G.-X., Li, T., Peng, Y.-Z., 2013. Quantitative analyses of the composition and abundance of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in eight full-scale biological wastewater treatment plants. *Bioresource Technology* 138, 285-296.
- Gao, J., Luo, X., Wu, G., Li, T., Peng, Y., 2014. Abundance and diversity based on *amoA* genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in ten wastewater treatment systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (7), 3339-3354.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (6), 2134–2139.
- Huang Y, Niu BF, Gao Y, Fu LM, Li WZ., 2010. CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics* 26, 680-682.
- Könneke, 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.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33, 1870-1874.
- Lehtovirta-Morley, L.E., Stoecker, K., Vilcinskas, A., Prosser, J.I., Nicol, G.W., 2011. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (38), 15892-15897.

- Li, Y., Ding, K., Wen, X., Zhang, B., Shen, B., Yang, Y., 2016. A novel ammonia-oxidizing archaeon from wastewater treatment plant: Its enrichment, physiological and genomic characteristics. *Scientific Reports* 6, 23747.
- Limpiyakorn, T., Sonthiphand, P., Rongsayamanont, C., Polprasert, C., 2011. Abundance of *amoA* genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in activated sludge of full-scale wastewater treatment plants. *Bioresource Technology* 102 (4), 3694-3701.
- Martens-Habbena, W., Berube, P.M., Urakawa, H., De la Torre, J.R., Stahl, D.A., 2009. Ammonia oxidation kinetics determines niche separation of nitrifying archaea and bacteria. *Nature* 461, 976–979.
- Martens-Habbena W et al., 2015. The production of nitric oxide by marine ammonia-oxidizing archaea and inhibition of archaeal ammonia oxidation by a nitric oxide scavenger. *Environmental Microbiology* 17, 2261-2274.
- Mußmann, M., Brito, I., Pitcher, A., Sinninghe Damsté, J.S., Hatzenpichler, R., Richter, A., Nielsen, J.L., Müller, A., Daims, H., Wagner, M., Head, I.M., 2011. Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express *amoA* but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (40), 16771-16776.
- Niu J, Kasuga I, Kurisu F, Furumai H, Shigeeda T., 2013. Evaluation of autotrophic growth of ammonia-oxidizers associated with granular activated carbon used for drinking water purification by DNA-stable isotope probing. *Water Research* 47,7053-7065.
- Park, H.D., Wells, G.F., Bae, H., Griddle, C.S., Francis, C.A., 2006. Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (8), 5643–5647.
- Pester, M., Rattei, T., Flechl, S., Gröngroft, A., Richter, A., Overmann, J., Reinhold-Hurek, B., Loy, A., Wagner, M., 2012. AmoA-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of *amoA* genes from soils of four different geographic regions. *Environmental Microbiology* 14(2), 525-539.
- Rongsayamanont C, Limpiyakorn T, Law B, Khan E., 2010. Relationship between respirometric activity and community of entrapped nitrifying bacteria: Implications for partial nitrification. *Enzyme and Microbial Technology* 46, 229-236

- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 63(12), 4704–4712.
- Sauder, L.A., Peterse, F., Schouten, S., Neufeld, J.D. 2012. Low-ammonia niche of ammonia-oxidizing archaea in rotating biological contactors of a municipal wastewater treatment plant. *Environmental Microbiology* 14 (9), 2589-2600.
- Sauder, L.A., Albertsen, M., Engel, K., Schwarz, J., Nielsen, P.H., Wagner, M., Neufeld, J.D., 2017. Cultivation and characterization of *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare*, an ammonia-oxidizing archaeon from a municipal wastewater treatment system. *ISME Journal* Article in Press.
- Shen TL, Stieglmeier M, Dai JL, Urich T, Schleper C., 2013. Responses of the terrestrial ammonia-oxidizing archaeon *Ca. Nitrososphaera viennensis* and the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrospira multiformis* to nitrification inhibitors. *FEMS Microbiology Letter* 344, 121-129.
- Tourna, M., Stieglmeier, M., Spang, A., Könneke, M., Schintlmeister, A., Urich, T., Engel, M., Schlöter, M., Wagner, M., Richter, A., Schleper, C., 2011. *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (20), 8420-8425.
- Treusch AH, Leininger S, Kletzin A, Schuster SC, 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. *Environmental Microbiology* 7(12), 1985–1995.
- 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
- Walker CB et al., 2010. *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 8818-8823.
- Wells, G F., Park, H.-D., Yeung, C.-H., Eggleston, B., Francis, C.A., Criddle, C.S., 2009. Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor: betaproteobacterial

dynamics and low relative abundance of crenarchaea. *Environmental Microbiology* 11 (9), 2310-2328.

Widdel, F., Bak, F., in *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria:*

Ecophysiology, Isolation, Identification, Application 2nd edn (eds Ballows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K.-H.). Springer, New York, 1992), 3352--3378.

Yapsakli, K., Aliyazicioglu, C., Mertoglu, B., 2011. Identification and quantitative evaluation of nitrogen-converting organisms in a full-scale leachate treatment plant. *Journal of Environmental Management* 92 (3), 714-723.

Zhang, T., Ye, L., Tong, A.H.Y., Shao, M.F., Lok, S., 2011. Ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in six full-scale wastewater treatment bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91 (4), 1215-1225.

Zhang, Y., Tian, Z., Liu, M., Shi, Z.J., Hale, L., Zhou, J., Yang, M., 2015. High Concentrations of the Antibiotic Spiramycin in Wastewater Lead to High Abundance of Ammonia-Oxidizing Archaea in Nitrifying Populations. *Environmental Science and Technology* 49 (15), 9124-9132.

Output

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

- บทความที่ 1 อยู่ระหว่างรอการพิจารณาเพื่อตีพิมพ์ในวารสาร Environmental Science and Pollution Control

Contribution of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria to ammonia oxidation in nitrifying reactors

Papitchaya Srithep, Preeyaporn Pornkulwat, Tawan Limpiyakorn

- บทความที่ 2 อยู่ระหว่างการร่างต้นฉบับโดยแล้วเสร็จประมาณ 80% โดยเตรียมส่งพิจารณาเพื่อตีพิมพ์ในวารสาร Applied Microbiology and Biotechnology

Incorporation of $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3^-$ by ammonia-oxidizing archaea and bacteria during ammonia oxidation of sludge from a municipal wastewater treatment plant

Preeyaporn Pornkulwat, Suwat Soonglerdsongpha, Pathan Banjongproo, Papitchaya Srithep, Tawan Limpiyakorn

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงวิชาการ (ผลิตบัณฑิตระดับบัณฑิตศึกษา)

- ปริญญาโทวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 1 คน นางสาว ปรียาภรณ์ พรกุลวุฒน์ (จบการศึกษาแล้ว)
- ปริญญาเอกวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 1 คน นางสาว ปรียาภรณ์ พรกุลวุฒน์ (อยู่ระหว่างการศึกษา)
- ปริญญาเอกการจัดการสิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 1 คน นางสาวปพิชญา ศรีเทพ (จบการศึกษา กค 2560)

ภาคผนวก

(Draft)

(Unfinished)

Contribution of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria to ammonia oxidation in nitrifying reactors

Papitchaya Srithep^{1,2}, Preeyaporn Pornkulwat³, Tawan Limpiyakorn^{2,3*}

¹International Programs in Hazardous Substances and Environmental Management, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

²Center of Excellence on Hazardous Substance Management (HSM), Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

³Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

*Corresponding author name: Tawan Limpiyakorn
address: Department of Environmental Engineering,
Faculty of Engineering, Chulalongkorn
University, Phayathai Road, Pathumwan,
Bangkok 10330, Thailand
phone: +66-2-218-6667
fax: +66-2-218-6666
e-mail: tawan.l@chula.ac.th

Abstract

In this study, two laboratory nitrifying reactors were found to possess distinct groups of dominant ammonia-oxidizing microorganisms. AOA *amoA* genes outnumbered AOB *amoA* genes in reactor NRI, while only AOB *amoA* genes were detectable in reactor NRII. The AOA *amoA* gene sequences retrieved from NRI were characterized within the *Nitrososphaera* sister cluster of the Group 1.1b *Thaumarchaeota*. ATU and PTIO were applied individually and as a mixture to observe the ammonia-oxidizing activity of both microorganisms in the reactors' sludge. The results indicated that AOA and AOB jointly oxidized ammonia in NRI, while AOB played the main role in ammonia oxidation in NRII. DNA-SIP with $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3^-$ was performed on NRI sludge. Incorporation of ^{13}C into AOA and AOB *amoA* genes implies that both microorganisms may perform autotrophy during ammonia oxidation. Taken together, the results from this study provide direct evidence demonstrating the contribution of AOA and AOB to ammonia oxidation in the nitrifying reactors.

Keywords: ammonia-oxidizing archaea; ammonia-oxidizing bacteria; ATU; DNA-SIP; nitrifying reactor; PTIO; wastewater treatment

1. Introduction

The oxidation of ammonia to nitrite is the initial step for most biological nitrogen removal approaches in wastewater treatment. Ammonia oxidizing bacteria (AOB) have long been considered to be the only contributors to this process. However, ammonia oxidizing archaea (AOA) have recently been found to oxidize ammonia to nitrite in the global nitrogen cycle as well (Konneke et al. 2005; Tournier et al. 2011). AOA have been placed in a newly found phylum, *Thaumarchaeota*, in the domain *Archaea* (Brochier-Armanet et al., 2008). The first isolate, *Nitrosopumilus maritimus*, was retrieved from a marine environment (Konneke

et al. 2005). Subsequent AOA isolates and enriched cultures have been obtained from other environmental samples in later studies (Lehtovirta-Morley et al. 2011; Tournia et al. 2011).

Within wastewater treatment systems (WWTSs), AOA was first reported in USA WWTSs (Park et al. 2006). Later studies then observed the relative abundance of AOA and AOB gene markers in WWTSs and laboratory nitrifying reactors (Limpiyakorn et al. 2011; Mußmann et al. 2011; Gao et al. 2013; Gao et al. 2014; Sinthusith et al. 2015; Zhang et al. 2015). In some systems, AOA *amoA* genes were found to outcompete AOB *amoA* genes (Limpiyakorn et al. 2011; Mußmann et al. 2011; Sinthusith et al. 2015; Zhang et al. 2015). Although AOA *amoA* genes were found in high numbers in some systems, their contribution to ammonia oxidation in WWTSs remains unclear due to limited numbers of works on *in situ* activity investigation and AOA cultures from WWTSs (Mußmann et al. 2011; Li et al. 2016; Sauder et al. 2017).

To further the understanding of AOA and AOB's roles in ammonia oxidation within WWTSs, this study investigated the contribution of AOA and AOB to ammonia oxidation in two laboratory nitrifying reactors. The two reactors were initiated and operated under different conditions, leading to distinct proportions of AOA and AOB in the reactors. Because AOA and AOB perform ammonia oxidation with different pathways and are different in cell structure and properties (Walker et al. 2010; Shen et al. 2013), a few compounds can be used as selective inhibitors allowing only one group of microorganisms to perform ammonia oxidation at a time. ATU (Allylthiourea) and PTIO (2-phenyl-4, 4, 5, 5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide) have been shown to specifically inhibit AOB and AOA, respectively under specific ranges of concentration. ATU is a copper chelating inhibitor to the active AMO protein (Shen et al. 2013). Low concentrations of ATU have a strong effect on AOB, but higher concentrations of ATU are required for complete inhibition of AOA (Shen et al. 2013; Martens-Habbena et al. 2015). PTIO is a scavenger of nitric oxide

(NO) (Shen et al. 2013). Because NO is an intermediate of ammonia oxidation by AOA, PTIO can be used as an inhibitor for AOA (Walker et al. 2010; Shen et al. 2013). In addition to applying selective inhibitors, DNA stable isotope probing (DNA-SIP) was applied to observe the incorporation of the labeled inorganic carbon ($^{13}\text{C}\text{-HCO}_3^-$) during ammonia oxidation by AOA and AOB in order to imply autotrophic growth character; this technique has previously been successfully used to study AOA and AOB in both natural and engineered environments (Zhang et al. 2012; Niu et al. 2013).

2. Materials and methods

2.1 Nitrifying reactors

Two nitrifying reactors, NRI and NRII, were operated in continuous-feed mode without sludge recycle. The reactors were made from polypropylene and each had an effective volume of 5 L. NRI was seeded with sludge collected from a municipal WWTS (Sonthiphand and Limpiyakorn 2011). Agarose gel check of the PCR products amplified by specific primers targeting AOA and AOB *amoA* genes indicated that AOA and AOB coexisted in the seed sludge. NRI was fed with an inorganic medium containing 28 mgNL^{-1} of ammonia. One liter of the medium contained NH_4Cl , NaCl (1.0 g), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.4 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1 g), KCl (0.5 g), KH_2PO_4 (0.2 g), 2 mL of 1M NaHCO_3 solution, 1 mL of nonchelated trace element mixture, 1 mL of vitamin solution, 1 mL of thiamin solution, 1 mL of vitamin B12 solution, 1 mL selenite-tungstate solution (Widdel et al. 1992). The medium composition was modified from Konneke et al (2005) and Tournia et al (2011). The reactor was operated with a hydraulic retention time (HRT) of 5 days. The seed sludge for NRII was obtained from an industrial WWTP. PCR screening indicated that only AOB, and no AOA, could be detected in the seed sludge. The reactor was supplied with an inorganic medium containing NH_4Cl , NaHCO_3 (1.5 g), Na_2HPO_4 (4.05 g), K_2HPO_4 (2.1 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.05 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.01 g), and $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.09 g) in one liter of the medium

(Rongsayamanont et al. 2010). The ammonia concentration of the medium was 420 mgNL⁻¹ and the reactor was operated with a HRT of 4 days. NRI and NRII were both operated at room temperature, 7.3-7.8 pH, and DO > 2 mgL⁻¹. The reactors were started up in 2012 and had been running for around 3 years before the start of this study. During the 3 years prior to this study, the reactors' effluent ammonia, nitrite, and nitrate concentrations were: 0.09 ± 0.05 mgNL⁻¹, < LOD of 0.1 mgNL⁻¹, and 28.18 ± 4.39 mgNL⁻¹, respectively for NRI; and 15.27 ± 9.03 mgNL⁻¹, 12.26 ± 9.03 mgNL⁻¹, and 370.98 ± 25.35 mgNL⁻¹, respectively for NRII.

2.2 Sample collection and DNA extraction

Sludge samples were collected from NRI and NRII around once per month. Approximately 2 mg dry weight of sludge was transferred to a 1.7-mL tube and centrifuged at 14,000 g for 15-20 min. The supernatant was discarded, and the pellet was used for DNA extraction. For DNA-SIP incubation, 400 mL water samples were filtrated through a 0.2 µm filter paper which was then cut into small pieces. DNA was extracted from the samples using Fast-DNA SPIN kits for soil (QBiogene, USA). DNA extracts were verified by electrophoresis in 2% agarose (Bio-Rad, Spain) and DNA concentrations were determined using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo, USA).

2.3 Qualification of AOA and AOB *amoA* genes and

The primer set for AOA *amoA* genes was Arch-amoAF (5'-STAATGGTCTGGCTTAGACG-3') and Arch-amoAR (5'-GCGGCCATCCATCTGTTGT-3') (Francis et al. 2005). The primer set for AOB *amoA* genes was amoA1F (5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3') and amoA2R (5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3') (Rotthauwe et al. 1997). qPCR was performed using Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo, USA) in a 25 µL volume containing 12.5 µL of the Master Mix (2X), 0.4 µM of each primer and 1 µL of DNA template in Mx3005P instrument (Stratagene, USA). The

qPCR conditions for both primer sets were as follows: 10 min at 95°C, 40 cycles of 30 sec at 95°C, 1 min at 53°C, 30 sec at 72°C, finally followed by data capture at 78°C for 15 sec. DNA standards used were the PCR-amplified products of the pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) containing the *amoA* genes of AOA and AOB from NRI. A standard curve for each gene was prepared from tenfold serial dilutions in the range between 10² and 10⁷ copies. The standard curves showed efficiency in ranges of 94-104 % (R²=0.99) and 94-99% (R²=0.99) for AOA and AOB *amoA* genes, respectively. For each sample, qPCR was performed in at least triplicate. The specificity of qPCR amplification was verified by melting curve analysis and agarose gel electrophoresis.

2.4 Analysis of AOA and AOB *amoA* gene sequences

The AOA *amoA* gene fragment was amplified using the primers CamoA-19f (5'-ATGGTCTGGYTWAGACG-3') and CamoA-616r (5'-GCC ATCCABCKRTANGTC CA -3') (Pester et al. 2012). The AOB *amoA* gene fragment was obtained using the primer set amoA1F and amoA2R (Rotthauwe et al. 1997). The PCR mixture was prepared using a Thermo polymerase (Thermo, USA) and amplified using a thermal cycler (Biorad Laboratories, USA). The PCR condition was 2 min at 94°C, 30–35 cycles of 30 sec at 94°C, 45 sec at 53°C, and 45 sec at 72°C, followed by 10 min of final extension at 72°C. The product was purified using a NucleoSpin Extract II Kit (Clontech Laboratories Inc., USA) and cloned using the pGEM-T Easy vector system (Promega, USA). For each sample, 13-16 clones were randomly selected for sequencing at Macrogen Inc., Korea. The analyzed sequences were calculated for an arrangement of operational taxonomic units (OTUs) based on 99% OTU identity using CD-HIT (Huang et al. 2010). Representative sequences from each OTU and selected reference sequences were aligned and analyzed with neighbor joining calculation using MAGA7 (Kumar et al. 2016).

2.5 Scanning electron microscopy

Sludge samples were prepared for SEM examination by being fixed in 0.1 M PBS with 4% glutaraldehyde overnight at 4°C, separated in half in liquid nitrogen, dehydrated using a series of ethanol solutions, and covered with gold under vacuum condition. The prepared samples were examined using SEM (JEOL, JSM-5410LV, Tokyo, Japan).

2.6 Ammonia-oxidizing activity under the presence of ATU and PTIO

Tests of ammonia-oxidizing activity were created in 250-mL Erlenmeyer flasks containing 70 mgMLSSL⁻¹ of NRI or NRII sludge, 200 mL of the inorganic medium, and 2 mL of HEPES buffer solution (1M HEPES and 0.6M NaOH). The inorganic medium had the initial ammonia concentration of 7 mgNL⁻¹ and the compositions were as described for NRI and NRII. Different concentrations of ATU and PTIO were added to separate treatments. ATU concentrations were 10, 30, 50, 80, 100, 150, 200, 500, 1000, and 2000 µM. PTIO concentrations were 50, 100, and 300 µM. In addition, some treatments prepared with sludge from either reactor were dosed with a mixture of ATU (100 µM) and PTIO (30, 80, 150, and 2000 µM). All treatments including the controls with ATU and the mixture of ATU and PTIO were performed in triplicate sets and the treatments with PTIO were performed in duplicate sets. Flasks were incubated in the dark at room temperature. A liquid sample of each flask was collected for triplicate measurements of ammonia concentration.

2.7 DNA-SIP

DNA-SIP incubation was performed for NRI sludge in continuous-flow reactors with an effective volume of 1 L without sludge recycle. At the start of incubation, sludge was added to the reactors to achieve a MLSS concentration of 70 mgL⁻¹. The reactors were supplied with the inorganic medium as described above for NRI reactor, but ammonia concentration in the medium was modified to 14 mgNL⁻¹. Incubation was performed in separated sets with ¹²C-HCO₃⁻ and ¹³C-HCO₃⁻ as carbon sources in the medium. Flow rate through the reactors was adjusted to achieve a HRT of 5 days. Mixing was provided around

12 hr a day. Other aspects of reactor set-up followed Niu et al (2013). The presence of ^{12}C in the inorganic medium was avoided by using water aerated by CO_2 -free air at $\text{pH} \leq 3$ during medium preparation, then adjusting the medium pH to 7.4-7.8. Aerobic conditions were maintained by aerating the reactors with CO_2 -free air twice a day. The incubation was carried out in the dark and at room temperature. One additional incubation was prepared in the same manner as described above with $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3^-$ as the carbon source, but ATU at the concentration of $80\text{ }\mu\text{M}$ was added to this incubation in order to observe the effect of ATU at this concentration on AOA and AOB.

For all incubations, liquid samples were collected for measurements of ammonia, nitrite, and nitrate concentrations. Sludge samples were taken on day 21 of incubation for downstream analysis. ^{12}C - and ^{13}C -DNA were separated by isopycnic centrifugation in a CsCl gradient solution (Neufeld et al. 2007; Niu et al. 2013). Briefly, extracted DNA samples (2.0 -3.0 mg), CsCl solution (7.163 M) and gradient buffer (0.1M Tris HCl, pH 8.0; 1mM EDTA; 0.1M KCl) were mixed to achieve the initial buoyant density of 1.700 g mL^{-1} . Ultracentrifugation was carried out in 8 ml polyallomer centrifuge tubes using a MLN-80 rotor (Beckman, USA) in Optima MAX-XP (Beckman, USA) at $178,000\times g$ for 72 h at 20°C . Approximately 23 fractions of $250\text{ }\mu\text{L}$ solution were collected from the tube by feeding mineral oil to the top of the tube using a NE-1000 Single Syringe Pump (New Era, USA). Buoyant density of each fraction was measured using an AR200 digital refractometer (Reichert, USA). DNA was recovered by PEG, precipitated by ethanol, and dissolved in 25-30 mL TE buffer. Numbers of AOA and AOB *amoA* genes in each fraction were analyzed by qPCR.

2.8 Measurement of the ammonium, nitrite, and nitrate concentrations

Ammonium concentrations were measured by using salicylate method (Verdouw et al. 1977). Nitrite concentrations were analyzed by colorimetric method (Miranda et al. 2001).

Nitrate was reduced to nitrite by vanadium (III) chloride and measured by using the method indicated for nitrite. The measurement was performed by VICTOR X Plate Reader (PerkinElmer, USA).

3. Results

3.1 Abundance and diversity of AOA and AOB *amoA* genes in nitrifying reactors

During the 14-month study period, ammonia concentration in the effluent of NRI was $0.07 \pm 0.03 \text{ mgNL}^{-1}$. Nitrite concentration in the effluent remained below $< \text{LOD}$ of 0.1 mgNL^{-1} . Nitrate concentration was $26.17 \pm 4.44 \text{ mgNL}^{-1}$, which was in balance with the range of ammonia concentration in the influent. The numbers of AOA *amoA* genes ranged between $5.53 \times 10^2 \pm 9.34 \times 10^1$ and $7.88 \times 10^3 \pm 1.17 \times 10^3$ copies $\text{ng genomic DNA}^{-1}$, while AOB *amoA* genes were between $7.38 \times 10^1 \pm 1.79 \times 10^1$ and $1.16 \times 10^3 \pm 1.39 \times 10^2$ copies $\text{ng genomic DNA}^{-1}$ (Figure 1a). The AOA *amoA* genes were found, on average, to outnumber AOB *amoA* genes 16 times during the study period. Phylogenetic analysis of AOA and AOB *amoA* gene sequences was performed for the samples taken in months 1 and 6 as shown in Figures 2 and 3. All AOA *amoA* gene sequences retrieved from NRI at these sampling times were found to be specific to only the *Nitrososphaera* sister cluster which was a member within the group 1.1b Thaumarchaeota (Figure 2). The results indicated no change in AOA communities between months 1 and 6. AOB *amoA* gene sequences were retrieved from each of month 1 and 6 samples and these sequences were found to belong to 3 AOB clusters: *Nitrosomonas europaea* cluster, *Nitrosomonas communis* cluster, and *Nitrosomonas oligotropha* cluster (Figure 3). The majority of the AOB *amoA* sequences changed from the *Nitrosomonas oligotropha* cluster at month 1 to the *Nitrosomonas europaea* cluster by month 6. SEM images taken at the end of the study (Figure 4) showed that some cells in NRI appeared in clusters as coccoid-shaped cells with a cell diameter of approximately $0.8 \mu\text{m}$, and individual cells as rod-shaped cells with various cell lengths.

During the 7-month study period of NRII, the reactor effluent ammonia concentration was $14.19 \pm 9.54 \text{ mgNL}^{-1}$. The nitrite concentration was $6.24 \pm 6.79 \text{ mgNL}^{-1}$ and the nitrate concentration was $370.12 \pm 26.19 \text{ mgNL}^{-1}$. The summation of ammonia, nitrite, and nitrate concentrations in the effluent water was close to the influent ammonia concentration. AOA *amoA* gene numbers were lower than the LOD (approximately 4.29 copies ng genomic DNA⁻¹) at all sampling intervals (Figure 1b). Also, no AOA *amoA* gene sequence could be retrieved from this reactor (Figure 2). The number of AOB *amoA* genes ranged between $8.76 \times 10^4 \pm 2.08 \times 10^4$ and $3.85 \times 10^5 \pm 6.56 \times 10^4$ copies ng genomic DNA⁻¹. AOB *amoA* gene sequences analyzed for month 1 and 6 samples fell into 3 AOB clusters: *Nitrosomonas europaea* cluster, *Nitrosomonas communis* cluster, and *Nitrosomonas oligotropha* cluster (Figure 3). The *Nitrosomonas europaea* cluster was found to be dominant at these two sampling times. SEM images indicated that most cells appeared in rod shape with various cell lengths (Figure 5).

3.2 Ammonia-oxidizing activity under the presence of ATU and PTIO

Tests of ammonia-oxidizing activity under the presence of ATU was performed on sludge taken from NRI at months 2 and 12 (Figure 6a and Figure SM1a, respectively), and sludge taken from NRII at months 2 and 6 (Figure 6b and Figure SM1b, respectively). For NRII sludge in which AOB was the only detectable ammonia oxidizers, ATU concentrations of $\geq 10 \text{ } \mu\text{M}$ provided complete inhibition of ammonia oxidation (Figure 6b and Figure SM1b). This behavior is different from NRI sludge where AOA were the predominant ammonia oxidizers. For NRI sludge, ATU concentrations of 10-200 μM were found to partially inhibit ammonia-oxidizing activity of the sludge (Figure 6a and Figure SM1a), and complete ammonia oxidizing inhibition occurred at ATU concentrations of 1000 and 2000 μM .

Tests of ammonia-oxidizing activity in the presence of PTIO was performed on both NRI and NRII sludge collected at months 2 and 3, respectively (Figure 6c and 6d). For NRII

sludge, no influence on ammonia-oxidizing activity was found on the three tested PTIO concentrations (Figure 6d). For NRI sludge, PTIO concentrations at 50 and 100 μM showed no inhibition of ammonia oxidation, but for 300 μM , the ammonia-oxidizing activity was partially inhibited (Figure 6c).

Tests of ammonia-oxidizing activity under the presence of an ATU and PTIO mixture was performed on NRI collected at month 2 and NRII sludge collected at month 3 (Figure 7). For NRII sludge, because ATU concentrations of ≥ 10 μM inhibited completely the ammonia-oxidizing activity of the sludge (Figure 6b and Figure SM1b), adding ATU (30, 80, 150, and 2000 μM) together with PTIO (100 μM) (Figure 7a, b, c, and d) showed no different results from when adding ATU at the corresponding concentrations. For NRI sludge where AOA and AOB coexisted, adding ATU (30, 80, 150 μM) together with PTIO (100 μM) completely inhibited the ammonia-oxidizing activity of the sludge, which was different from when adding only either one of ATU or PTIO at the corresponding concentrations which showed partial or no deterioration of the ammonia-oxidizing activity of the sludge (Figure 7a, b, and c).

3.3 Incorporation of $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3^-$ by AOA and AOB during ammonia oxidation of NRI sludge under the absence and presence of ATU

DNA-SIP incubation was performed on NRI sludge collected in month 4. Two DNA-SIP incubations were conducted in parallel with $^{12}\text{C}\text{-HCO}_3^-$ and $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3^-$. Together with the two incubations, an additional DNA-SIP incubation was carried out with $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3^-$ and ATU at the concentration of 80 μM . This third incubation was performed to investigate ATU specificity at this concentration to selectively inhibit AOB, not AOA.

Ammonia, nitrite, and nitrate concentrations were monitored in the effluent water during the 21-day incubation period (Figure S2a). The incubation with $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3^-$ and ATU showed slight higher effluent ammonia concentrations than the incubations with $^{12}\text{C}\text{-HCO}_3^-$

and $^{13}\text{C-HCO}_3^-$ without ATU at the end of incubation period. The numbers of AOA and AOB *amoA* genes were quantified by qPCR during the incubation period (Figure S2b and c). At day 21 of incubation, AOA appeared in high numbers in all three incubations suggesting that AOA can grow and maintained their cells in these continuous-flow reactors, in which cells were allowed to be washed out, and in the presence of 80 μM of ATU. For AOB, *amoA* gene numbers were found in high numbers as a result of incubation with $^{12}\text{C-HCO}_3^-$ and $^{13}\text{C-HCO}_3^-$ without ATU. However, *amoA* gene numbers reduced on day 21 for the incubation with $^{13}\text{C-HCO}_3^-$ and ATU.

Figures 8a and 8b show the DNA-SIP profiles for AOA and AOB *amoA* genes in the incubation without ATU. The AOA *amoA* peak appeared at 1.6961 gmL^{-1} for the $^{12}\text{C-HCO}_3^-$ incubation (day 21). However, the peak moved toward heavier fractions and arose at 1.7114 gmL^{-1} for the $^{13}\text{C-HCO}_3^-$ incubation. For AOB, similar results were observed. The AOB *amoA* gene peak shifted from 1.7070 gmL^{-1} to 1.7234 gmL^{-1} when the incubation changed from $^{12}\text{C-HCO}_3^-$ to $^{13}\text{C-HCO}_3^-$.

AOA and AOB *amoA* genes on day 21 were quantified for each fraction of the $^{13}\text{C-HCO}_3^-$ with 80 μM ATU incubation. The DNA-SIP profile for AOA *amoA* genes is shown in Figure 8c. It should be noted that the profile for AOB *amoA* genes cannot be plotted because AOB *amoA* genes in every fraction were <LOD. This is because AOB cannot maintained high cell numbers in the reactor during the incubation with ATU as suggested in Figure S2c. The DNA-SIP peak for AOA *amoA* genes shifted toward heavier fractions, moving from 1.6961 gmL^{-1} to 1.7114 gmL^{-1} , when switching from the $^{12}\text{C-HCO}_3^-$ incubation to the $^{13}\text{C-HCO}_3^-$ with ATU incubation.

4. Discussion

During the monitoring periods, NRI and NRII were dominated by distinct groups of ammonia-oxidizing microorganisms. AOA *amoA* genes outnumbered AOB *amoA* genes in

NRI, while only AOB *amoA* genes were detected in NRII. NRI and NRII were originally seeded with sludge collected from different WWTPs and were operated with different operating conditions that were believed to encourage the growth of AOA and AOB in different ways. NRI was seeded with sludge containing both AOA and AOB *amoA* genes and was operated with an inorganic medium containing various trace elements and vitamins which was previously used for culturing AOA (Konneke et al. 2005; Tourna et al. 2011). The ammonia and nitrite concentrations in NRI was also maintained in a low range of mgNL⁻¹. Previous studies have used an ammonia concentration of ≤ 7 mgNL⁻¹ as the starting concentration for obtaining AOA cultures from environmental samples (Konneke et al. 2005; Lehtovirta-Morley et al. 2016; Li et al. 2016). The seed sludge and operating conditions in NRI may have attributed to the higher abundance of AOA *amoA* genes than AOB *amoA* genes in NRI. On the other hand, NRII was seeded with sludge from the WWTP where only AOB, and no AOA, was detected. The inorganic medium used in NRII was minimal and the reactor was operated with higher ammonia and nitrite concentrations than NRI. The seed sludge operating conditions in NRII may have helped promote the domination of AOB in NRII.

The phylogenetic analysis revealed that all AOA *amoA* gene sequences retrieved from NRI belonged to the *Nitrososhaera* sister cluster within Group 1.1b *Thaumacheota*. Closely related sequences to the sequences analyzed (with 98-99% sequence identities) were found in nitrifying reactors in our previous work (Sonthiphand and Limpiyakorn 2011). Presently, *Candidatus Nitrosocosmicus franklandus* and *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare*, obtained from soil and a WWTP, respectively, are known as the two representatives for the *Nitrososhaera* sister cluster (Lehtovirta-Morley et al. 2016; Sauder et al. 2017). The AOA *amoA* gene sequences from our current study have a sequence identity of 90-95% to *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare* and 89-91% to *Candidatus Nitrosocosmicus*

franklandus. Scanning electron micrographs revealed that some cells from NRI were coccoidal with cell diameters of around 0.8 μm and that these cells tended to clump together. Similar types of cell morphology and formation have been reported for *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare*, but with a larger cell diameter of 1.3 μm (Sauder et al., 2017). However, applying SEM to mixed culture systems is not possible to indicate that the coccoid cells appeared related to AOA. AOB *amoA* gene sequences found in NRI and NRII belonged to the *Nitrosomonas europaea* cluster, *Nitrosomonas communis* cluster, and *Nitrosomonas oligotropha* cluster. Previously, AOB within these three clusters have been found in WWTPs and nitrifying reactors (Limpiyakorn et al. 2011; Sonthiphand et al. 2011; Gao et al. 2013).

ATU and PTIO were introduced in order to distinguish the ammonia-oxidizing activity of AOA and AOB in the NRI and NRII sludge. Because AOB were the major ammonia-oxidizing microorganisms in NRII, the ammonia-oxidizing activity of the sludge should be driven mainly by AOB. This was confirmed by the addition of ATU to the NRII sludge where the sludge's ammonia-oxidizing activity was completely inhibited at ATU concentrations of $\geq 10 \mu\text{M}$. The similar range of ATU concentrations has previously been reported to completely inhibit AOB in pure culture systems. For example, Martens-Habbena et al (2015) reported that the activity of *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosomonas oligotropha*, *Nitrosomonas ureae*, *Nitrosomonas cryotolerans*, and *Nitrospira multiformis* can be completely inhibited at ATU concentrations of $> 3.3 \mu\text{M}$.

The ammonia-oxidizing ability of AOA is only slightly affected at the range of ATU concentrations that was reported to fully inhibit most AOB ammonia-oxidizing ability. ATU concentrations of $< 100 \mu\text{M}$ were reported to show no effect on the growth and activity of two AOA strains originated from WWTS samples: *Candidatus Nitrosotenuis cloacae* and *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare*, respectively (Li et al. 2016 and Sauder et al. 2017). In order to completely inhibit AOA, much higher ATU concentrations is required as compared

to AOB. For example, *Candidatus Nitrosotenuis cloacae* and *Nitrosopumilus maritimus* strain HCA1 were completely inhibited at ATU concentrations of 700 and 1000 μM , respectively (Martens-Habbena et al. 2015; Li et al. 2016). By applying various concentrations of ATU to NRI sludge, our results demonstrated that the ammonia-oxidizing activity of the sludge was inhibited completely at ATU concentrations $>500 \mu\text{M}$. Because AOA were the predominant ammonia-oxidizing microorganisms in the NRI sludge, it can be implied that ATU concentrations $>500 \mu\text{M}$ can completely inhibit the ammonia-oxidizing activity of AOA. This result agrees with previous studies (Martens-Habbena et al. 2015; Li et al. 2016). In addition, ATU concentrations between 10 and 200 μM were found to partially inhibit the ammonia-oxidizing activity of NRI sludge. Therefore, this lower range of ATU concentrations may be useful for observing the activity of AOA since the activity of AOB will cease within this ATU concentration range.

In our study, the application of PTIO at concentrations of 50, 100, and 300 μM to NRII sludge showed no inhibitory effects on the ammonia-oxidizing activity of the sludge. Previously, Martens-Habbena et al (2015) demonstrated that the ammonia-oxidizing activities of *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosomonas oligotropha*, *Nitrosomonas ureae*, *Nitrosomonas cryotolerans*, and *Nitrospira multiformis* were unaffected by PTIO at the concentration of 100 μM . Our results confirm that AOB played the main role in the ammonia-oxidizing activity of NRII.

In contrast to AOB, AOA were found to be sensitive to PTIO. In a previous study, the activity of *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare* was completely inhibited at PTIO concentrations of 100 μM (Sauder et al. 2017). PTIO at the concentration of 100 μM was also found to nearly completely inhibit *Nitrosopumilus maritimus* strain HCA1 and strain SCM1 (Martens-Habbena et al. 2015). Moreover, *Nitrososphaera viennensis* was completely inhibited at $\geq 50 \mu\text{M}$ PTIO (Shen et al. 2013). When PTIO was introduced to NRI sludge, the

ammonia-oxidizing activity of the sludge was uninhibited at the PTIO concentrations of 50 and 100 μM , and was only partially inhibited at the concentration of 300 μM . Because AOB were also present in NRI sludge, the addition of PTIO alone cannot lead to the complete inhibition of the ammonia-oxidizing activity of the sludge. Therefore, ATU concentrations of 30, 80, 150 and 2000 μM were also applied together with 100 μM PTIO to NRI sludge. Results from the addition of both chemical inhibitors demonstrated complete inhibition of ammonia-oxidizing activity at all ATU concentrations when 100 μM of PTIO was present. This indicated that PTIO at the concentration of 100 μM completely inhibited the ammonia-oxidizing activity of AOA in NRI sludge since ATU concentrations of ≥ 10 μM were already shown to completely inhibit AOB. Regarding the contribution of AOA and AOB to ammonia oxidation in NRI, the results indicated that AOA contributed to the ammonia-oxidizing activity of the sludge as the activity still remained after adding ATU alone (30, 80, 150 μM) to the sludge and the overall activity disappeared after PTIO (100 μM) was added together with ATU (30, 80, 150 μM).

DNA-SIP was carried out on the NRI sludge and results demonstrated that AOA and AOB in the sludge incorporated the labelled ^{13}C compound into their *amoA* genes. This implies that AOA and AOB in NRI probably utilized inorganic carbons for cell synthesis during ammonia oxidation, and thus they may perform chemolithoautotrophy as a choice of their life. However, it must be noted that the downstream analysis was performed after 21 days of DNA-SIP incubation; therefore, the assimilation of the labelled ^{13}C caused by cross feeding can be possible. Nonetheless, the results from the 14-month monitoring supported that AOA and AOB in NRI should perform autotrophic ammonia oxidation because they were able to maintain their cells in NRI for a few years under conditions where ammonia was the only energy source and the media contained no organic. *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare*, which was found to relate closely to the AOA in NRI, was previously reported to

consume bicarbonate while oxidizing ammonia, but some organic compounds can also stimulate its growth (Sauder et al. 2017). The other AOA which originated from a WWTP, *Candidatus Nitrosotenuis cloacae*, was also found to perform autotrophic ammonia oxidation (Li et al. 2016).

DNA-SIP was also performed on NRI sludge with the addition of 80 μ M of ATU to confirm the effects of ATU at this concentration on AOA and AOB growth. AOB were washed out from the DNA-SIP incubation reactor in this trial, indicating that this concentration of ATU does deteriorate AOB growth. This result agrees with the above-mentioned inhibition study. Conversely, AOA were found to be unaffected by the presence of 80 μ M ATU as they were found to still incorporate the labelled ^{13}C compound into their *amoA* genes during ammonia oxidation. These results confirmed that ATU at this concentration can be applied to observe AOA activity in NRI sludge. These results also reinforce the results of the inhibition experiments that AOA also contributed to ammonia oxidation in NRI.

5. Conclusion

AOA and AOB can be maintained for long periods and they both contribute to ammonia oxidation in nitrifying reactors. Both microorganisms incorporate inorganic carbons during ammonia oxidation, leading to the possibility of performing autotrophy as a choice of their life.

6. Acknowledgements

The authors are deeply grateful of the Thailand Research Fund (grant no. RSA5780096) and the 90th Anniversary of the Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund) for their financial support of the work.

7. References

Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, Forterre P (2008) Mesophilic crenarchaeota:

proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. Nat Rev Microbiol 6:245-252

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

Gao Jing-Feng, Luo X, Wu Gui-Xia, Li T, Peng Yong-Zhen (2013) Quantitative analyses of the composition and abundance of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in eight full-scale biological wastewater treatment plants. Bioresour Technol 138: 285–296

Gao Jing-Feng, Luo X, Wu Gui-Xia, Li T, Peng Yong-Zhen (2014) Abundance and diversity based on amoA gene of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in ten wastewater treatment systems. Appl Microbiol Biotechnol 98:3339–3354

Huang Y, Niu BF, Gao Y, Fu LM, Li WZ (2010) CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. Bioinformatics 26:680-682

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

Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol 33:1870-1874

Lehtovirta-Morley LE et al. (2016) Isolation of '*Candidatus Nitrosocosmicus franklandus*', a novel ureolytic soil archaeal ammonia oxidiser with tolerance to high ammonia concentration. FEMS Microbiol Ecol 92 doi:10.1093/femsec/fiw057

Li YY, Ding K, Wen XH, Zhang B, Shen B, Yang YF (2016) A novel ammonia-oxidizing archaeon from wastewater treatment plant: Its enrichment, physiological and genomic characteristics. Sci Rep 6:11 doi:10.1038/srep23747

Limpiyakorn T, Sonthiphand P, Rongsayamanont C, Polprasert C (2011) Abundance of

amoA genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in activated sludge of full-scale wastewater treatment plants. *Bioresour Technol* 102:3694-3701

Martens-Habbena W et al. (2015) The production of nitric oxide by marine ammonia-oxidizing archaea and inhibition of archaeal ammonia oxidation by a nitric oxide scavenger. *Environ Microbiol* 17:2261-2274

Miranda KM, Espey MG, Wink DA (2001) A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5:62-71

Mußmann M et al (2011) Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express *amoA* but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers. *Proc Natl Acad Sci* 108:16771-16776

Neufeld JD, Vohra J, Dumont MG, Lueders T, Manefield M, Friedrich MW, Murrell JC (2007) DNA stable-isotope probing. *Nat Protoc* 4:860-866

Niu J, Kasuga I, Kurisu F, Furumai H, Shigeeda T (2013) Evaluation of autotrophic growth of ammonia-oxidizers associated with granular activated carbon used for drinking water purification by DNA-stable isotope probing. *Water Res* 47:7053-7065

Park HD, Wells GF, Bae H, Griddle CS, Francis CA (2006) Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Appl Environ Microbiol* 72:5643-5647

Pester M et al. (2012) *amoA*-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of *amoA* genes from soils of four different geographic regions *Environ Microbiol* 14:525-539

Rongsayamanont C, Limpiyakorn T, Law B, Khan E (2010) Relationship between respirometric activity and community of entrapped nitrifying bacteria: Implications for partial nitrification. *Enzyme Microb Technol* 46:229-236

472 Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W (1997) The ammonia monooxygenase structural gene
 473 *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-
 474 oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol* 63:4704–4712

475 Sauder LA, Albertsen M, Engel K, Schwarz J, Nielsen PH, Wagner M, Neufeld JD (2017)
 476 Cultivation and characterization of *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare*, an
 477 ammonia-oxidizing archaeon from a municipal wastewater treatment system. *ISME J*
 478 11:1142-1157

479 Shen TL, Stieglmeier M, Dai JL, Urich T, Schleper C (2013) Responses of the terrestrial
 480 ammonia-oxidizing archaeon *Ca. Nitrososphaera viennensis* and the ammonia-
 481 oxidizing bacterium *Nitrospira multiformis* to nitrification inhibitors. *FEMS*
 482 *Microbiol Lett* 344:121-129

483 Sinthusith N et al (2015) Identification and quantification of bacteria and archaea responsible
 484 for ammonia oxidation in different activated sludge of full-scale wastewater treatment
 485 plants. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 50:169–175

486 Sonthiphand P, Limpiyakorn T (2011) Change in ammonia-oxidizing microorganisms in
 487 enriched nitrifying activated sludge. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:843-853

488 Tourna M et al (2010) *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from
 489 soil. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:8420–8425

490 Verdouw H, Van Echteld CJA, Dekkers EMJ (1978) Ammonia determination based on
 491 indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res* 12:399–402

492 Walker CB et al. (2010) *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for
 493 nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proc Natl*
 494 *Acad Sci* 107:8818-8823

495 Widdel F, Bak F. (1992). Gram-negative mesophilic sulfate reducing bacteria. In: Balows A,
 496 Trüper HG (eds). *The Prokaryotes*, 2nd edn, vol. IV. New York, NY, USA:

497 Springer, pp 352–3378

498 Zhang LM, Hu HW, Shen JP, He JZ (2012) Ammonia-oxidizing archaea have more
499 important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly
500 acidic soils. ISME J 6:1032-1045

501 Zhang Y, Chen LJ, Sun RH, Dai TJ, Tian JP, Wen DH (2015) Ammonia-oxidizing bacteria
502 and archaea in wastewater treatment plant sludge and nearby coastal sediment in an
503 industrial area in China. Appl Microbiol Biotechnol 99:4495–4507

Unfinished draft

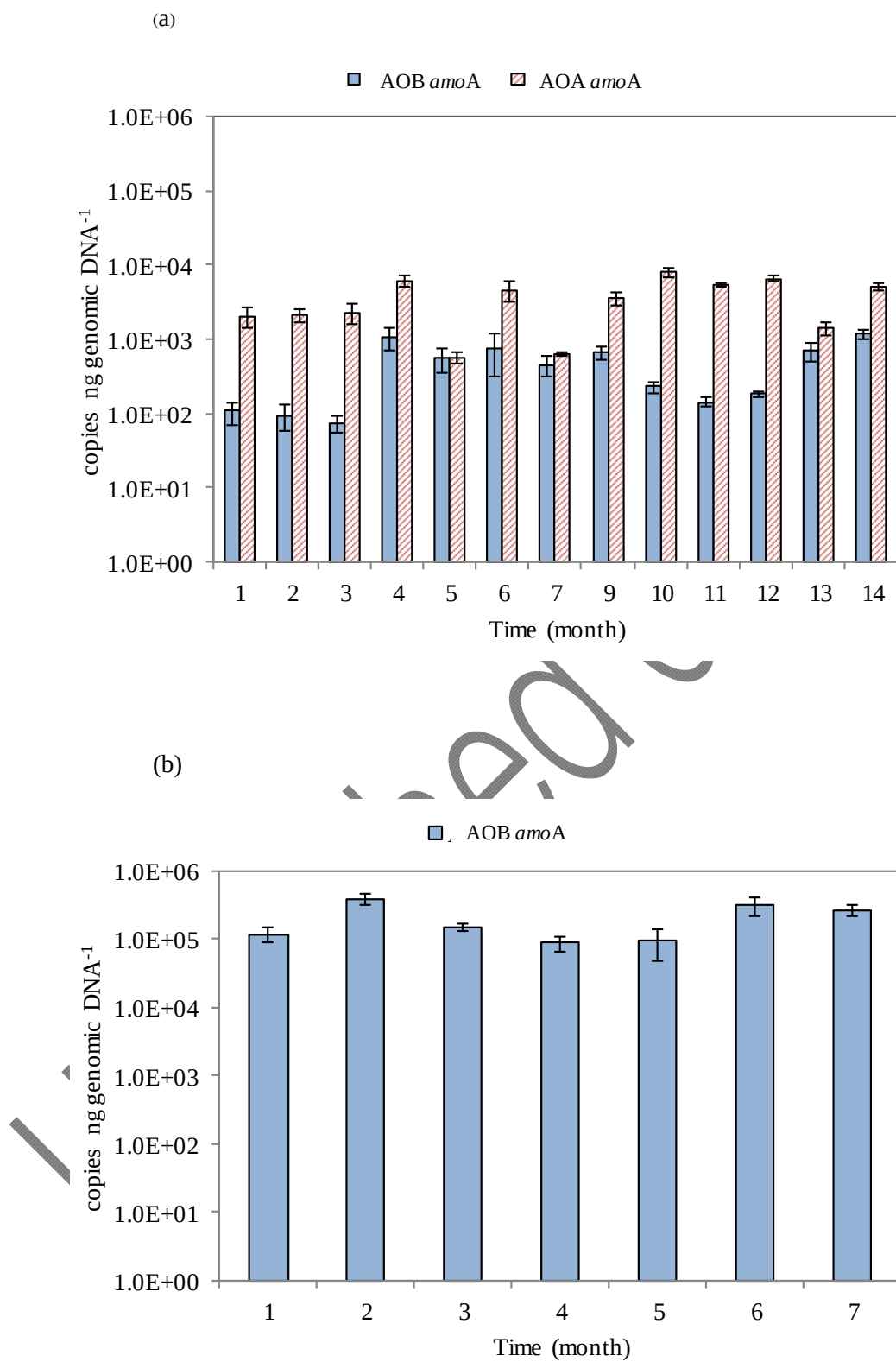


Figure 1 Abundance of AOB and AOA *amoA* genes in a) NRI and b) NRII

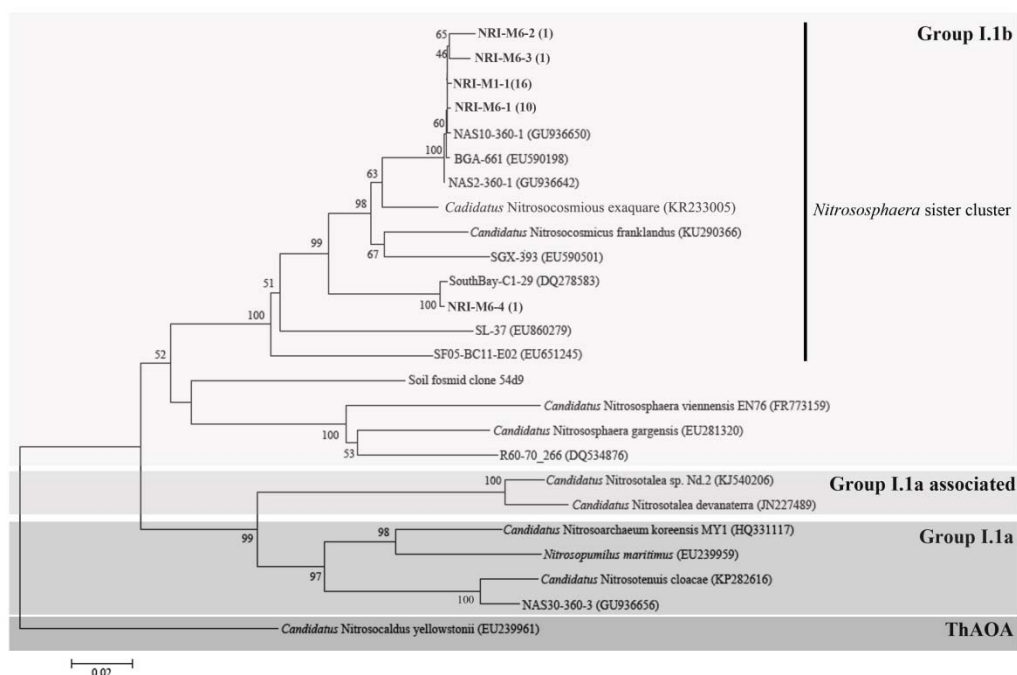


Figure 2 Phylogenetic tree calculated based on sequences of AOA *amoA* genes. The sequences from this study are shown in bold. The first and second abbreviations represent from which reactor and at which months during incubation the samples were collected. Bootstrap analysis was performed with 1000 replicates and values of >50 % are shown.

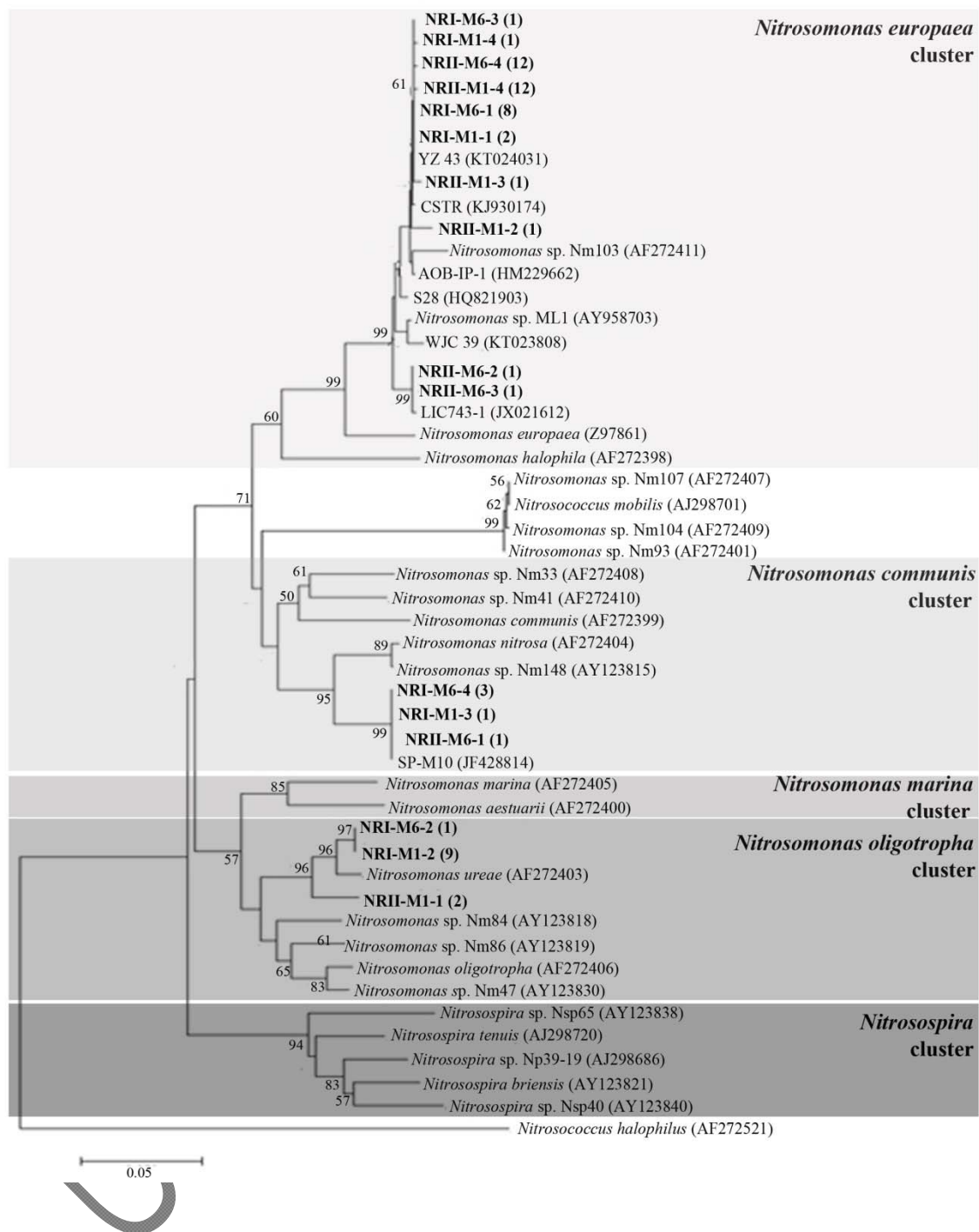


Figure 3 Phylogenetic tree calculated based on sequences of AOB *amoA* genes. The sequences from this study are shown in bold. The first and second abbreviations represent from which reactor and at which months during incubation the samples were collected. Bootstrap analysis was performed with 1000 replicates and values of >50 % are shown.

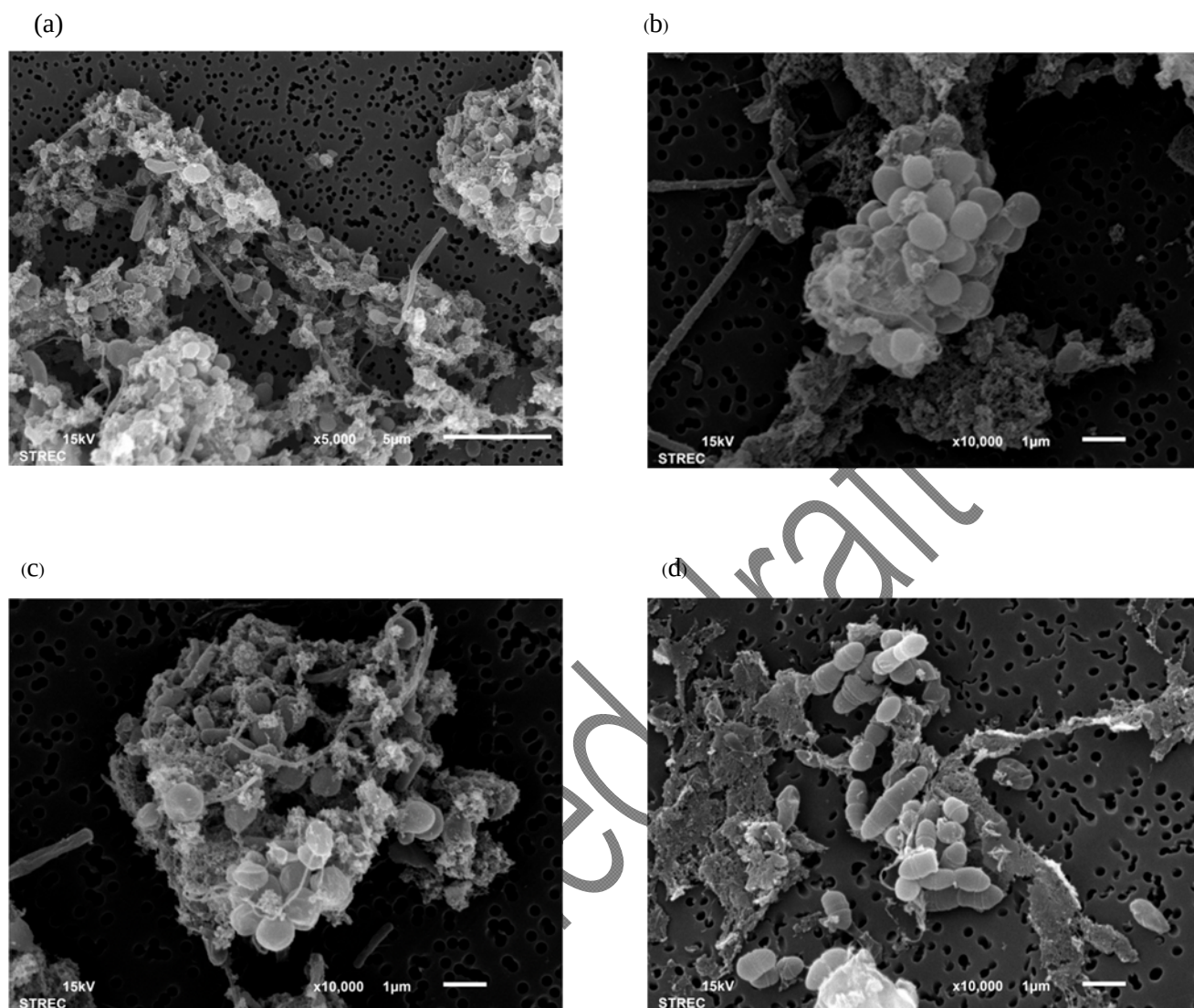


Figure 4 Scanning electron micrograph images of NRI (a) scale bar 5 μM . (b-d) scale bar 1 μM

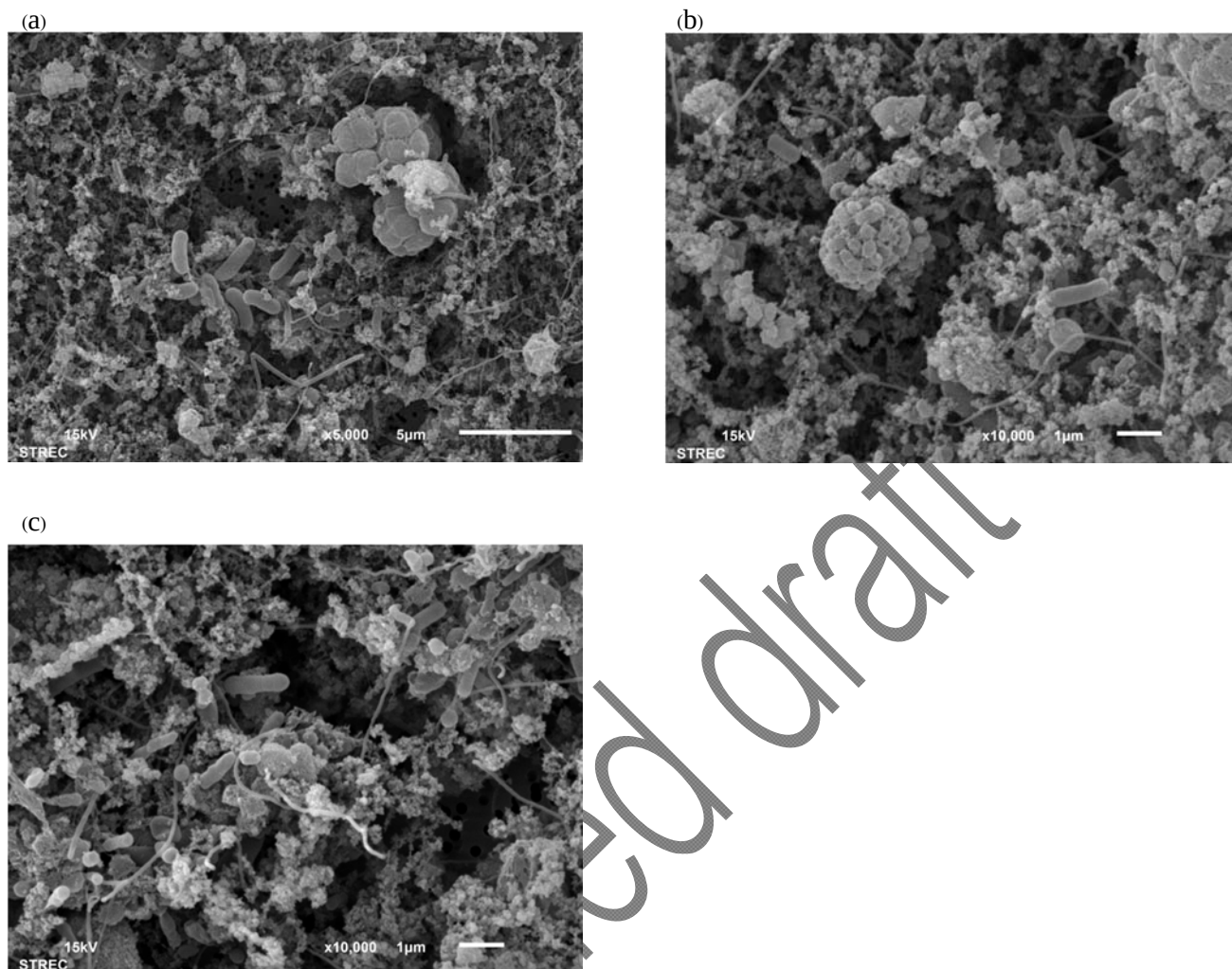


Figure 5 Scanning electron micrograph images of NRII (a) scale bar 5 μM . (b-c) scale bar 1 μM

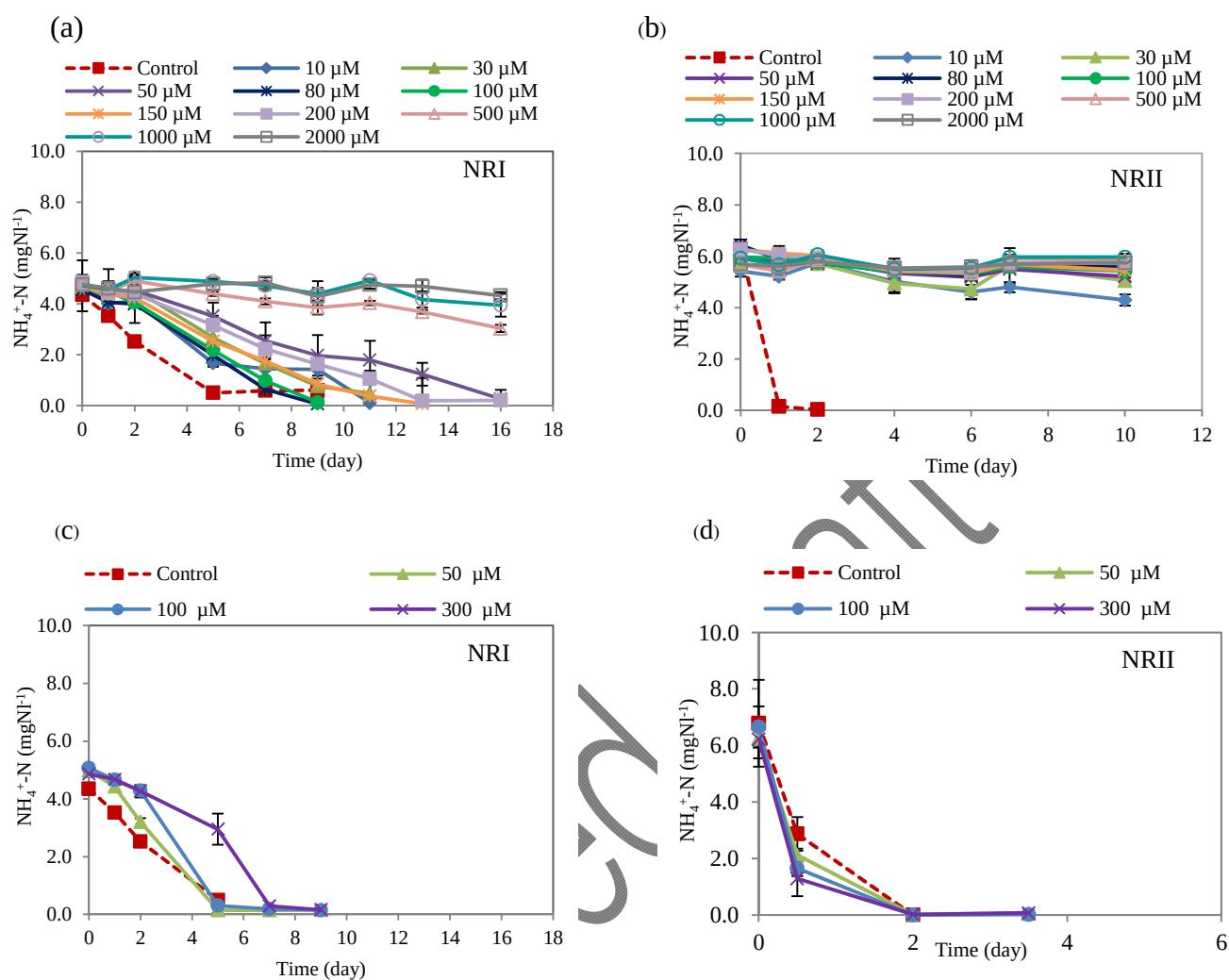
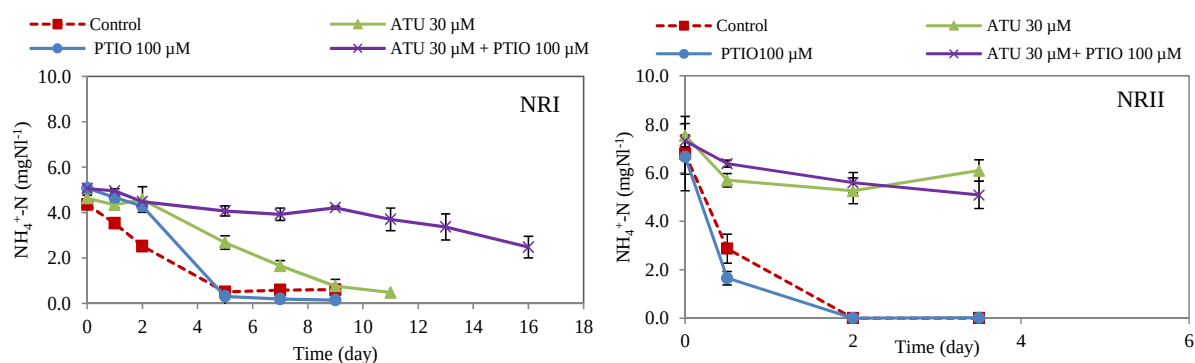
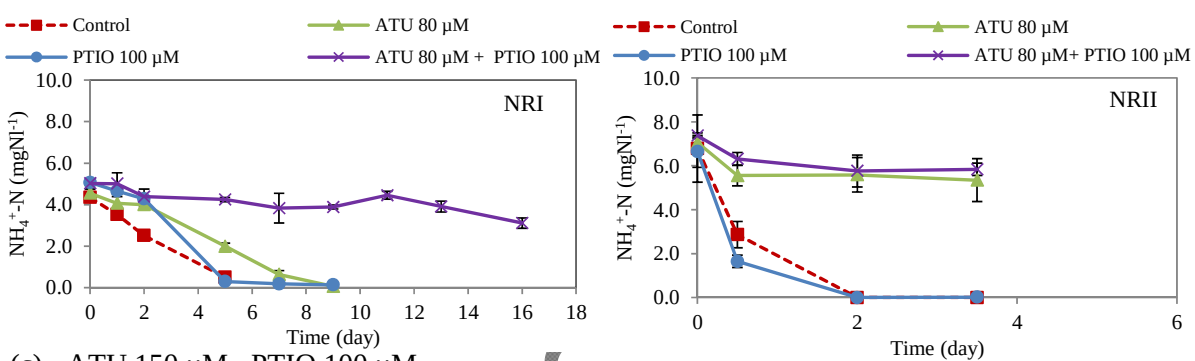


Figure 6 Change in ammonia concentrations under the presence of (a) ATU for NRI collected in month 2, (b) ATU for NRII collected in month 2, (c) PTIO for NRI collected in month 2, and (d) PTIO for NRII collected in month 3

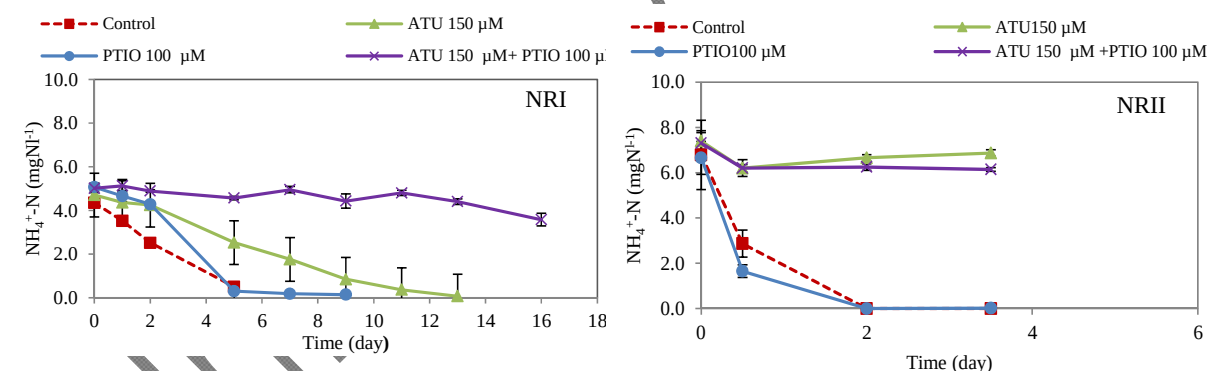
(a) ATU 30 μM + PTIO 100 μM



(b) ATU 80 μM + PTIO 100 μM



(c) ATU 150 μM + PTIO 100 μM



(d) ATU 2000 μM + PTIO 100 μM

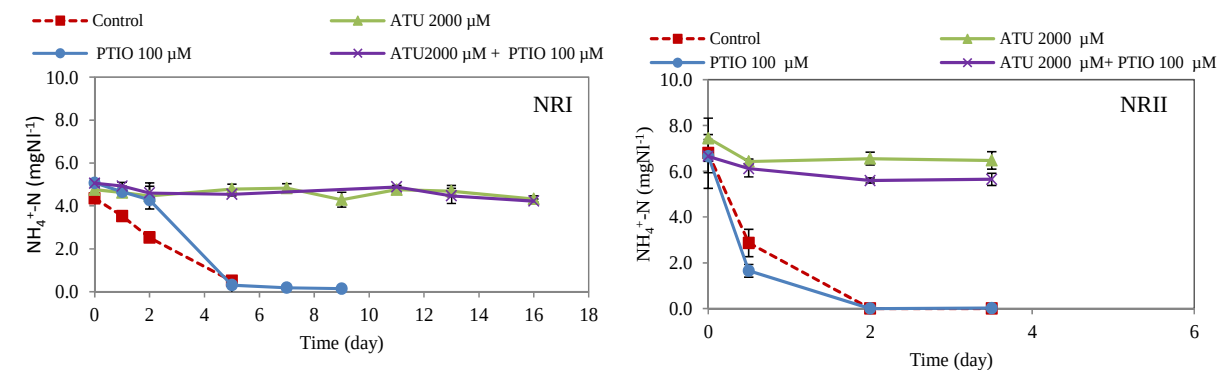


Figure 7 Change in ammonia concentrations under the presence of a mixture of different concentrations of ATU and a consistent concentration of PTIO for NRI and NR II collected in month 2 and 3, respectively.

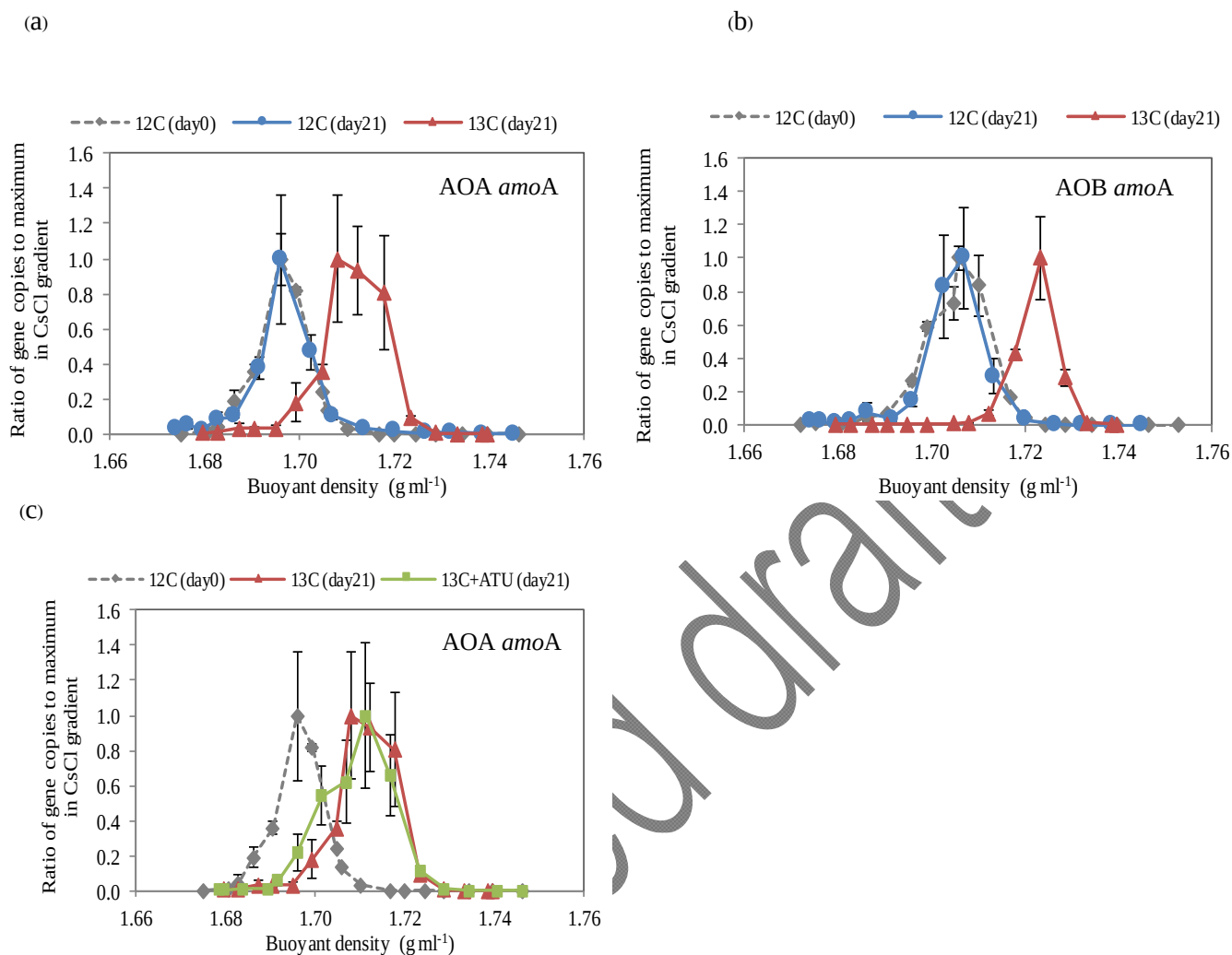


Figure 8 Change in the distribution pattern of (a) AOA *amoA* gene, (b) AOB *amoA* gene under the absence of ATU, and (c) AOA *amoA* gene under the presence of 80 μM of ATU for NRI collected in month 4.

Supplementary material

Contribution of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria to ammonia oxidation in nitrifying reactors

Papitchaya Srithetp^{1,2}, Preeyaporn Pornkulwat³, Tawan Limpiyakorn^{2,3*}

¹International Programs in Hazardous Substances and Environmental Management, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

²Center of Excellence on Hazardous Substance Management (HSM), Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

³Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

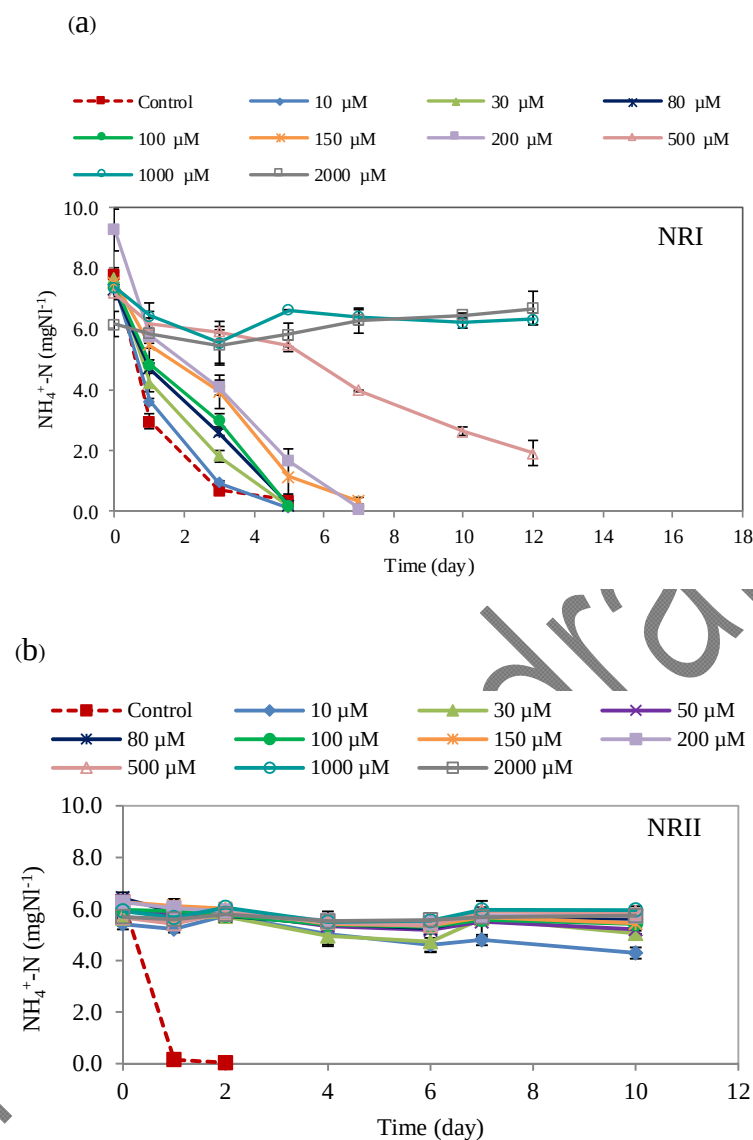


Figure S1 Change in ammonia concentrations under the presence of ATU for (a) NRI collected in month 12 (Only for this test of ammonia-oxidizing activity, ammonia concentration measurement for each flask was performed with no replicate) and (b) NR11 collected in month 6

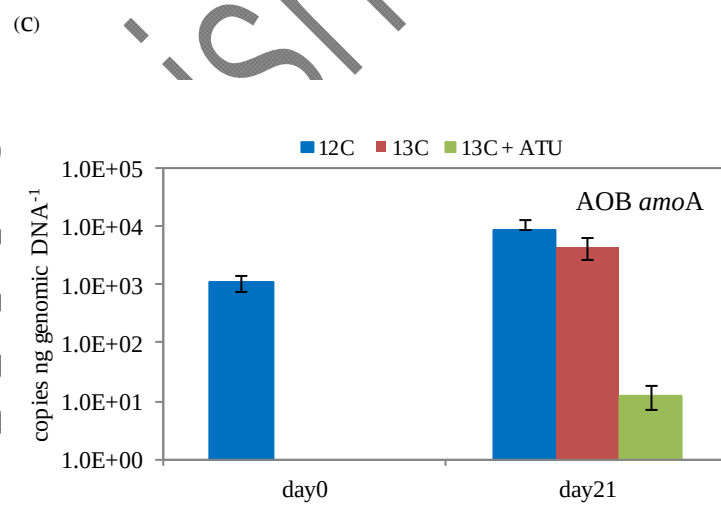
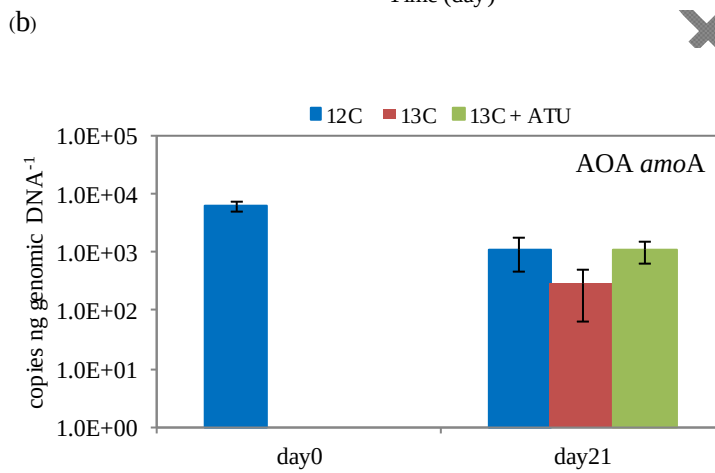
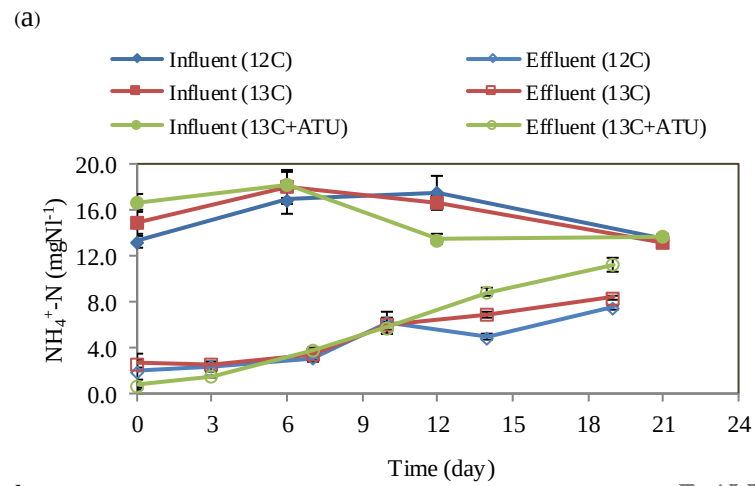


Figure S2 Change in (a) ammonia concentrations, (b) numbers of AOA *amoA* genes, and (c) numbers of AOB *amoA* genes during DNA-SIP incubation of NRI collected in month 4.

(Draft)

(Unfinished)

**Incorporation of $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3^-$ by ammonia-oxidizing archaea and bacteria during
ammonia oxidation of sludge from a municipal wastewater treatment plant**

Preeyaporn Pornkulwat¹, Suwat Soonglerdsongpha², Pathan Banjongproo³, Papitchaya
Srithep^{4,5}, Tawan Limpiyakorn^{1,4*}

¹Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn
University, Bangkok, Thailand

²Environmental Research and Management Department, PTT Research and Technology
Institute, Ayutthaya, Thailand

³Water Quality Management Office, Drainage and Sewerage Department, Bangkok
Metropolitan Administration, Bangkok, Thailand

⁴Center of Excellence on Hazardous Substance Management (HSM), Chulalongkorn
University, Bangkok, Thailand

⁵International Programs in Hazardous Substances and Environmental Management, Graduate
School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

*Corresponding author	name:	Tawan Limpiyakorn
	address:	Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand
	phone:	+66-2-218-6667

26

fax: +66-2-218-6666

27

e-mail: tawan.l@chula.ac.th

28

Unfinished draft

Abstract

Ammonia-oxidizing archaea (AOA) have recently been proposed as potential players for ammonia removal in wastewater treatment plants (WWTPs). However, there is very few evidence directly showing the contribution of AOA to ammonia oxidation in this engineering system. In this study, DNA-stable isotope probing (DNA-SIP) with the labeled $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3^-$ was introduced to sludge from a municipal WWTP. Quantitative PCR demonstrated that AOA *amoA* genes outnumbered AOB *amoA* genes in the sludge from this WWTP along the study period. AOA *amoA* gene sequence analysis revealed that AOA in this WWTP were specific to one subcluster within the group 1.1b Thaumarchaeota. When ammonia was supplied to DNA-SIP incubation, the DNA-SIP profiles showed the incorporation of the $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3^-$ into AOA and AOB *amoA* genes. However, the $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3^-$ was not found to be assimilated into both microorganisms' *amoA* genes in the incubation without ammonia. The results suggested that AOA belonging to this subcluster of the group 1.1b Thaumarchaeota utilized inorganic carbon for cell synthesis during ammonia oxidation indicating their role in ammonia removal in the WWTP.

Keywords

ammonia-oxidizing archaea; ammonia-oxidizing bacteria; autotrophic growth; DNA-stable isotope probing (DNA-SIP); wastewater treatment plant

1 Introduction

Ammonia-oxidizing microorganisms in wastewater treatment plants (WWTPs) are more phylogenetically diverse than previously expected. Apart from well-known ammonia-oxidizing bacteria (AOB), ammonia-oxidizing archaea (AOA) are now being considered as the other potential contributors to ammonia removal in WWTPs. The discovery of AOA marker genes in WWTPs worldwide, including North America, Europe, and Asia, has demonstrated the wide distribution of these microorganisms in WWTPs (Park et al. 2006;

Wells et al. 2009; Limpiyakorn et al. 2011; Mußmann et al. 2011; Yapsakli et al. 2011; Zhang et al. 2011; Bai et al. 2012; Sauder et al. 2012; Gao et al. 2013; Wu et al. 2013; Gao et al. 2014; Sinthusith et al. 2015; Li et al. 2016; Sauder et al. 2017). Quantitative analyses revealed the relatively higher numbers of AOA *amoA* genes than AOB *amoA* genes in some studies (Limpiyakorn et al. 2011; Mußmann et al. 2011; Bai et al. 2012; Sauder et al. 2012; Wu et al. 2013; Sinthusith et al. 2015; Zhang et al. 2015), though in some plants AOB *amoA* genes outnumbered AOA *amoA* genes (Wells et al., 2009; Yapsakli et al., 2011; Gao et al., 2013; Gao et al., 2014). The abundance of AOA *amoA* genes in some of the plants studied does not imply that AOA involved in ammonia oxidation in those plants. This has been suggested by some studies with natural environmental samples that AOA were not necessary to be functionally significant for ammonia oxidation despite their *amoA* genes were more dominant than AOB *amoA* genes (Jia and Conrad 2009). As a result, direct evidence showing the contribution of AOA to ammonia oxidation in WWTPs is required to clarify this doubt.

According to literatures available thus far, only two AOA culture and one *in situ* activity investigation studies have been available for WWTP AOA. The strain SAT1 was obtained from a WWTP in China (Li et al.2016). They affiliated with group 1.1a Thaumarcheota and were found to perform autotrophic ammonia oxidation. *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare*, belonging to *Nitrososphaera* sister cluster within the group 1.1b Thaumarcheota was cultivated from a municipal WWTP in Canada (Sauder et al.2017). These AOA performed autotrophic ammonia oxidation and their activity and growth can be stimulated by some organic compounds. An *in situ* activity study in a refinery WWTP in England showed that AOA of a single OTU affiliated within the group 1.1b Thaumarcheota had a non-autotrophic lifestyle suspecting that not all members of the phylum Thaumarcheota, which are generally found to contain *amo* genes, are ammonia oxidizers (Mußmann et al. 2011). With the currently information, the conclusion to the contribution of

AOA to ammonia removal in WWTPs has yet been drawn, due to the contradictory among them. In addition, AOA present in WWTPs worldwide are found to be diverse belonging to various groups within the Thaumarchaeota phylum (Limpiyakorn et al., 2013) and different AOA groups may maintain life through different routes as suggested by a few culture studies (Könneke et al. 2005; de la Torre et al. 2008; Hatzenpichler et al. 2008; Martens-Habbena et al 2009; Lehtovirta-Morley et al. 2011; Tourna et al. 2011; Li et al. 2016; Sauder et al.2017).

This study provides direct evidence indicating *in situ* activity of AOA and AOB in sludge from a full-scale municipal WWTP. It is hypothesized that AOA and AOB found to be abundant in this WWTP perform autotrophic ammonia oxidation. Therefore, DNA stable isotope probing (DNA-SIP) with the labelled $^{13}\text{C-HCO}_3^-$ was applied to the sludge from this WWTP.

2 Materials and methods

2.1 Description of a wastewater treatment plant

Samples were taken from an activated sludge process of a full-scale municipal WWTP in Bangkok, Thailand. During the study period, the plant received influent with biological oxygen demand (BOD) and ammonia concentrations of 35.6-37.3 mg L⁻¹ and 10.6-11.8 mgN L⁻¹, respectively. The plant's final effluent contained BOD and ammonia concentrations of 4.0-5.1 mg L⁻¹ and 0.1-0.2 mgN L⁻¹, respectively. Hydraulic retention time of the activated sludge system was in a range of 10-17 hr and its solid retention time was between 34 and 50 days. Samples were collected from aeration basins of the activated sludge system and kept on ice during transportation to the laboratory. Immediately after arriving the laboratory, DNA-SIP incubation was conducted with the sludge samples. DNA was extracted from 2 mg dry weight of sludge using the Fast-DNA SPIN kit for soil (QBiogenes, USA). Extracted DNA was stored at -80°C until further analyses.

2.2 Quantification of AOA and AOB *amoA* genes

Numbers of AOA and AOB *amoA* genes were quantified using quantitative PCR analysis with Maxima SYBR Green/ROX QPCR Master Mix (Fermentas, USA) in Mx3005P instrument (Stratagene, USA). AOA *amoA* genes were enumerated using the primers Arch-*amoA*F and Arch-*amoA*R (Francis et al., 2005). The quantification of the AOB *amoA* genes was performed using the primers *amoA*1F and *amoA*2R (Rotthauwe et al., 1997). Standard curves of AOA *amoA* gene were prepared with the PCR product obtained from clone possessing *amoA* gene fragment. Standard curves for AOB *amoA* genes were prepared in the same manner. Melting curves were run together with agarose gel electrophoresis of final quantitative PCR products to ensure quantitative PCR quality of all samples after quantitative PCR run.

2.4 Phylogenetic analysis of AOA *amoA* gene sequences

The fragments of AOA *amoA* genes were amplified with the primers CrenamoA23f and Crenamo A616r (Pester et al., 2012) using a Takara polymerase (Takara Bio Inc., Japan) in a thermal cycler (Biorad Laboratories, USA). The PCR amplified products were purified by a NucleoSpin Extract II Kit (Clontech Laboratories Inc., USA) and were cloned using the pGEM-T Easy vector system (Promega, USA). Clones were randomly selected for sequencing at Macrogen Inc., Korea. The obtained sequences were analyzed for an arrangement of operational taxonomic units (OTUs) using CD-HIT (Huang et al. 2010). The representative sequences of the OTUs together with sequences of AOA cultures and sequences related closely to the representative sequences, which were obtained from Genbank, were aligned and computed for phylogenetic analysis using MEGA7 (Kumar et al. 2016). A neighbor-joining tree was constructed with the Maximum Composite Likelihood model and a Bootstrap value of 1000 replications.

2.3 DNA-stable isotope probing

DNA-SIP was performed with sludge taken from the plant in three different occasions within three month period. Two sets were carried out (WWTP sludge I and WWTP sludge II) with inorganic medium containing an ammonia concentration of 7 mg-N/L, and the other set (WWTP sludge III) was done with no ammonia supplied in the medium.

The incubation was prepared in continuous-flow reactors with an effective volume of one liter with no sludge recycled. Sludge was transferred into a reactor. The influent inorganic medium (per liter) contained NH_4Cl , NaCl (1.0 g), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.4 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1 g), KCl (0.5 g), KH_2PO_4 (0.2 g), 2 mL of 1M NaHCO_3 solution, 1 mL of nonchelated trace element mixture, 1 mL of vitamin solution, 1 mL of thiamin solution, 1 mL of vitamin B12 solution, 1 mL selenite-tungstate solution (Widdel et al. 1992). The pH was adjusted to 7.2–7.8 using NaOH . The medium was supposed to support AOA growth as it was modified from previous AOA culture studies. Before preparing the medium, pH of deionized water was adjusted to three and air zero (without CO_2) was purged to remove natural ^{12}C in the deionized water. For each set, the incubation was carried out using two separated reactors with unlabeled $\text{H}^{12}\text{CO}_3^-$ and labeled $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$. HCO_3^- was provided at a concentration of 1mM to ensure sufficient carbon source for cell growth. For reactor operation, HRT was kept at 4 days. Mixing was provided for 8 hours a day to avoid high sludge wasting from the reactors. Before air zero was purged to provide aeration, dissolve oxygen concentrations in the reactors were monitored and were found to be $> 2 \text{ mg L}^{-1}$ confirming aerobic condition in all reactors at the end of each aeration cycle. During the incubation period, ammonia, nitrite and nitrate concentrations were monitored. Sludge samples from the reactors were collected once a week for downstream analysis.

DNA was extracted from the sludge samples using the protocol previously mentioned. The heavy and light DNA was separated using isopycnic centrifugation in a CsCl solution (Niu et al., 2013). Extracted DNA was mixed with a 7.163 M CsCl and gradient buffer to

meet the initial buoyant density of 1.70 g mL⁻¹. The ultracentrifugation was performed in a polyallomer centrifuge tube containing 6 mL of mixing solution and filled the space with mineral oil. MLN-80 rotor was used to separate DNA at 178,000xg for 72 hr. at 20°C. Approximately twenty-five fractions of an equal volume of 250 µL were collected by replacing the mineral oil from the top of the tube. Buoyant density of each fraction was measured by an AR200 digital refractometer (Reichert, USA). DNA precipitation was performed with glycogen and polyethylene glycol (PEG) and left overnight. Then, DNA was washed by 70% ethanol and re-dissolved in 30 µL TE buffer. AOA and AOB *amoA* genes in each fraction were quantified by quantitative PCR with the primers Arch-*amoA*F and Arch-*amoA*R (Francis et al., 2005) and the primers *amoA*1F and *amoA*2R (Rotthauwe et al., 1997), respectively.

3 Results

3.1 Quantification of AOA and AOB *amoA* genes in WWTP sludge

Quantitative PCR revealed the numbers of AOA and AOB *amoA* genes in WWTP sludge along the three sampling occasions within three month period of the study (Figure 1). The AOA *amoA* gene numbers were in a range of ???, and for AOB *amoA* genes, the numbers were ranging from ???. For all three sampling times, AOA *amoA* genes were ??? times outnumbering AOB *amoA* genes.

3.2 Phylogenetic analysis of AOA *amoA* gene sequences obtained from WWTP sludge

Clone libraries were constructed for AOA *amoA* gene fragments obtained from WWTP sludge I and WWTP sludge II. A neighbor-joining tree was constructed as shown in Figure 2. All sequences analyzed from both sampling periods related closely to each other by being in the same AOA subcluster of the group 1.1b Thaumarcheota. The results suggest that AOA communities were unchanged during both sampling times.

3.3 DNA-stable isotope probing

DNA-SIP was performed for WWTP sludge I and WWTP sludge II with inorganic medium containing an ammonia concentration of 7 mg-N/L. The incubation period was ??? and ??? days for WWTP sludge I and WWTP sludge II, respectively. During the incubation, ammonia, nitrite, and nitrate concentrations were periodically measured. With the incubation of both sludge, ammonia was completely oxidized to nitrite and nitrate leading to the remaining ammonia concentrations of $< 0.39 \text{ mgN L}^{-1}$ in the effluent since day 7 of operation. These concentrations fell close to the WWTP effluent. No nitrite accumulation ($< 0.36 \text{ mgN L}^{-1}$ after 7 days of operation) was observed due to the presence of nitrite-oxidizing activity in the sludge. Nitrate concentrations in the effluent ($7.2\text{-}11.2 \text{ mgN L}^{-1}$) were balance with the influent ammonia concentrations for all reactors. Sludge samples were taken from the reactors once a week. Numbers of AOA and AOB *amoA* genes were measured by quantitative PCR. DNA from ^{12}C and ^{13}C incubation was fractionated by isopycnic gradient centrifugation in CsCl solution. Then, numbers of AOA and AOB *amoA* genes in each fraction were monitored by quantitative PCR. DNA-SIP profiles were plotted against the relative ratio of the gene number in a fraction to the maximum gene number and the buoyant density of a fraction (g mL^{-1}).

For WWTP sludge I (Figure 3), AOA *amoA* gene peak of the ^{12}C incubation appeared at ??? g mL^{-1} . After ??? days of incubation, an additional peak occurred at ??? g mL^{-1} in the ^{13}C incubation and this pattern was maintained until the end of incubation of ??? days. For AOB *amoA* gene profiles, the peak of the ^{12}C incubation was found at ??? g mL^{-1} and the peak was shifted to ??? g mL^{-1} for the ^{13}C incubation. The results suggested the incorporation of $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3^-$ into AOA and AOB cells under the incubation condition of WWTP sludge I. However, the AOA *amoA* gene peaks were not clearly separated between the ^{12}C and ^{13}C incubation. This may be because the mixing was only provided 8 hours a day with an attempt to ensure enough cells for DNA-SIP experiment, resulting in longer SRT than the controlled

HRT of 4 days. Therefore, the incubation was performed again with WWTP sludge II, and mixing was provided 24 hours after day ??? of incubation to remove old cells from the reactors.

Figure 4 shows DNA-SIP profiles for WWTP sludge II. For all sampling occasions, the AOA *amoA* gene peaks of the ^{12}C incubation occurred at ??? g mL $^{-1}$. The ^{13}C incubation showed an additional peak at ??? g mL $^{-1}$ on day ??? of incubation. The peaks migrated toward the heavier fractions as shown on days ??? and ??? of the reactor operation. After full mixing was provided from day ???, the peak at ??? g mL $^{-1}$ in the ^{13}C incubation reduced their size suggesting that some AOA cells containing ^{12}C was removed from the reactor, while the cells containing ^{13}C can be maintained and became higher proportion in the reactor. AOB *amoA* gene profiles shows the peaks at ??? g mL $^{-1}$ for the ^{12}C incubation. The peaks for the ^{13}C incubation appeared at ??? g mL $^{-1}$ since day ??? of operation. The results confirmed the incorporation of $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3^-$ into AOA and AOB cells. AOA *amoA* gene sequences were analyzed for sample taken at day 56 of the ^{13}C incubation. Clones were sequenced and the phylogenetic analysis was described as shown in Figure 2. The results suggested that AOA found at the end of the incubation were in the same AOA subcluster of the group 1.1b Thaumarcheota as found in the WWTP sludge II. The result indicated that the incubation condition used in this study did not influence the AOA community. In addition, AOA of this subcluster performed autotrophic growth during ammonia oxidation.

Figure 6 shows DNA-SIP profiles of WWTP sludge III which was incubated with the medium containing no ammonia. The incubation condition was maintained in the same manner as for WWTP sludge I and WWTP sludge II. Along the incubation period of ??? days, shift of the peaks from the ^{12}C to ^{13}C incubation was not observed for both AOA and AOB *amoA* genes. The peaks appeared at ??? g mL $^{-1}$ for AOA *amoA* genes and ??? g mL $^{-1}$

for AOB *amoA* genes. The result suggests no ^{13}C incorporation into AOA and AOB cells when no ammonia was supplied.

4. Discussion

AOA *amoA* genes outnumbered AOB *amoA* genes (Figure 1). A number of works reported the existence of AOA *amoA* genes in WWTP samples (Park et al. 2006; Wells et al. 2009; Limpiyakorn et al. 2011; Mußmann et al. 2011; Yapsakli et al. 2011; Zhang et al. 2011; Bai et al. 2012; Sauder et al. 2012; Gao et al. 2013; Wu et al. 2013; Gao et al. 2014; Sinthusith et al. 2015; Li et al. 2016; Sauder et al. 2017). Some demonstrated that AOA *amoA* genes were the dominant ammonia oxidizers' *amoA* genes in WWTPs (Limpiyakorn et al. 2011; Mußmann et al. 2011; Bai et al. 2012; Sauder et al. 2012; Wu et al. 2013; Sinthusith et al. 2015; Zhang et al. 2015). Until now, it is still unclear what environmental and operational parameters made these microorganisms occurred or been the predominant ammonia oxidizers in some WWTPs. This ambiguousness is due to the limitation of data to represent complexity of WWTP environment to link with AOA appearance in the past studies (Li et al., 2016). Although this point is still in debate, a few literatures demonstrated that ammonia concentration, dissolve oxygen concentration, and retention time may be possible parameters influencing AOA occurrence in WWTPs (Park et al. 2006; Limpiyakorn et al. 2011; Sauder et al. 2012; Sinthusith et al. 2015; Li et al. 2016).

AOA *amoA* gene sequences suggested that AOA found in the WWTP sludge I, WWTP sludge II and at the end of DNA-SIP incubation of WWTP sludge II were members of one subcluster within the group 1.1b Thaumarcheota. Previously, members of AOA in this subcluster were reported in other WWTPs (Limpiyakorn et al., 2011). However, there is no any cultured AOA related closely to this AOA subcluster. Representative cultured AOA for WWTPs were found to be placed in different AOA groups. The strain SAT1 from a WWTP in China belonged to the group 1.1a Thaumarcheota and *Candidatus Nitrosocosmicus*

exaquare" from a municipal WWTP in Canada fell within *Nitrososphaera* sister cluster within the group 1.1b Thaumarcheota. No representative WWTP AOA of the group 1.1b Thaumarcheota has been reported. AOA cultures within the group 1.1b Thaumarcheota are available, but they are retrieved from other environment, for example "*Candidatus Nitrososphaera gargensis*" from hot spring (Hatzenpichler et al. 2008), "*Candidatus Nitrososphaera viennensis*" from soil (Tourna et al. 2011). However, our WWTP AOA sequences are phylogenetically placed in different branch from those cultured AOA (Figure 2) with sequence identity of ??% to "*Candidatus Nitrososphaera gargensis*", "*Candidatus Nitrososphaera viennensis*", respectively. Therefore, physiological and metabolic information obtained from the current available AOA cultures may not be applicable for this AOA subcluster.

The DNA-SIP profiles suggested the incorporation of $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3^-$ to *amoA* genes of AOA and AOB only when ammonia was supplied to the incubation. The shift of the DNA-SIP peaks from the lighter fractions to the heavier fractions of both microorganisms *amoA* genes were found since day ??? of incubation. Regarding culture studies, AOA and AOB are considered to be the slow-growing microorganisms. Their generation time is in a range of day under autotrophic growth condition. Two representative AOA cultures for WWTPs, the strain SAT1 and "*Candidatus Nitrosocosmicus exaquare*" showed the generation time of 2.9 d and 2.2 d (51.7 hr) (Li et al. 2016 and Sauder et al. 2017). AOA from other environments, such as *Nitrosopumilus maritimus* and "*Candidatus Nitrososphaera viennensis*" had the generation time of 21-26 h and 23 d, respectively (Könneke et al. 2005; Martens-Habbena et al. 2009; Tourna et al. 2011). Because the shift of the DNA-SIP peaks can be observed at the early period of incubation of ??? days which did not far differ from the generation times of both microorganisms, the incorporation of ^{13}C into their *amoA* genes should be a result of direct uptake of the supplied $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3^-$ rather than cross feeding. In addition, without ammonia, no

incorporation of $^{13}\text{C-HCO}_3^-$ was observed along the incubation period of ??? days. Therefore, it is indicated that AOA and AOB in the WWTP sludge performed autotrophic ammonia oxidation.

Previously, AOA originated from WWTPs belonging to other AOA groups have been reported to oxidize ammonia and assimilate inorganic carbon. The strain SAT1, which belonged to the group 1.1a Thaumarcheota, was confirmed for its autotrophic ammonia oxidizing activity by DNA-SIP. CARD-FISH-MAR suggested that the enrichment culture of “*Candidatus Nitrosocosmicus exaquare*”, belonging to the *Nitrososphaera* sister cluster within the group 1.1b Thaumarcheota, incorporated ^{14}C -bicarbonate during oxidizing ammonia. However, when CARD-FISH-MAR was applied to the WWTP biofilm where “*Candidatus Nitrosocosmicus exaquare*” was originated from, no incorporation of ^{14}C -bicarbonate was found for AOA in the presence of ammonia, while positive signals were reported for AOB. The result is similar to *in situ* activity investigation of sludge from a refinery WWTP (Mußmann et al. 2011). FISH-MAR revealed that although AOA presented up to a 10,000 times higher number than AOB in the plant, they did not exhibit autotrophic activity in the presence of ammonia. Sauder et al (2017) raised that in the WWTPs, AOA may rely on another metabolism or oxidized ammonia with assimilating a carbon source other than bicarbonate.

Although, our current study showed that AOA belonging to the subcluster of the group 1.1b Thaumarcheota performed autotrophic ammonia oxidation *in situ*, alternative carbon sources apart from bicarbonate are not included in this study. Many AOA cultures from WWTPs and other environments were found to be stimulated by some organic compounds. The ammonia-oxidizing activity of “*Candidatus Nitrosocosmicus exaquare*” can be stimulated by the presence of many organic compounds with maltate, succinate, and pyruvate at the most (Sauder et al. 2017). “*Candidatus Nitrososphaera viennensis*” was also

able to increase their growth rate under low amounts of additional pyruvate (Tourna et al. 2011). Therefore, this piece of work still remains for further clarification and is interesting for WWTP engineers as various types of organic compounds are present in wastewater and they may influence the predominant of AOA in some WWTPs.

5. Conclusions

This study revealed *in situ* activity of AOA and AOB in one municipal WWTP. AOA in this WWTP affiliated to only one subcluster within the group 1.1b Thaumarcheota. AOA and AOB in the sludge was found to perform autotrophic ammonia oxidation under the study condition. The results strengthened the hypothesis that AOA also contribute to ammonia removal in WWTPs.

6. Acknowledgements

The financial support of this work was provided by Thailand Research Fund (grant no. RSA5780096) and the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund).

7. References

- Bai, Y., Sun, Q., Wen, D., Tang, X., 2012. Abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in industrial and domestic wastewater treatment systems. FEMS Microbiology Ecology 80 (2), 323–330.
- De la Torre JR, Walker CB, Ingalls AE, Könneke M, Stahl DA (2008) Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. Environ Microbiol 10(3):810–818
- 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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102 (41), 14683–14688.

- Gao, J.-F., Luo, X., Wu, G.-X., Li, T., Peng, Y.-Z., 2013. Quantitative analyses of the composition and abundance of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in eight full-scale biological wastewater treatment plants. *Bioresource Technology* 138, 285-296.
- Gao, J., Luo, X., Wu, G., Li, T., Peng, Y., 2014. Abundance and diversity based on amoA genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in ten wastewater treatment systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (7), 3339-3354.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (6), 2134–2139.
- Jia, Z., Conrad, R., 2009. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology* 11(7), 1658-1671.
- Könneke, 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.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7), 1870-1874.
- Lehtovirta-Morley, L.E., Stoecker, K., Vilcinskas, A., Prosser, J.I., Nicol, G.W., 2011. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (38), 15892-15897.
- Li, Y., Ding, K., Wen, X., Zhang, B., Shen, B., Yang, Y., 2016. A novel ammonia-oxidizing archaeon from wastewater treatment plant: Its enrichment, physiological and genomic characteristics. *Scientific Reports* 6, 23747.

- Limpiyakorn, T., Sonthiphand, P., Rongsayamanont, C., Polprasert, C., 2011. Abundance of *amoA* genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in activated sludge of full-scale wastewater treatment plants. *Bioresource Technology* 102 (4), 3694-3701.
- Limpiyakorn, T., Fürhacker, M., Haberl, R., Chodanon, T., Srithep, P., Sonthiphand, P., 2013. *amoA*-encoding archaea in wastewater treatment plants: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (4), 1425-1439.
- Martens-Habbena, W., Berube, P.M., Urakawa, H., De la Torre, J.R., Stahl, D.A., 2009. Ammonia oxidation kinetics determines niche separation of nitrifying archaea and bacteria. *Nature* 461, 976–979.
- Mußmann, M., Brito, I., Pitcher, A., Sinninghe Damsté, J.S., Hatzenpichler, R., Richter, A., Nielsen, J.L., Müller, A., Daims, H., Wagner, M., Head, I.M., 2011. Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express *amoA* but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (40), 16771-16776.
- Park, H.D., Wells, G.F., Bae, H., Griddle, C.S., Francis, C.A., 2006. Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (8), 5643–5647.
- Pester, M., Rattei, T., Flechl, S., Gröngroft, A., Richter, A., Overmann, J., Reinhold-Hurek, B., Loy, A., Wagner, M., 2012. AmoA-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of *amoA* genes from soils of four different geographic regions. *Environmental Microbiology* 14(2), 525-539.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 63(12), 4704–4712.

- Sauder, L.A., Peterse, F., Schouten, S., Neufeld, J.D. 2012. Low-ammonia niche of ammonia-oxidizing archaea in rotating biological contactors of a municipal wastewater treatment plant. *Environmental Microbiology* 14 (9), 2589-2600.
- Sauder, L.A., Albertsen, M., Engel, K., Schwarz, J., Nielsen, P.H., Wagner, M., Neufeld, J.D., 2017. Cultivation and characterization of *Candidatus Nitrosocosmicus exaquare*, an ammonia-oxidizing archaeon from a municipal wastewater treatment system. *ISME Journal* Article in Press.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10), 2731-2739.
- Tourna, M., Stieglmeier, M., Spang, A., Könneke, M., Schintlmeister, A., Urich, T., Engel, M., Schlöter, M., Wagner, M., Richter, A., Schleper, C., 2011. *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (20), 8420-8425.
- Wells, G F., Park, H.-D., Yeung, C.-H., Eggleston, B., Francis, C.A., Criddle, C.S., 2009. Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor: betaproteobacterial dynamics and low relative abundance of crenarchaea. *Environmental Microbiology* 11 (9), 2310-2328.
- Widdel, F., Bak, F., in *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Application* 2nd edn (eds Ballows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K.-H.). Springer, New York, 1992), 3352—3378.

399 Yapsakli, K., Aliyazicioglu, C., Mertoglu, B., 2011. Identification and quantitative evaluation
400 of nitrogen-converting organisms in a full-scale leachate treatment plant. Journal of
401 Environmental Management 92 (3), 714-723.

402 Zhang, T., Ye, L., Tong, A.H.Y., Shao, M.F., Lok, S., 2011. Ammonia-oxidizing archaea and
403 ammonia-oxidizing bacteria in six full-scale wastewater treatment bioreactors. Applied
404 Microbiology and Biotechnology 91 (4), 1215-1225.

405 Zhang, Y., Tian, Z., Liu, M., Shi, Z.J., Hale, L., Zhou, J., Yang, M., 2015. High
406 Concentrations of the Antibiotic Spiramycin in Wastewater Lead to High Abundance of
407 Ammonia-Oxidizing Archaea in Nitrifying Populations. Environmental Science and
408 Technology 49 (15), 9124-9132.

409

410 **Figure 1** Numbers of AOB and AOA *amoA* genes in WWTP sludge

411

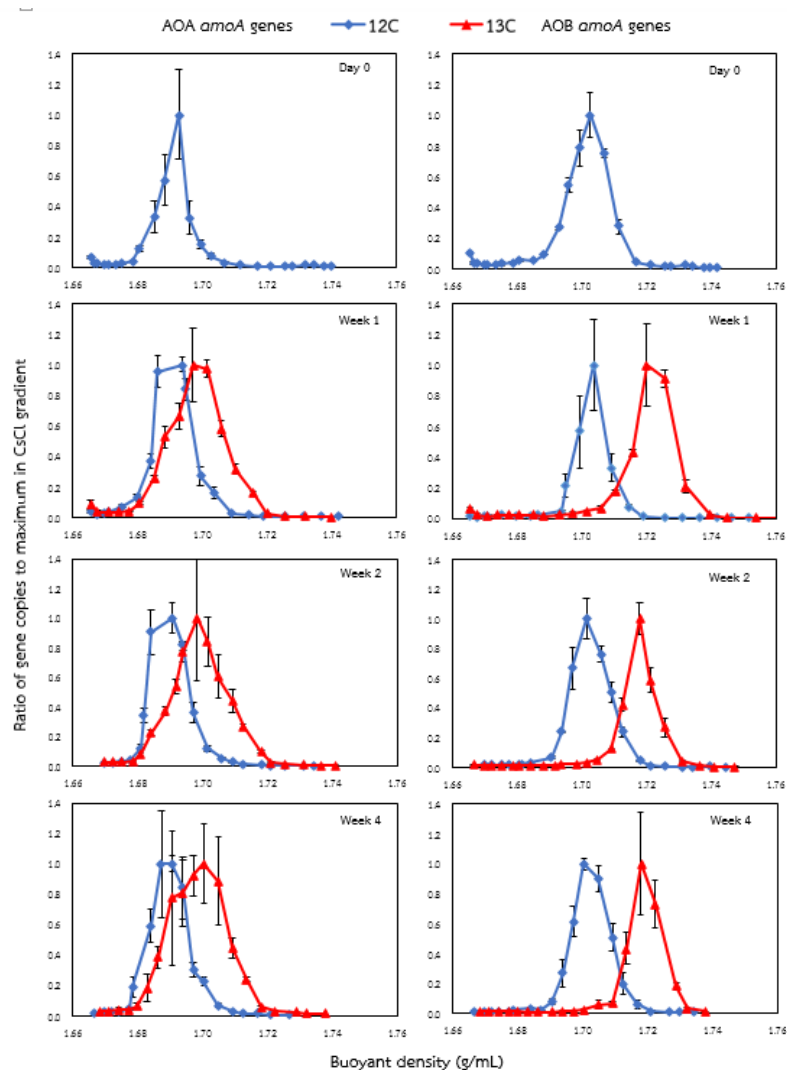
Unfinished draft

412 **Figure 2** Phylogenetic tree calculated based on sequences of AOA *amoA* genes

413

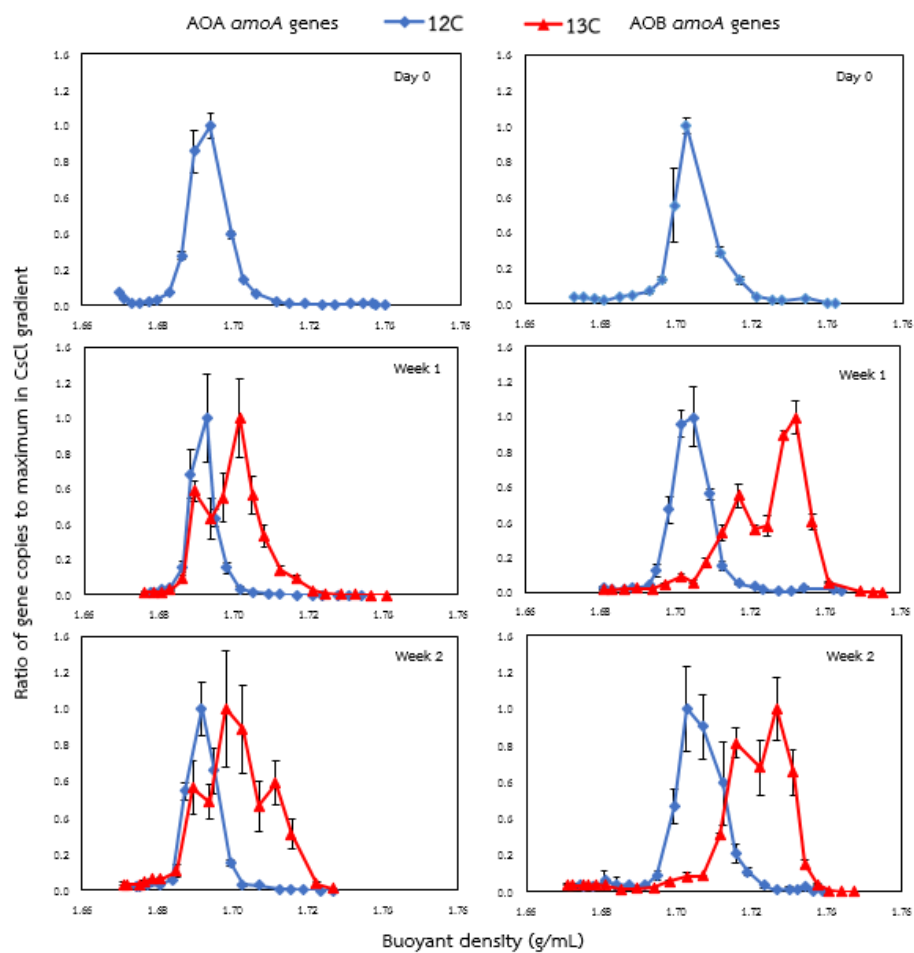
Unfinished draft

Figure 3 DNA-SIP profiles showing buoyant density distribution of AOA and AOB *amoA* genes for WWTP sludge I supplied with 7 mgN L⁻¹ ammonium media.



417 **Figure 4** DNA-SIP profiles showing buoyant density distribution of AOA and AOB *amoA*
 418 genes for WWTP sludge II supplied with 7 mgN L⁻¹ ammonium media.

419



420 **Figure 5** DNA-SIP profiles showing buoyant density distribution of AOA and AOB *amoA*
 421 genes for WWTP sludge III supplied without ammonium media.

