

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การย่อยสลาย 17อัลฟา-เอสทีนิลเอสตราไดออลด้วยจุลินทรีย์แอมโมเนีย
ออกซิไดซ์ซึ่งมีโครงสร้างประชากรแตกต่างกัน
17 α -Ethinylestradiol degradation by different population
structure of ammonia-oxidizing microorganisms

ไชยวัฒน์ รงค์สยามานนท์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประจำปีงบประมาณ 2555 รหัสโครงการ ENV550371S

รายงานฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย) การย่อยสลาย 17อัลฟา-เอสทีนิลเอสตราไดโอดด้วยจุลินทรีย์แอมโมเนียออกซิไดซ์ซึ่งที่มีโครงสร้างประชากรแตกต่างกัน

(ภาษาอังกฤษ) 17 α -Ethinylestradiol degradation by different population structure of ammonia-oxidizing microorganisms

คณะนักวิจัย

นักวิจัยหลัก

ดร.ไชยวัฒน์ รงค์สยามานนท์ คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

นักวิจัยพี่เลี้ยง

รศ.ดร.ศุภศิลา มณีรัตน์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยได้รับทุนอุดหนุนประจำปี 2555 จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อภาษาไทย/อังกฤษ

(ภาษาไทย)

17 α -ethinylestradiol (EE2) เป็นฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ในยาเม็ดคุมกำเนิดซึ่งสามารถปนเปื้อนในของเสียที่ขับออกจากร่างกายของมนุษย์และสัตว์และออกสู่สิ่งแวดล้อมผ่านการปนเปื้อนในน้ำทิ้งจากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน ซึ่งจะเป็นผลให้ EE2 สามารถเกิดการตกค้างในแหล่งน้ำ และรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อและระบบการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำได้ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนีย (ammonia-oxidizing microorganisms, AOM) ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรีย (ammonia-oxidizing bacteria, AOB) และ อาร์เคียที่ทำหน้าที่ออกซิไดซ์แอมโมเนีย (ammonia-oxidizing archaea, AOA) ในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนแบบตะกอนเร่งสามารถย่อยสลาย EE2 ร่วมกับแอมโมเนียผ่านกระบวนการโคเมทาบอลิซึมด้วยเอนไซม์ ammonia monooxygenase (AMO) ผลการศึกษาพบว่า กลุ่มประชากร AOM ในสลัดจ์จากระบบบำบัดน้ำเสียมีอิทธิพลอย่างสูงต่อการออกซิไดซ์แอมโมเนียและการย่อยสลาย EE2 โดยสลัดจ์ที่มี AOB เด่นในคลัสเตอร์ *Nitrosomonas europaea*-*Nitrosococcus mobilis* จะย่อยสลาย EE2 ได้เร็วกว่า ทั้งนี้เป็นผลจากความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนียที่สูงกว่า เมื่อเทียบกับ สลัดจ์ที่มี AOB เด่นในคลัสเตอร์ *Nitrosomonas oligotropha* นอกจากนี้ สลัดจ์ที่มี AOB เด่นในคลัสเตอร์ *N. oligotropha* จะสามารถย่อยสลาย EE2 ได้เร็วกว่าเนื่องจากสามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียได้เร็วกว่า สลัดจ์ที่มี AOA เป็นประชากรเด่น นอกจากนี้ยังพบอีกว่า การย่อยสลาย EE2 ของสลัดจ์ที่สามารถออกซิไดซ์แอมโมเนียได้เร็ว จะอ่อนไหวต่อระดับการออกซิไดซ์ของแอมโมเนียในระดับที่สูงกว่า สลัดจ์ที่ออกซิไดซ์แอมโมเนียได้ช้า การศึกษานี้เป็นครั้งแรกที่สรุปได้ว่าประสิทธิภาพในการบำบัดร่วมระหว่างแอมโมเนียและ EE2 ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งส่วนหนึ่งเป็นผลจากความสามารถในการออกซิไดซ์แอมโมเนียหรือการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันของ AOM ที่เด่นในระบบ

(ภาษาอังกฤษ)

17 α -ethinylestradiol (EE2), a synthetic estrogen which interferes the endocrine and reproductive function in living organisms, has been found extensively to be deposited into municipal wastewater treatment plants and the environment via human excretion. EE2 has long been known to be efficiently cometabolized by ammonia-oxidizing microorganism (AOM) during ammonia (NH₃) oxidation. Current study aims to investigate the effect of AOM community on the biotransformation of EE2 by nitrifying sludge. The dominant AOM population largely affected not only the rate of NH₃ oxidation but also EE2 removal. Sludge dominated with higher-growing-AOM like *Nitrosomonas europaea*-*Nitrosococcus mobilis* cluster showed higher rate of EE2 biotransformation because of its ability to provide more reducing power from NH₃ oxidation as opposed to those which dominated with lower-growing-AOM as *Nitrosomonas oligotropha* cluster and ammonia-oxidizing archaea (AOA). A slightly faster rate of EE2 degradation was found with *N. oligotropha*-dominating as opposed to AOA-dominating sludge. Moreover, the strongest correlation between NH₃ and EE2 degradation was achieved by *N. europaea*-*N. mobilis*-dominating sludge compared to the others. This study firstly reveals an importance of the AOM community regarding its determination on the removal efficiency of simultaneous nitrogen and EE2 in nitrogenous wastewater.

บทสรุปผู้บริหาร

บทนำ

ฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogens) คือ ฮอร์โมนเพศหญิงที่มีบทบาทสำคัญต่อระบบสืบพันธุ์ การปลดปล่อยฮอร์โมนเอสโตรเจนส่วนเกินผ่านทางระบบขับถ่ายจากสิ่งมีชีวิตจะก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตรวมทั้งมนุษย์เป็นอย่างมาก เมื่อฮอร์โมนเอสโตรเจนเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตและมนุษย์ จะเข้าไปรบกวนและส่งผลต่อการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อ (Endocrine disruptor) และทำให้เกิดความผิดปกติเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ (Institute of Population Health, 2007) ฮอร์โมนเอสโตรเจนสามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่มคือ เอสโตรเจนธรรมชาติ และ เอสโตรเจนสังเคราะห์ โดยเอสโตรเจนธรรมชาติ จะประกอบด้วย estrone (E1), 17 β -estradiol (E2) และ estriol (E3) ซึ่งสิ่งมีชีวิตสามารถผลิตได้เอง และในส่วนของเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ ตัวอย่างเช่น 17 α -ethinylestradiol (EE2) จะถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยา เช่น เป็นส่วนประกอบสำคัญในยาเม็ดคุมกำเนิด (Ying และคณะ, 2002) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ผลจากการใช้สารฮอร์โมนและสารคุมกำเนิดในมนุษย์ ทำให้มีการปนเปื้อนของ EE2 ในสิ่งแวดล้อมผ่านทาง การขับถ่ายของเสียของมนุษย์เพิ่มมากขึ้น (Belfroid และคณะ, 1999; Baronti และคณะ, 2000; Kuch และ Ballschmitter, 2001) ดังนั้น EE2 จะถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมผ่านทางน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดจากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน ซึ่งเป็นแหล่งรองรับน้ำเสียจากกิจกรรมในครัวเรือน (Lust และคณะ, 2015; Tran และคณะ, 2013; Johnson และคณะ, 2000) จากการรวบรวมเอกสารงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าความเข้มข้นของ EE2 ในน้ำเสียชุมชนที่เข้าสู่โรงบำบัดน้ำเสียในประเทศอิตาลี เนเธอร์แลนด์ ญี่ปุ่น และบราซิลมีค่าอยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.2 – 8.8 นาโนกรัมต่อลิตร (Baronti และคณะ, 2000; Johnson และคณะ, 2000; Nasu, 2000; Ternes และคณะ, 1999) โดยในปัจจุบันถึงแม้ว่าค่ามาตรฐานของสาร

กลุ่มเหล่านี้ยังไม่ีออกมาเป็นทางการ ทั้งค่ามาตรฐานของน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดหรือค่ามาตรฐานในแหล่งน้ำธรรมชาติ แต่จากการศึกษาผลกระทบของ EE2 พบว่าความเข้มข้นของ EE2 ในระดับนาโนกรัมต่อลิตร ก็สามารถส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตหรือมนุษย์ที่อาจได้รับฮอร์โมนนี้จากการบริโภคสัตว์น้ำในแหล่งน้ำธรรมชาติ เช่น ปริมาณของ EE2 ที่ระดับนาโนกรัมต่อลิตรสามารถลดการสร้างเชื้อสูกิจและเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งอันทะได้ (Purdom และคณะ, 1994; Sharp และ Skakkeback, 1993) นอกจากนี้ EE2 ยังส่งผลกระทบอย่างมากต่อวงจรชีวิตและระบบนิเวศของสัตว์น้ำในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อน เช่น ความสามารถในการขยายพันธุ์ของปลาลดลง ซึ่งเป็นผลจากการที่ปลาเพศผู้หันไปผลิตโปรตีนชนิดที่โดยปกติแล้วจะพบในไข่ของปลาเพศเมีย อีกทั้งมีไข่จำนวนมากที่กลายเป็นไข่ม เป็นผลให้จำนวนและความหลากหลายของปลาเพศผู้ลดลง (Desbrow et al., 1998; Jobling et al., 1998) รวมทั้งมีหลักฐานที่พบว่า การปนเปื้อนของ EE2 ในห่วงโซ่อาหาร สามารถส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่น สัตว์บกและพืช ในลักษณะเดียวกันกับสัตว์น้ำคือมีผลต่อความสามารถในการขยายพันธุ์เช่นเดียวกัน (Jobling et al., 1998)

อย่างไรก็ตาม ด้วยวิธีการดำเนินงานในโรงบำบัดน้ำเสียชุมชนส่วนใหญ่จะใช้ระบบตะกอนเร่ง (activated sludge) ในการบำบัดสารอินทรีย์และธาตุอาหาร ซึ่งระบบบำบัดแบบตะกอนเร่งที่มีอยู่ไม่สามารถที่จะบำบัดฮอร์โมนชนิดนี้ได้ทั้งหมด (Tran และคณะ, 2013) โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ถึงแม้ระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งทั่วไป จะสามารถกำจัด EE2 ได้ถึง 80 - 85% (Ternes และคณะ, 1999; Baronti และคณะ, 2000) แต่ถึงกระนั้นพบว่า ยังคงมี EE2 ตกค้างในน้ำที่ผ่านการบำบัดจากโรงบำบัดน้ำเสียและถูกปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อมอยู่ในระดับที่สามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตได้ ตัวอย่างเช่น มีการตรวจพบ EE2 ที่ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ระดับที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ จนถึง 42 นาโนกรัมต่อลิตร ในน้ำที่ผ่านการบำบัดจากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน 9 ใน 10 แห่งในประเทศบราซิล (Ternes และคณะ, 1999) ซึ่งสูงกว่า 1-10 นาโนกรัมต่อลิตร ที่สามารถก่อให้เกิดความผิดปกติทางเพศของสัตว์น้ำบางชนิดได้ (Purdom และคณะ, 1994)

อย่างไรก็ดี จากการศึกษาที่ผ่านมาโดย Shi และคณะ (2004) พบว่าในถังเติมอากาศของระบบตะกอนเร่งภายในโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน มีกลุ่มจุลินทรีย์จำพวกแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย (ammonia-oxidizing bacteria, AOB) ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ AMO ที่สามารถย่อยสลาย EE2 ผ่านกระบวนการโคเมตาบอลิซึมโดยการใช้แอมโมเนียเป็นซับสเตรท เพื่อการเจริญเติบโตและสามารถย่อยสลาย EE2 ไปได้พร้อมกัน โดย Shi และคณะ (2004) ได้ใช้เชื้อบริสุทธิ์ของ *N. europaea* ในการโคเมตาบอลิซึม EE2 ที่อัตรา 0.001 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และสามารถกำจัด แอมโมเนียได้ในอัตรา 1.55 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ขณะที่ Vader และคณะ (2000) ยืนยันว่าการย่อยสลาย EE2 เกิดขึ้นจากกระบวนการ โคเมตาบอลิซึม โดยศึกษาจากเชื้อผสมไนโตรฟายอิงสลัดจ์¹ ภายใต้สภาวะที่มีการสะสมตัวของแอมโมเนียในถังเติมอากาศที่ความเข้มข้นสูง พบว่า สามารถย่อยสลาย EE2 ได้และสามารถย่อยได้ถึงที่ความเข้มข้นสูงสุด 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีอัตราการย่อยสลายอยู่ที่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อกรัมสลัดจ์แห้งต่อชั่วโมง

¹ ไนโตรฟายอิงสลัดจ์ (nitrifying sludge, NS) หมายถึง สลัดจ์ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแอมโมเนียในโตรเจนให้เป็นไนเตรทไนโตรเจนในกระบวนการไนตริฟิเคชัน ซึ่งจะประกอบด้วยจุลินทรีย์สามกลุ่มหลักคือ 1) กลุ่มเฮเทอโรทรอปิกแบคทีเรีย (aerobic heterotrophic bacteria) ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ 2) จุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิง (ammonia-oxidizing microorganism, AOM) ซึ่งทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนเตรท และ 3) กลุ่มไนโตรออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย (nitrite-oxidizing bacterial, NOB) ซึ่งทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์ไนเตรทให้เป็นไนเตรท

ในปัจจุบัน แม้จะเป็นที่ยอมรับกันว่าการทำงานของ AOB มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลาย EE2 ผ่านกระบวนการโคเมตาบอลิซึมโดยการใช้แอมโมเนียเป็นซับสเตรท แต่ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่รับน้ำเสียที่มีระดับความเข้มข้นของซับสเตรทหรือแอมโมเนียไนโตรเจนที่แตกต่างกัน จะเป็นผลให้มีประชากรจุลินทรีย์ที่แสดงบทบาทหลักในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย เช่น AOB ที่เป็นสมาชิกอยู่ในคลัสเตอร์ *N. europaea* จะมีความสามารถในการใช้ซับสเตรทสูงแต่มีความชอบ (affinity) ซับสเตรทต่ำ โดย AOB ในคลัสเตอร์นี้สามารถพบได้ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่รับน้ำเสียที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียสูง ในขณะที่ AOB ที่เป็นสมาชิกอยู่ในคลัสเตอร์ *N. oligotropha* จะมีความสามารถในการใช้ซับสเตรทต่ำแต่มีความชอบซับสเตรทสูง (Sonthiphand และ Limpiyakorn, 2011; Limpiyakorn และคณะ, 2005 และ 2007) ซึ่งจะพบ AOB คลัสเตอร์นี้ได้ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่รับน้ำเสียที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำ เช่นเดียวกับสมาชิกของกลุ่ม AOA ที่มีความสามารถในการใช้ซับสเตรทต่ำแต่มีความชอบซับสเตรทสูงกว่า AOB มาก ซึ่งทำให้สามารถพบ AOA จำนวนมากได้ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งที่รับน้ำเสียที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำมาก (Kayee และคณะ, 2011); Limpiyakorn และคณะ, 2011) จากข้อมูลเหล่านี้ จึงทำให้เกิดคำถามที่ว่าจุลินทรีย์ AOM² ในระบบบำบัดน้ำเสียที่ต้องรับแอมโมเนียที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันจะมีความสามารถในการย่อยสลาย EE2 แตกต่างกันหรือไม่อย่างไร

อย่างไรก็ตาม จากการทบทวนเอกสาร พบว่า งานวิจัยส่วนใหญ่จะเน้นศึกษาการย่อยสลาย EE2 โดยใช้ AOB บริสุทธิ์ (pure culture) ที่อยู่ในคลัสเตอร์ *N. europaea* ที่จะมีความชอบต่อซับสเตรทที่ต่ำ ดังนั้นคลัสเตอร์นี้จะสามารถแสดงบทบาทหลักในการออกซิไดซ์แอมโมเนียในสภาวะที่มีแอมโมเนียความเข้มข้นสูง (ความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงกว่า 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) (Limpiyakorn และคณะ, 2005) ขณะที่การศึกษาการย่อยสลาย EE2 โดยใช้เชื้อผสมหรือสลัดจ์ที่มาจากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนซึ่งรับภาระบรรทุกแอมโมเนียไม่สูง (ความเข้มข้นของแอมโมเนียเฉลี่ยคือ 28 มิลลิกรัมต่อลิตร, Kayee และคณะ, 2011; Henze และคณะ, 1997 และ 2002) ที่ AOB ในคลัสเตอร์ที่มีความชอบซับสเตรท สูงกว่า AOB คลัสเตอร์ *N. europaea* เช่น AOB ในคลัสเตอร์ *N. oligotropha* หรือ AOA จะแสดงบทบาทหลักในการออกซิไดซ์แอมโมเนีย นอกจากนี้ระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนยังเป็นแหล่งรองรับสำคัญของฮอริโมนเอสโตรเจน เช่น EE2 ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

แม้ว่าความเข้าใจในอิทธิพลของโครงสร้างของชุมชนและจำนวนประชากร AOM ที่แสดงบทบาทหลักในการออกซิไดซ์แอมโมเนียต่อการย่อยสลาย EE2 จะเป็นสิ่งสำคัญต่อการพัฒนา ออกแบบและควบคุมการเดินระบบบำบัดน้ำเสีย โดยเฉพาะในโรงบำบัดน้ำเสียที่เป็นแหล่งรองรับสำคัญของฮอริโมนเอสโตรเจน เช่น โรงควบคุมคุณภาพน้ำทิ้งจากชุมชน จากฟาร์มเลี้ยงสัตว์น้ำ จากพื้นที่เกษตรกรรม และจากโรงพยาบาล ให้สามารถรองรับกับภาระการปนเปื้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม จากการทบทวนเอกสารที่มีการ peer review ยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษาในประเด็นดังกล่าวนี้

วัตถุประสงค์

ศึกษาการย่อยสลายของฮอริโมน EE2 ร่วมกับการกำจัดแอมโมเนียด้วยไนตริฟายอิงสลัดจ์ ที่มีโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ AOM เด่นแตกต่างกันในระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง

² สำหรับจุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิง (ammonia-oxidizing microorganism, AOM) เป็นที่รับรู้กันอย่างกว้างขวางในระยะ 7-8 ปีที่ผ่านมาแล้วว่า จุลินทรีย์กลุ่มนี้ประกอบด้วย แอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงแบคทีเรีย (ammonia-oxidizing bacteria, AOB) และแอมโมเนียออกซิไดซ์ซิงอาร์เคีย (ammonia-oxidizing archaea, AOA) ซึ่งจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มนี้ต่างมีบทบาทสำคัญในการออกซิไดซ์แอมโมเนียในระบบบำบัดน้ำเสีย

แนวทางการใช้ประโยชน์จากงานวิจัย

จากการศึกษาพบว่า การสนับสนุนให้จุลินทรีย์กลุ่มแอมโมเนียออกซิไดซิงแบคทีเรียหรือ AOB ในคลัสเตอร์ *N.europeae-N.mobilllis* คงอยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนที่มักมีการปนเปื้อนฮอร์โมน EE2 จะสามารถช่วยในการย่อยสลายฮอร์โมน EE2 ซึ่งเป็นสารที่เอื้อต่อการถูกย่อยสลายทางชีวภาพเกิดขึ้นได้เร็วขึ้น ดังนั้น แนวทางการใช้ประโยชน์จากการศึกษาครั้งนี้ คือ การสร้างหรือสนับสนุนให้จุลินทรีย์ AOB คลัสเตอร์ดังกล่าว ที่มักพบเจอเป็นปกติอยู่แล้วในโรงบำบัดน้ำเสียชุมชนที่ใช้ระบบตะกอนเร่งในเขตอากาศร้อนอย่างบ้านเรา เพิ่มจำนวนขึ้นในระบบ ซึ่งอาจจะกระทำได้โดย การเวียนส่วนน้ำใสจากถังหมักตะกอนส่วนเกินแบบไร้อากาศ กลับมาบำบัดต่อในระบบตะกอนเร่ง แอมโมเนียเข้มข้นสูงในน้ำใสที่ถูกเติมกลับสู่ระบบตะกอนเร่ง จะกลายเป็นแหล่งอาหารที่มีความเหมาะสมและสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตและทำให้จุลินทรีย์ AOB คลัสเตอร์ดังกล่าวคงอยู่ในระบบตะกอนเร่งได้

ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต

1. ศึกษาเส้นทางการย่อยสลายรวมถึงชนิด, ปริมาณ, ความเป็นพิษ และ estrogenicity ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลาย EE2 ด้วยจุลินทรีย์ AOB ในแต่ละกลุ่ม
2. ศึกษาการย่อยสลาย EE2 ในสภาพแวดล้อมที่ใกล้เคียงกับในโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน เช่น ศึกษาการย่อยสลายในถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่อง รวมทั้งใช้ความเข้มข้นของ EE2 ที่สอดคล้องกับที่พบเจอในน้ำเสียชุมชนจริง
3. ศึกษาการใช้เอนไซม์หรือการแสดงออกของยีน AMO ของจุลินทรีย์ AOB ในแต่ละกลุ่มระหว่างการย่อยสลาย EE2 ตลอดจนการศึกษาผลกระทบจากการแข่งขันกันของจุลินทรีย์ AOB หลายกลุ่มในถังปฏิกรณ์ต่อการใช้เอนไซม์หรือการแสดงออกของยีน AMO และการย่อยสลาย EE2

สรุป

***แสดงในไฟล์ manuscript แนบ (อยู่ระหว่างรอผลการพิจารณาตีพิมพ์จากวารสาร)

เอกสารอ้างอิง

- Adler, P., Steger-Hartmann, T. and Kalbfus, W. (2001). Distribution of natural and synthetic estrogenic steroid hormones in water samples from Southern and Middle Germany. *Acta. Hydrochim. Hydrobiol.* 29: 227–241.
- Andersen, H., Siegrist, H., Halling- S Ørensen, B., and Ternes, T.A. (2003). Fate of Estrogens in a Municipal Sewage Treatment Plant. *Environ. Sci. Technol.* 37,18 : 4021-4026.
- Baronti, C., Curini, R., D'A scenzo, G., Corcia, A., Gentili, A., and Samperi, R. (2000). Monitoring natural and synthetic estrogens at activated treatment plants and in receiving river water. *Environ. Sci. Technol.* 34: 5059-5066.

- Belfroid, A. C., Van, D.H., Vethaak, A.D., Schafer, A.J., Rijs, G.B.J., Wegener, J., and Cofino, W. P. (1999). Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands. *Sci. Total Environ.* 225: 101-108.
- Gaulke, L.S., Strand, S. E ., Kalthorn, T. F . and Stensel, D.H. (2008). 17 α -ethynylestradiol Transformation via Abiotic Nitration in the Presence of Ammonia Oxidizing Bacteria. *Environ. Sci. Technol.* 42: 7622–7627.
- Gaulke, L.S., Strand, S. E ., Kalthorn, T. F . and Stensel, D.H. (2009). Estrogen Biodegradation Kinetics and Estrogenic Activity Reduction for Two Biological Wastewater Treatment Methods. *Environ. Sci. Technol.* 43: 7111–7116.
- Institute of Population Health. (2011). Endocrine disruption [online]. University of Ottawa, R. Samuel McLaughlin Centre for Population Health Risk Assessment. Available from: <http://www.emcom.ca/EM/index.shtml> [2011, February].
- Henze, M. (1997). Trends in advanced wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* 35, 10:1-4.
- Henze, M., Harremoës, P., Jansen, J. la C. and Arvin, E. (2002). Wastewater treatment – Biological and chemical processes. Third Edition. Springer Verlag. Berlin Heidelberg. ISBN: 3-540-42228-5. p. 89 – 109.
- Johnson, A.C., Belfroid, A., and Corcia, Di.A. (2000). Estimating steroid estrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci. Total Environ.* 256:163-173.
- Kayee, P., Sonthiphand, P. Rongsayamanont, C., Limpiyakorn, T. (2011). Archaeal amoA Genes Outnumber Bacterial amoA Genes in Municipal Wastewater Treatment Plants in Bangkok. *Microb Ecol.* 62: 776-788.
- Kuch, H.M., and Ballschmitter, K. (2001). Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environ. Sci. Technol.* 35: 3201-3206.
- Limpiyakorn, T., Shinihara, Y., Kurisu, F., Yagi, O. (2005). Communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo. *FEMS Microbiol Ecol.* 54:205-217.
- Limpiyakorn, T., Sakamoto, Y., Kurisu, F. and Yagi, O. (2007) Effect of Ammonia and Nitrite Concentrations on Communities and Populations of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Laboratory-Scale Continuous-Flow Reactors. *FEMS Microbiol. Eco.* 60: 501-512.

- 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(4) :3694 – 3701.
- Lust M.J., Ziels R.M., Strand S.E., Gough H.L., Stensel H.D. (2015) Biodegradation kinetics of 17 α -ethinylestradiol in activated sludge treatment processes. *Environ. Eng. Sci.* 32: 637 - 646.
- Nakai, S., Yamamura, A., Tanaka, S., Shi, J., Nishikawa, M., Nakashimada, Y., and Hosomi, M. (2011). Pathway of 17 β -estradiol degradation by *Nitrosomonas europaea* and reduction in 17 β -estradiol-derived estrogenic activity . *Environ Chem Lett* . DOI 10.1007/s10311-010-0308-99.
- Nasu, M. (2000). Study on endocrine disrupting chemicals in wastewater treatment plants. *Water Sci. Technol.* 43(2): 101-108.
- Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R., and Sumpter, J.P. (1994). Estrogenic affects of effluents from sewage treatment works. *J Chem Ecol.* 8: 275-285.
- Khunjar, W. O.Mackintosh, S. A., Skotnicka-Pitak, J., Baik, S., Aga, D. S.,and Love, N. G. (2011). Elucidating the Relative Roles of Ammonia Oxidizing and Heterotrophic Bacteria during the Biotransformation of 17 r -Ethinylestradiol and Trimethoprim. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3605 – 3612.
- Shi, J., Fujisawa, S., Nakai, S., and Hosomi, M. (2004). Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Water Res.* 38:2323-2330.
- Sonthiphand, P. and Limpiyakorn, T. (2011). Change in ammonia-oxidizing microorganisms in enriched nitrifying activated sludge. *Appl Microbio Biol.* 89(3):843 – 853.
- Ternes, T. A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Willken, R. D., and Servos, M. (1999). Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total Environ.* 225: 81- 90.
- Tran N.H., Urase T., Ngo H.H., Hu J., Ong S.L. (2013) Insight into metabolic and cometabolic activities of autotrophic and heterotrophic microorganisms in the biodegradation of emerging trace organic contaminants. *Bioresour. Technol.* 146:721 – 731.
- Vader, J.S., Ginkel, C., Stokman, F.M., Sperling, G.M., Jong, J., Boer, W., Graaf, J., Most, M., and Stokman, P. (2000). Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge. *Chemosphere.* 41: 1239-1243.

- Yi, T. and Happer, W.F. Jr. (2002). The Link between Nitrification and Biotransformation of 17 α -Ethinylestradiol. *Environ. Sci. Technol.* 41: 4311 – 4316.
- Ying, G., Kookana, R.S., and Ru, Y.J. (2002). Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ. Int.* 28: 545– 551.

1 **Abstract**

2 17 α -ethinylestradiol (EE2), a synthetic estrogen which interferes the endocrine and
3 reproductive function in living organisms, has been found extensively to be deposited
4 into municipal wastewater treatment plants and the environment via human excretion.
5 EE2 has long been known to be efficiently cometabolized by ammonia-oxidizing
6 microorganism (AOM) during ammonia (NH₃) oxidation. Current study aims to
7 investigate the effect of AOM community on the biotransformation of EE2 by
8 nitrifying sludge. The dominant AOM population largely affected not only the rate of
9 NH₃ oxidation but also EE2 removal. Sludge dominated with higher-growing-AOM
10 like *Nitrosomonas europaea*-*Nitrosococcus mobilis* cluster showed higher rate of EE2
11 biotransformation because of its ability to provide more reducing power from NH₃
12 oxidation as opposed to those which dominated with lower-growing-AOM as
13 *Nitrosomonas oligotropha* cluster and ammonia-oxidizing archaea (AOA). A slightly
14 faster rate of EE2 degradation was found with *N. oligotropha*-dominating as opposed
15 to AOA-dominating sludge. Moreover, the strongest correlation between NH₃ and
16 EE2 degradation was achieved by *N. europaea*-*N. mobilis*-dominating sludge
17 compared to the others. This study firstly reveals an importance of the AOM
18 community regarding its determination on the removal efficiency of simultaneous
19 nitrogen and EE2 in nitrogenous wastewater.

20 **Keywords:** 17 α -ethinylestradiol, Cometabolism, Ammonia-oxidizing
21 microorganisms, Microbial population, Nitrifying sludge

22

23

24

1 **1. Introduction**

2 Estrogens are important female hormones that regulate growth and development of
3 female sexual characteristics and reproduction in both humans and animals. Estrogens
4 can interfere endocrine and reproductive function in living organisms such as
5 disturbance on immunological system and fertility, reproductive failure due to
6 thinning the eggshells and reducing the egg production [1], feminization and
7 masculinization, and altered sexual development [2] which will make the living
8 organisms in the surface water extinct. 17α -ethinylestradiol (EE2), a synthetic
9 estrogen produced by humans, mostly lies in contraceptive pills. These types of
10 estrogens are used for birth control and hormone therapy such as increasing the
11 estrogen level in menopause female. These estrogens, both natural and synthetic
12 estrogens, are released to the environment by human and animal excretion. Excretion
13 which later flow into wastewater treatment plants (WWTP) enabling it to become one
14 of the most important sources of estrogen in the environment [3]. Some of estrogens
15 are degraded in the WWTP. The estrogens removal efficiencies by activated sludge
16 treatment range from 61% to 98% for E1, 67 % and 99% for E2 and 85% to 90% for
17 EE2 [4]. Some publications suggested that natural estrogens (E1, E2, and E3) were
18 degraded by heterotrophic bacteria, while EE2 was degraded by ammonia-oxidizing
19 bacteria (AOB) in nitrifying sludge (NS) [5]. AOB have many species, but there are
20 only two clusters which is active in WWTP including *Nitrosomonas europaea*-
21 *Nitrosococcus mobilis* (*N. europaea*-*N. mobilis*) and *Nitrosomonas oligotropha* (*N.*
22 *oligotropha*). The only difference between the two clusters is the ability to consume
23 ammonia, which might affect the EE2 degradation. Therefore, this study investigates
24 the EE2 degradation by different population structure of ammonia-oxidizing

1 microorganisms and clarified factors, which consists of species and population of
2 AOB and ammonia oxidation, affecting the EE2 degradation.

3 **2. Materials and methods**

4 **2.1. Chemicals**

5 EE2 (17 α -ethinylestradiol) was purchased from Sigma-Aldrich Corporation (St.
6 Louis, MO, USA). The stock solution of EE2 was prepared to 500 mg/L in methanol.
7 Other chemicals were purchased from Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France).
8 All chemicals used in this study are analytical reagent grade.

9 **2.2. Enrichment media for nitrifying sludge**

10 Enrichment media, which were synthetic wastewater plus ammonia nitrogen (NH₃) at
11 various concentrations were used to enrich nitrifying bacteria. Synthetic wastewater A
12 was added with 0.14 and 0.34 g of (NH₄)₂SO₄ per liter, respectively to get enrichment
13 media containing NH₃ of 28 and 70 mg N/L. Synthetic wastewater A was prepared by
14 dissolving NaCl (1 g), MgCl₂•6H₂O (0.4 g), CaCl₂•2H₂O (0.1 g), KH₂PO₄ (0.2 g), and
15 KCl (0.5 g) into one liter of de-ionized (DI) water and then adding one milliliter of
16 each mineral solutions including the solution of non-chelated trace element, selenite-
17 tungstate, vitamin mixture, thiamine, vitamin B12 [6]. Synthetic wastewater B, which
18 contained Na₂HPO₄ (4.05 g), K₂HPO₄ (2.1 g), MgSO₄ • 7H₂O (0.05 g), CaCl₂ • 2H₂O
19 (0.01 g), and FeSO₄ • 7H₂O (0.09 g) in one liter of DI water [7], was added with 0.68
20 and 2.02 g of (NH₄)₂SO₄ per liter, respectively to get media containing NH₃ of 140
21 and 420 mg N/L. Synthetic wastewater A and B were further used to prepare medium
22 for batch degradation test.

23 **2.3. Enriched reactors setup and operation**

1 Four polypropylene vessels with an effective volume of 6 liters were identically set up
2 as continuous flow enriched reactors without cell recycle. For each reactor, air was
3 supplied from air blower which connected with a small stone diffuser to provide
4 oxygen and mix the mixed liquor completely. The concentration of dissolved oxygen
5 (DO) in bulk solution was maintained between 7 – 8 mgO₂/L by adjusting air flow
6 rate with a small needle valve. pH in mixed liquor was controlled at 7.5±0.2 by a pH
7 controller (Liquitron DP 5000, LMI Milton Roy, USA) equipped with a pH probe
8 (Orion 9156DJWP, Thermo scientific, UK) as well as a solution of 0.5 N HCl and 0.5
9 N NaOH. Reactors were operated at room temperature between 23°C to 25°C.
10 Enriched reactors were set up and operated to enrich nitrifying sludge which contain
11 different population structure of ammonia-oxidizing microorganism (AOM).
12 Therefore, reactors were inoculated with mixed liquor containing different dominant
13 AOM. Mixed liquor taken from aerated zone of municipal WWTP in Thailand, which
14 contained the dominated AOM, belong to ammonia-oxidizing archaea (AOA) and
15 AOB in *N. oligotropha* cluster, was inoculated into two enriched reactors ‘28NS’ and
16 ‘70NS’ which was fed with NH₃ of 28 and 70 mg N/L. Mixed liquor from another
17 municipal WWTP, which contained AOB dominated with *N. oligotropha* and
18 *N.europaea-N.mobilis* clusters, was seeded into reactor ‘140NS’ fed with NH₃ of 140
19 mg N/L [8]. While the reactor ‘420NS’ was fed with 420 mg N/L NH₃ and inoculated
20 with an industrial wastewater sludge dominated with *N.europaea-N.mobilis* cluster.
21 Enrichment media containing NH₃ (as sole substrate for AOM) at various
22 concentrations were continuously fed into reactors to maintain the population
23 structure of AOM in sludge during reactor operation. For each gram of added NH₃, a

1 0.068 grams of HCO_3^- was put into an enrichment medium to provide inorganic
2 carbon source for nitrifying bacteria.

3 **2.4. Batch degradation test**

4 **2.4.1. Reactor setup and operation**

5 Small Plexiglas[®] vessel with a volume of 25 milliliters, which was initially filled with
6 synthetic wastewater, was used as batch reactor. Nitrifying sludge taken from
7 enriched reactor during steady operation was brought into the reactor. Synthetic
8 wastewater was later filled into reactor until final sludge concentration of 300 mg
9 mixed liquor suspended solid (MLSS)/L was reached. Then, sludge was provided
10 with predetermined amount of EE2 and mixed later with synthetic wastewater to
11 achieve a final concentration of EE2 at 3 mg/L. NH_3 was added into the reactor in a
12 similar manner with that of EE2. Synthetic wastewater A was used for tests with NH_3
13 at concentration of 28 and 70 mg N/L while wastewater B was used for 140 and 420
14 mg N/L NH_3 . Air and mixing was provided to mixed liquor by shaking with orbital
15 shaker at a speed of 250 rpm. The reactor was incubated at room temperature. While
16 running the tests, pH in bulk solution was maintained within a range of 8.0 ± 0.2 by
17 adding HEPES buffer solution to a final concentration of 30 g/L.

18 **2.4.2. Degradation test**

19 Nitrifying sludge containing different population structures of AOM taken from each
20 one of four enriched reactors during steady operation was brought into batch
21 degradation tests. Sludge was provided with NH_3 at various concentrations to
22 determine effect of NH_3 concentration and influence of AOM population structures on
23 the rate of NH_3 oxidation and EE2 degradation. Loss due to abiotic sorption and
24 volatilization of NH_3 and EE2 were observed through batch degradation test with

1 heat-killed cell and without cell. Biodegradability of EE2 by heterotrophic bacteria in
2 nitrifying sludge was investigated by adding allylthiourea (ATU) to achieve a final
3 concentration of 10 mg/L [5] to inhibit using ammonia monooxygenase (AMO)
4 enzyme by AOM. Furthermore, biodegradation of NH_3 and EE2 by utilizing AMO
5 still remaining in the harvested sludge were investigated by adding the reactor with
6 1000 mg/L chloramphenicol which has been well proven to inhibit AMO-induced de
7 novo synthesis [9]. All tests were carried out in triplicate except the test with heat-
8 treated cells and with no cells were done in duplicate. For all tests, samples were
9 periodically collected and analyzed for the concentration of EE2 and inorganic
10 nitrogen species as ammonia, nitrite and nitrate nitrogen in bulk solution during two-
11 week testing to determine the rate of NH_3 oxidation and EE2 degradation.

12 **2.5. Chemical analysis**

13 Mixed liquor samples were collected from enriched and batch reactors, filtered
14 through 0.45 μm Polytetrafluoroethylene membrane filter. Filtrate were analyzed for
15 EE2 and inorganic nitrogen species (NH_3 , NO_2^- , NO_3^-) while filtrated were measured
16 for MLSS and mixed liquor volatile suspended solid by gravimetric method. EE2 was
17 analyzed by C18 HPLC-UV detector (Shimadzu Series LC-10ADvp) with 40%
18 acetonitrile 60% H_2O as mobile phase. NH_3 was measured by gas-sensitive
19 combination electrode (Cole Palmer, Co.) and salicylated-colorimetric method with
20 UV visible spectrophotometer (Thermo Electron Corporation, Hexious α , Cambridge,
21 UK) at 640 nm [10-11]. NO_2^- was colorimetrically analyzed with UV visible
22 spectrophotometer at 543 nm while NO_3^- was analyzed by UV screening method at
23 220 and 275 nm [10, 12]. pH, DO concentration and temperature in mixed liquor were
24 monitored during sludge enrichment and degradation test. pH value was determined

1 by pH probe (250A+, Thermo Orion Inc., Germany). The concentration of DO was
2 determined by membrane sensing electrode (DO 083005D probe with 850A meter,
3 Thermo Orion Inc., Germany). Temperature was measured by a laboratory glass
4 thermometer.

5 **2.6. Analysis for abundance of ammonia-oxidizing microorganism cells**

6 **2.6.1. Sample preparation and extraction for DNA**

7 Sample of mixed liquor at a final concentration of 2 mg MLSS/L was collected from
8 enriched reactors, then supernatant after centrifugation at 14,000 rpm for 10 min was
9 removed. The pellet was stored at -20 °C. DNA was extracted from 2 mg dry weight
10 sample using Fast-DNA SPIN kits for soil (QBiogenes, USA) according to the
11 manufacturer's instruction. The DNA extraction product was confirmed by using
12 1.5% agarose gel electrophoresis.

13 **2.6.2. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)**

14 All DNA extraction was prepared in duplicate sets. QPCR was performed for
15 duplicate sets of extracts separately using a Light Cycler 480 instrument (Roche,
16 Germany) with a Maxima SYBR Green/ROX QPCR Master Mix (Fermentas, USA).
17 For each set of extracts, qPCR was carried out with four 10 dilution series, each in
18 duplicates. Functional and 16S rRNA genes including AOB *amoA* gene,
19 *Nitrosomonas oligotropha* (*N. oligotropha*) cluster AOB *amoA* gene, AOA *amoA* gene
20 and *Nitrosomonas europaea*-*Nitrosococcus mobilis* (*N. europaea*-*N. mobilis*) AOB 16S
21 rRNA genes were quantified by primers listed on Table 1. The standard DNA was
22 prepared in a range 10^0 to 10^7 copies using the pGEM-T Easy Vector (Promega,
23 USA). In order to transform the *amoA* gene numbers into the cell numbers, 2.5 copies
24 of the *amoA* gene per genome were used based on the numbers of bacterial *amoA*

1 gene copies found in the AOB cells and the AOB cells belongs to *N. oligotropha* [17].
2 One cell of AOB belongs to *N. europaea-N. mobilis* cluster contains one copy of 16S
3 rRNA gene [18]. QPCR condition to amplify the bacterial- and archaeal-*amoA* gene
4 was 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 30 s at 95 °C, 60 s at 56 °C, and 30 s
5 at 72 °C, and data capture for each cycle at 78 °C for 15 s. For amplifying *amoA* gene
6 AOB belongs to *N. oligotropha* cluster, the qPCR condition was 95 °C for 10 min,
7 followed by 35 cycles of 30 s at 95 °C, 60 s at 56 °C, and 60 s at 72 °C, and data
8 capture for each cycle at 78 °C for 15 s. For *N. europaea-N. mobilis* cluster, the qPCR
9 condition to amplify 16s rRNA gene was 95 °C for 10 min, followed by 35 cycles of
10 30 s at 94 °C, 60 s at 60 °C, and 60 s at 72 °C, and data capture for each cycle at 78
11 °C for 15 s.

12 **3. Results and discussion**

13 **3.1. Performance of enriched reactors fed with wastewater containing various** 14 **NH₃ concentrations**

15 Table 2 and Figure 1 showed long-term performance of all four enriched nitrifying
16 reactors. All reactors had reached steady performance in terms of NH₃, NO₂⁻ and NO₃⁻
17 effluent concentration after five weeks of operation. At steady state condition, NH₃
18 removal efficiencies for reactors fed with NH₃ of 28 mg N/L, 70 mg N/L and 140 mg
19 N/L were more than 99%. But for 420 mg N/L NH₃-fed reactor, slightly less removal
20 efficiency for NH₃ (96.23 %) was investigated due to higher influent NH₃ loading.
21 However, the removal loading rate and the effluent concentration are increased
22 following an influent concentration of NH₃. No NO₂⁻ accumulated in any reactors
23 indicated the rate of NH₃ oxidation limiting nitrification rate.

1 **3.2. Abundance of genes encoding *amoA* and 16S rRNA of ammonia-oxidizing**
2 **microorganisms in nitrifying sludge**

3 QPCR analysis results showed that number of AOB in enriched nitrifying sludge
4 depends on NH₃ removal load (Table 3). AOB belong to group which has high NH₃
5 affinity as *N. oligotropha* cluster were predominated in enriched nitrifying reactors
6 fed with NH₃ of 28 and 70 mg N/L at which the NH₃ concentration were less than 1
7 mg N/L in effluents due to their higher affinity for NH₃ (Monod half-saturated
8 coefficient or K_s are in a range of 0.32-3.16 mg N/L, [19-20]). However, AOB belong
9 to *N. europaea-N. mobilis* cluster, which has higher growth rate while lower affinity
10 for NH₃, was the most abundant AOM (equal to 10⁹ copies per liter of mixed liquor)
11 in reactors fed with 140 and 420 mg N/L NH₃, due to its higher and much lower
12 substrate affinity constant (maximum growth rate: 3 d⁻¹, K_s: 1-100 mg N/L, [19-22])
13 compared to average NH₃ concentration found in the reactor effluents (1.72 and 15.82
14 mg N/L NH₃).

15 Previous work as Limpiyakorn et al. [23] reported that *N. europaea-N. mobilis* was
16 predominant AOB cluster in chemostats fed with > 140 mg N/L NH₃ while the one
17 receiving ≤ 140 mg N/L NH₃, the dominant cluster was found to be *N. oligotropha*.
18 Results from this study were found to correspond well with that reported in
19 Limpiyakorn et al. [23] except in 140 and 420 mg N/L NH₃-fed reactor. *N. europaea-*
20 *N. mobilis* was predominated in a 140 mg N/L NH₃-fed reactor in this study while *N.*
21 *oligotropha* was predominated in the same NH₃-fed concentration. *N. oligotropha* was
22 found as high as 1.68x10⁵ copies per liter of mixed liquor in a 420 mg N/L NH₃-fed
23 enriched reactor used in this study while it was not observed in reactor receiving NH₃
24 at same concentration used in Limpiyakorn et al. [23]. Inhibitory effect of an

1 accumulated NO_2^- was speculated to be a possible reason behind this contradiction.
2 NO_2^- (30 to 100 mg N/L) was reported to accumulate in 420 mg N/L NH_3 -fed reactor
3 at concentration above NO_2^- tolerance of *N. oligotropha* (12 mg N/L) in Limpiyakorn
4 et al. [23] while no NO_2^- accumulated in any reactors used in this study. Moreover,
5 AOA cells, a very-high- NH_3 -affinity AOM ($K_s < 0.01$ mg N/L, [24]) was observed in
6 reactor fed with 28 mg N/L NH_3 because of very much lower residual NH_3 found in
7 the reactor (0.15 ± 0.04 mg N/L). Nevertheless, both AOA and *N. oligotropha* AOB
8 cluster was considered the dominating AOM in 28 NS due to their comparable
9 number found in reactor.

10 **3.3. Batch NH_3 oxidation**

11 **3.3.1. Effect of dominant AOM population**

12 For a certain NH_3 concentration, higher NH_3 oxidation was found in nitrifying sludge
13 dominated by AOM having higher growth rate when compare to those of sludge
14 dominated by lower-growth-AOM. Sludge dominated by AOB with *N.europaea-*
15 *N.mobilis* cluster (420 NS) showed highest rate of NH_3 utilization while that of
16 dominated by AOA and *N.oligotropha* AOB cluster (28 NS) oxidized NH_3 at lowest
17 rate as compared with other sources of sludge. 140 NS which was dominated by AOB
18 with *N.europaea-N.mobilis* cluster utilized NH_3 at higher rate than that of 70 NS
19 which was *N.oligotropha*-dominating sludge. As above results, it clearly indicated an
20 intrinsic NH_3 oxidation rate strongly depended on the physiology of dominant AOM
21 population in enriched nitrifying sludge.

22 **3.3.2. Effect of initial NH_3 concentration**

23 As a result, NH_3 oxidation was limited by the availability of substrate. Higher specific
24 NH_3 oxidation rate were observed at increasing initial NH_3 levels (Figure 2).

1 However, maximum substrate utilization rate of each sludge was attained by different
2 concentration of substrate. AOA and *N.oligotropha*-dominating sludge (28 NS and 70
3 NS) achieved their maximum NH₃ oxidation rate at 70 mg N/L while at least 140 mg
4 N/L was needed by sludge dominated with AOB with low NH₃ affinity as
5 *N.europaea-N.mobilis* AOB cluster (140 NS and 420 NS). Moreover, at initial NH₃
6 concentration of 420 mg N/L, slight lower NH₃ was oxidized as a result of substrate
7 inhibition. However, sludge dominated with AOA and *N.oligotropha* AOB cluster (28
8 NS and 70 NS) were apparently affected far less by the substrate inhibition than
9 *N.europaea-N.mobilis*-dominating sludge indicating higher tolerability of adverse
10 condition in slow-growing AOM.

11 **3.4. Batch EE2 degradation**

12 EE2 biodegradation behavior in nitrifying sludge dominated by AOM having different
13 NH₃ affinity was investigated with a focus of the oxidation of NH₃ at different initial
14 concentrations. As shown in Figure 2 and 3, NH₃ and EE2 degradation was observed
15 only at the absence of ATU. Furthermore, there was no any degradation of EE2 with
16 either heat-treated cells or no cell (data not shown) indicating the loss of EE2 due to
17 abiotic processes (ie. sorption and volatilization) was negligible in our study. This
18 indicates AMO cometabolism by AOM is main degradation pathway of EE2 rather
19 than heterotrophic and abiotic degradation which correspond with several studies [5,
20 25 - 29]. Moreover, the degradation of EE2 and NH₃ under the presence of AMO-
21 induced synthesis inhibitor was not observed (data not shown) indicating the
22 utilization of the remaining AMO by the harvested cells to transform both substrate
23 was negligible.

1 EE2 degradation clearly depended on the extent of NH₃ oxidation. At increasing NH₃
2 oxidation, higher EE2 was degraded as a result of more reducing power available for
3 AMO cometabolism. Moreover, not only an initial NH₃ concentration affected largely
4 on the rate of NH₃ oxidation but on the rate of EE2 biotransformation as well. Higher
5 available NH₃ improved both the rate of NH₃ and EE2 removal indicating a reductant-
6 limiting condition for AMO metabolism and cometabolism. While a reductant-
7 inhibiting condition decreased the NH₃ oxidation and EE2 degradation at initial NH₃
8 of 420 mg N/L. The results shown here is in good agreement with previous studies
9 [26 - 28] which found a strong positive correlation between the concentration of
10 incubated NH₃ and the rate of EE2 biotransformation by nitrifying sludge.

11 In addition, although an incubated NH₃ had been totally utilized by nitrifying sludge
12 after the 5 days of incubation with initial NH₃ of 28 – 140 mg N/L, but a substantial
13 level of EE2 still kept on being degraded even in the absence of NH₃. This was
14 consistent with the results obtained by a number of studies [26, 30 – 32] which
15 revealed the capability of nitrifying sludge to cometabolize EE2 in the NH₃-free
16 environment. This phenomenon is probably caused by utilizing the AMO
17 accumulated within the AOM cells to proceed EE2 degradation during the NH₃-
18 limiting condition.

19 Moreover, the rate of EE2 degradation was affected by not only initial NH₃ level but
20 dominant AOM population in nitrifying sludge as well (Figure 4). The population of
21 AOM in nitrifying sludge affected on the degradation of EE2 in the same manner as
22 on NH₃ oxidation. Higher EE2 degradation was found in sludge dominated by higher-
23 growth-AOM than lower-growth-AOM-dominating sludge. EE2 cometabolic rate of
24 sludge dominated with the *N. europaea*-*N. mobilis* AOB cluster were approximately

1 1.1 – 1.6 (140 NS) and 1.6 – 2 (480 NS) times higher than that belong to the AOA and
2 *N. oligotropha* AOB cluster (28 NS). While 70 NS, *N. oligotropha*-dominating
3 sludge, biotransformed EE2 at a slightly 1 – 1.3 times faster rate than that of 28 NS.
4 Greater EE2 cometabolic rate of higher-growth-AOM could be caused by more
5 reducing power (due to higher NH₃ oxidation) available for cometabolism.
6 Furthermore, the correlation between NH₃ and EE2 degradation rate of sludge was
7 found strongest in the *N. europaea*-*N. mobilis*-dominating sludge when comparing
8 with the sludge dominated with the lower-growth-AOM (*N. oligotropha* AOB cluster
9 and AOA). This implied that more electron or reducing power originated from NH₃
10 oxidation is needed by the *N. europaea*-*N. mobilis*-dominating sludge to cometabolize
11 a certain amount of EE2. Our finding firstly reveals an importance of the AOM
12 community in aeration tank regarding its determination on the removal efficiency of
13 simultaneous N and EE2 in nitrogenous wastewater. The rates of EE2
14 biotransformation found in this study were compared with those reported in previous
15 studies (Table 4). Higher rates of EE2 degradation obtained in the current study as
16 compared to other studies is likely because much higher initial concentration of EE2
17 was used.

18 **4. Conclusions**

19 Effect of the AOM community on the biotransformation of EE2 by nitrifying sludge
20 was investigated in this study. Higher available NH₃ improved both the rate of NH₃
21 and EE2 removal indicating a reductant-limiting condition for AMO metabolism and
22 cometabolism. Sludge dominated with higher-growing-AOM showed higher rate of
23 EE2 cometabolism than that dominated with AOM which has lower growth rate due
24 to its ability to provide more reducing power from NH₃ oxidation. The rate of NH₃

1 and EE2 degradation was found having a strong correlation particularly in *N.*
2 *europaea-N. mobilis*-dominating sludge. Current study firstly highlights an
3 importance of the AOM community on simultaneous nitrogen and EE2 removal in
4 wastewater.

5 **5. Acknowledgement**

6 The research was supported by a grant from Prince of Songkla University, contract
7 no. ENV550371S.

8 **6. References**

- 9 1. Scholz S and Gutzeit HO. 17 α -ethinylestradiol affects reproduction, sexual
10 differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*).
11 *Aquat. Toxicol.* 2000;50:363–373.
- 12 2. Hester RE, Harrison RM, Phillips B, Harrison P. Overview of the endocrine
13 disrupters issue. In: Harrison RM and Hester RE, eds. Endocrine Disrupting
14 Chemicals. London: Royal Society of Chemistry; 1999. p. 1-26.
- 15 3. Lust MJ, Ziels RM, Strand SE, Gough HL, Stensel HD. Biodegradation
16 kinetics of 17 α -ethinylestradiol in activated sludge treatment processes.
17 *Environ. Eng. Sci.* 2015;32: 637-646.
- 18 4. Johnson AC and Williams RJ. A model to estimate influent and effluent
19 concentrations of estradiol, estrone, and ethinylestradiol at sewage treatment
20 works. *Environ. Sci. Technol.* 2004;38:3649-3658.
- 21 5. Tran NH, Urase T, Ngo HH, Hu J, Ong SL. Insight into metabolic and
22 cometabolic activities of autotrophic and heterotrophic microorganisms in the
23 biodegradation of emerging trace organic contaminants. *Bioresour. Technol.*
24 2013;146:721–731.

- 1 6. Widdel F and Bak F. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In:
2 Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH, eds. The
3 prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation,
4 identification, applications. New York: Springer-Verlag; 1992. p. 3352-3378.
- 5 7. Rongsayamanont C, Limpiyakorn T, Law B, Khan E. Relationship between
6 respirometric activity and community of entrapped nitrifying bacteria:
7 Implication for partial nitrification. *Enzyme Microbial Technol.* 2010;46:229-
8 236.
- 9 8. Kayee, P., Sonthiphand, P., C., R. and Limpiyakorn, T. (2011). Archaeal
10 *amoA* genes outnumber bacterial *amoA* genes in municipal wastewater
11 treatment plants in Bangkok. *Microb. Ecol.* 62: 776–788.
- 12 9. Gerards S, Duyts H, Laanbroek HJ. Ammonium-induced inhibition of
13 ammonium-starved *Nitrosomonas europaea* cells in soil and sand slurries.
14 *FEMS. Microbiol. Ecol.* 1998;26:269-280.
- 15 10. APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater.
16 American Public Health Association: Washington DC; 1998.
- 17 11. Bower CE and Holm-Hansen T. A salicylate-hypochlorite method for
18 determining ammonia in seawater. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1980;37(5):794-
19 798.
- 20 12. Strickland JDH and Parsons TR. A manual of sea water analysis. In:
21 Strickland JDH and Parsons TR, eds. Bulletin of the Fisheries Research Board
22 of Canada No. 125. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada; 1960. p. 61-
23 69.

- 1 13. Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W. The ammonia monooxygenase
2 structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of
3 natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.*
4 1997;63:4704-4712.
- 5 14. Harms G, Layton A, Dionisi H, et al. Real-Time PCR quantification of
6 nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environ. Sci.*
7 *Technol.* 2003;37(2):343-351.
- 8 15. Lim J, Lee S, Hwang S. Use of quantitative real-time PCR to monitor
9 population dynamics of ammonia-oxidizing bacteria in batch process. *J. Ind.*
10 *Microbiol. Biotechnol.* 2008;35:1339-1344.
- 11 16. Pester M, Rattei T, Flechl S, et al. *amoA*-based consensus phylogeny of
12 ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of *amoA* genes from doils
13 of four different geographic regions. *Environ. Microbiol.* 2012;14(2):525-539.
- 14 17. Norton JM, Alzerreca JJ, Suwa Y, Klotz MG. Diversity of ammonia
15 monooxygenase operon in autotrophic ammonia oxidizing bacteria. *Arch.*
16 *Microbiol.* 2002;177:139–149.
- 17 18. Aakra Å, Utåker JB, Nes IF. RFLP of rRNA genes and sequencing of the 16S-
18 23S rDNA intergenic spacer region of ammonia-oxidizing bacteria: a
19 phylogenetic approach. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999;49(1):123–130.
- 20 19. Martens-Habbena W, Berube PM, Urakawa H, De la Torre JR, Stahl DA.
21 Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying archaea
22 and bacteria. *Nature* 2009;461:976-979.
- 23 20. Koops HP, Purkhold U, Pommerening-Röser A, Timmermann G, Wagner M.
24 The lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria. In: Dworkin M, Falkow S,

- 1 Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, eds. The prokaryotes: An
2 evolving electronic resource for the microbiological community. New York:
3 Springer-Verlag; 2003. p. 778-811.
- 4 21. Wood PM. Nitrification as a bacterial energy source. In: Prosser JI, eds.
5 Nitrification. Oxford: IRL Press; 1986. p. 39-62.
- 6 22. Suzuki I, Dular U, Kwok SC. Ammonia or ammonium ion as substrate for
7 oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *J. Bacteriol.*
8 1974;120:556-558.
- 9 23. Limpiyakorn T, Kurisu F, Sakamoto Y, Yagi O. Effects of ammonium and
10 nitrite on communities and populations of ammonia-oxidizing bacteria in
11 laboratory-scale continuous-flow reactors. *FEMS. Microbiol. Ecol.*
12 2007;60:501-512.
- 13 24. Park BJ, Park SJ, Yoon DN, Schouten S, Damste JSS, Rhee SK. Cultivation of
14 autotrophic ammonia-oxidizing archaea from marine sediments in coculture
15 with sulfur-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010;76:7575-7587.
- 16 25. Forrez I, Carballa M, Noppe H, De Brabander H, Boon N, Verstraete W.
17 Influence of manganese and ammonium oxidation on the removal of 17 α -
18 ethinylestradiol (EE2). *Water Res.* 2009;43:77-86.
- 19 26. Ren YX, Nakano K, Nomura M, Chiba N, Nishimura O. Effects of bacterial
20 activity on estrogen removal in nitrifying activated sludge. *Water Res.*
21 2007;41:3089 – 3096.
- 22 27. Yi T and Harper WF. The link between nitrification and biotransformation of
23 17 α -ethinylestradiol. *Environ. Sci. Technol.* 2007;41(12):4311-4316.

- 1 28. Yi T, Harper WF, Holbrook RD, Love NG. Role of particle size and
2 ammonium oxidation in removal of 17 α -ethinylestradiol in bioreactors. *J.*
3 *Environ. Eng.* 2006;132(11):1527-1529.
- 4 29. Andersen H, Siegrist H, Halling-Sorensen B, Ternes TA. Fate of estrogens in a
5 municipal sewage treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 2003;37(18):4021-
6 4026.
- 7 30. De Gusseme B, Pycke B, Hennebel T, et al. Biological removal of 17 α -
8 ethinylestradiol by a nitrifier enrichment culture in a membrane bioreactor.
9 *Water Res.* 2009;43:2493-2503.
- 10 31. Forrez I, Carballa M, Boon N, Verstraete W. Biological removal of 17 α -
11 ethinylestradiol (EE2) in an aerated nitrifying fixed bed reactor during
12 ammonium starvation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2008;84(1):119-125.
- 13 32. Vader JS, Van Ginkel CG, Sperling FM, et al. Degradation of ethinylestradiol
14 by nitrifying activated sludge. *Chemosphere* 2000;41:1239-1243.

15

16

17

18

19

20

21

22

1 **Table 1.** qPCR primers used in this study

Primer	Sequence 5'-3'	Target genes	Reference
amoA1F amoA2R	GGGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	AOB <i>amoA</i> genes	[13]
amoNo550D2f amoNo754r	TCAGTAGCYGACTACACMGG CTTTAACATAGTAGAAAGCGG	<i>amoA</i> genes of <i>N. oligotropha</i> cluster	[14]
NSMeur-828F NSMeur-1028R	GTTGT CCGAT CTAAT TAAG TGCT TGGCT CCCTT TC	16S rRNA genes of <i>N. europaea-N. mobilis</i> cluster	[15]
CamoA-19f CamoA-616r	ATGGTCTGGYTWAGACG GCCATCCABCKRTANGTCCA	AOA <i>amoA</i> genes	[16]

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

1 **Table 2.** Summary of monitoring results during the operation of enriched reactors
 2 under steady performance

Parameter	Monitoring results at steady state			
	A	B	C	D
	28 mg N/L NH ₃ -fed reactor	70 mg N/L NH ₃ -fed reactor	140 mg N/L NH ₃ -fed reactor	420 mg N/L NH ₃ -fed reactor
Influent NH ₃ (mg N/L)	27.72±1.02	69.14±1.44	138.05±3.79	409.37±17.55
NH ₃ loading rate (mg N/(L-d))	6.66±0.24	16.59±0.35	33.13±0.91	98.25±4.21
Effluent NH ₃ (mg N/L)	0.15±0.04	0.49±0.15	1.95±0.58	11.00±10.76
NH ₃ removal load (mg N/(L-d))	6.62	16.47	32.66	95.61
Effluent NO ₂ ⁻ (mg N/L)	0.04±0.02	0.12±0.08	0.84±0.69	12.35±13.16
Effluent NO ₃ ⁻ (mg N/L)	26.44±1.53	66.47±3.38	125.88±3.20	353.55±18.40
Total N	26.64±1.53	67.09±3.01	128.67±3.51	376.90±27.03
MLSS (mg/L)	100±20	120±20	190±30	240±30

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

- 1 **Table 3.** Abundance of genes encoding *amoA* and 16S rRNA in various cluster of ammonia-oxidizing microorganisms in nitrifying
- 2 sludge

Reactor	Influent NH ₃ concentration (mg N/L)	NH ₃ removal load (mg N/(L-d))	Effluent NH ₃ concentration (mg N/L)	Cluster of AOM (Gene copies per liter of mixed liquor)			
				<i>amoA</i> genes (AOB)	<i>amoA</i> genes (AOA)	16S rRNA genes (<i>N.europaea-N.mobilis</i> cluster)	<i>amoA</i> genes (<i>N. oligotropha</i> cluster)
28NS	28	6.62	0.15±0.04	8.62x10 ⁶ ±1.52x10 ⁵	1.06x10 ⁶ ±1.89x10 ⁴	ND	3.31x10 ⁶ ±5.86x10 ⁴
70NS	70	16.47	0.49±0.15	5.36x10 ⁸ ±5.76x10 ⁵	8.81x10 ⁵ ± 9.53x10 ³	ND	2.01x10 ⁸ ±2.17x10 ⁶
140NS	140	32.66	1.95±0.58	3.72x10 ⁹ ±2.34x10 ⁷	ND	1.93x10 ⁹ ±1.23x10 ⁷	4.84x10 ⁶ ±3.04x10 ⁴
420NS	420	95.61	11.00±10.76	1.04x10 ¹⁰ ±3.86x10 ⁷	ND	1.92x10 ¹⁰ ±7.16x10 ⁷	5.17x10 ⁶ ±1.97x10 ⁴

3

1 **Table 4.** Comparison of the rate of EE2 degradation by nitrifying activated sludge and
 2 enriched nitrifying sludge in aerated batch reactor

Culture	EE2 degradation rate (mg/(gVSS-day))	NH ₃ oxidation rate (mg N/(gVSS-day))	Initial concentration of EE2 & NH ₃	Ref
Nitrifying activated sludge	0.0936	1320	1.0 mg/L EE2; 100 mg N/L NH ₃	[5]
AMO-containing extract from enriched nitrifying sludge	7.83 - 29.17	129.6 - 1339.2	-	[27]
Enriched nitrifying sludge	0.096	1260	0.75 mg/L EE2; 52.5 mg N/L NH ₃	[30]
Nitrifying activated sludge	0.024	933.6	0.05 mg/L EE2; 50 mg N/L NH ₃	[32]
Enriched nitrifying sludge ^a 28NS (<i>AOA/N. oligotropha</i> -dominating); ^b 70NS (<i>N. oligotropha</i> -dominating); ^c 140NS (<i>N. europaea</i> -dominating); ^d 420NS (<i>N. europaea</i> -dominating)	^a 0.27 - 0.41; ^b 0.28 - 0.52; ^c 0.31 - 0.66; ^d 0.44 - 0.88	^a 55.9 - 168.3; ^b 51.1 - 225.4; ^c 67.5 - 312.7; ^d 150.9 - 630.7	3.0 mg/L EE2; 28-420 mg N/L NH ₃	This study

3 Note: 'a', 'b', 'c', 'd' indicate the results from sludge 28NS, 70NS, 140NS, and 420NS,
 4 respectively.

5

6

7

8

9

10

11

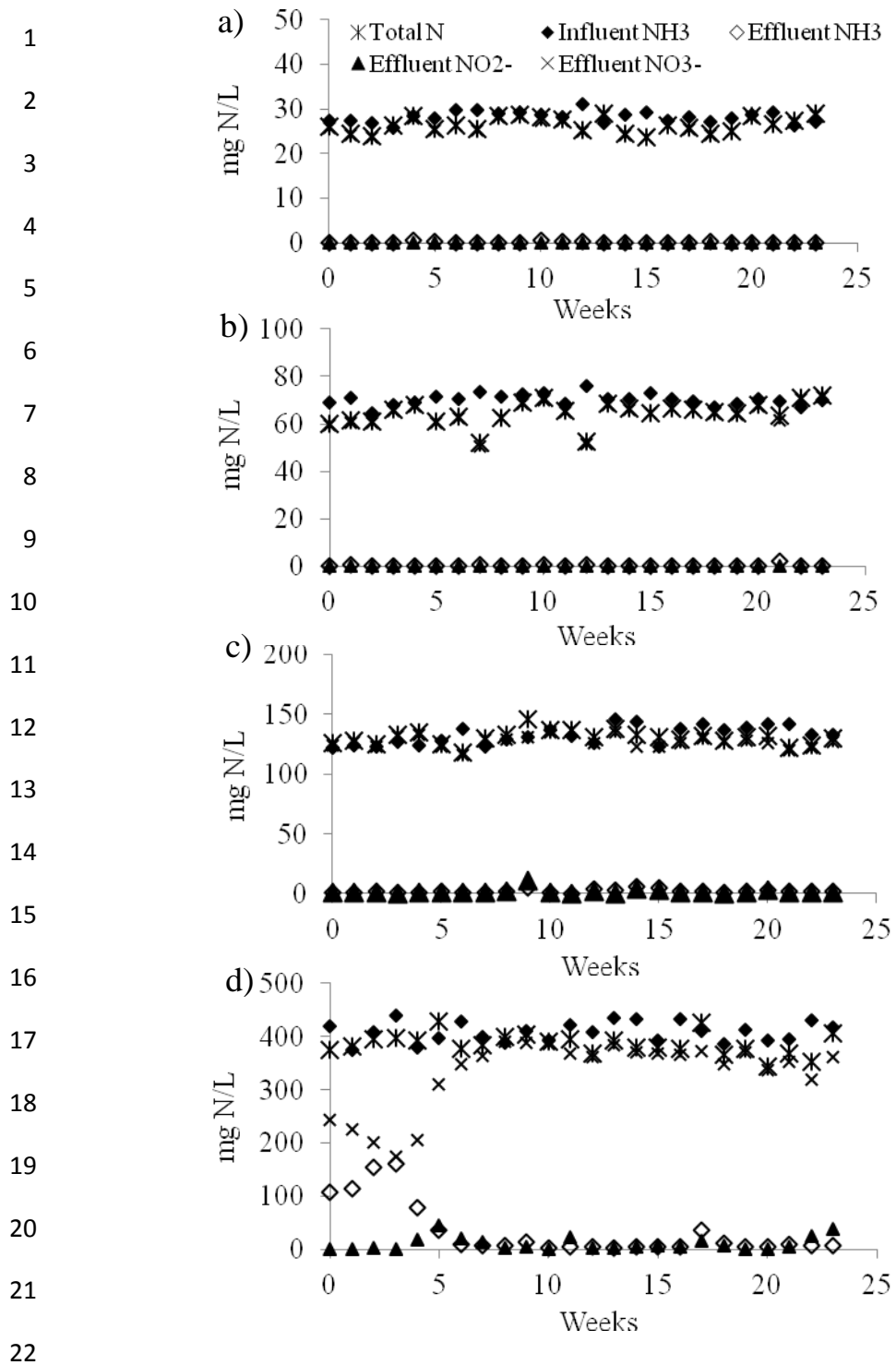
12

13

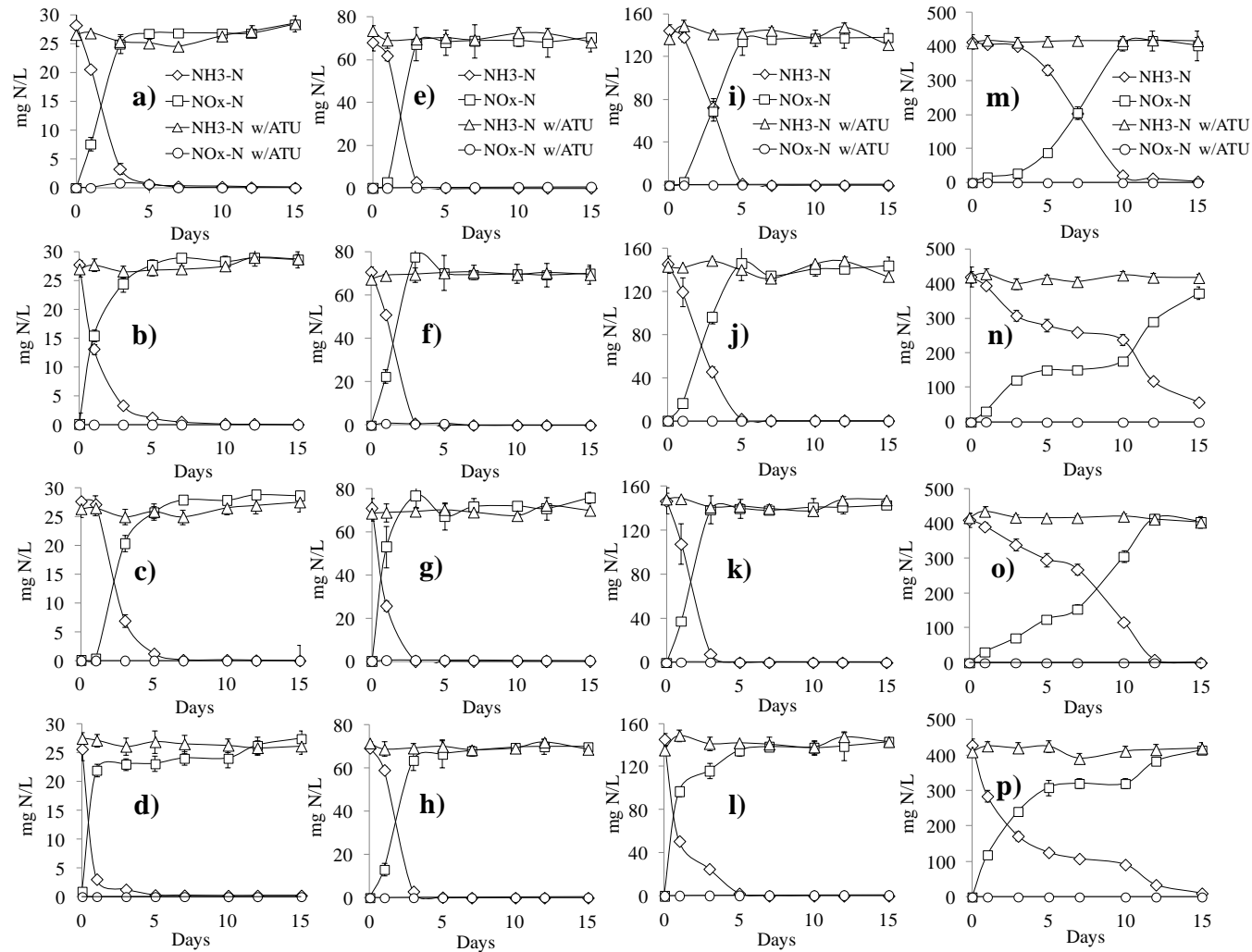
14

15

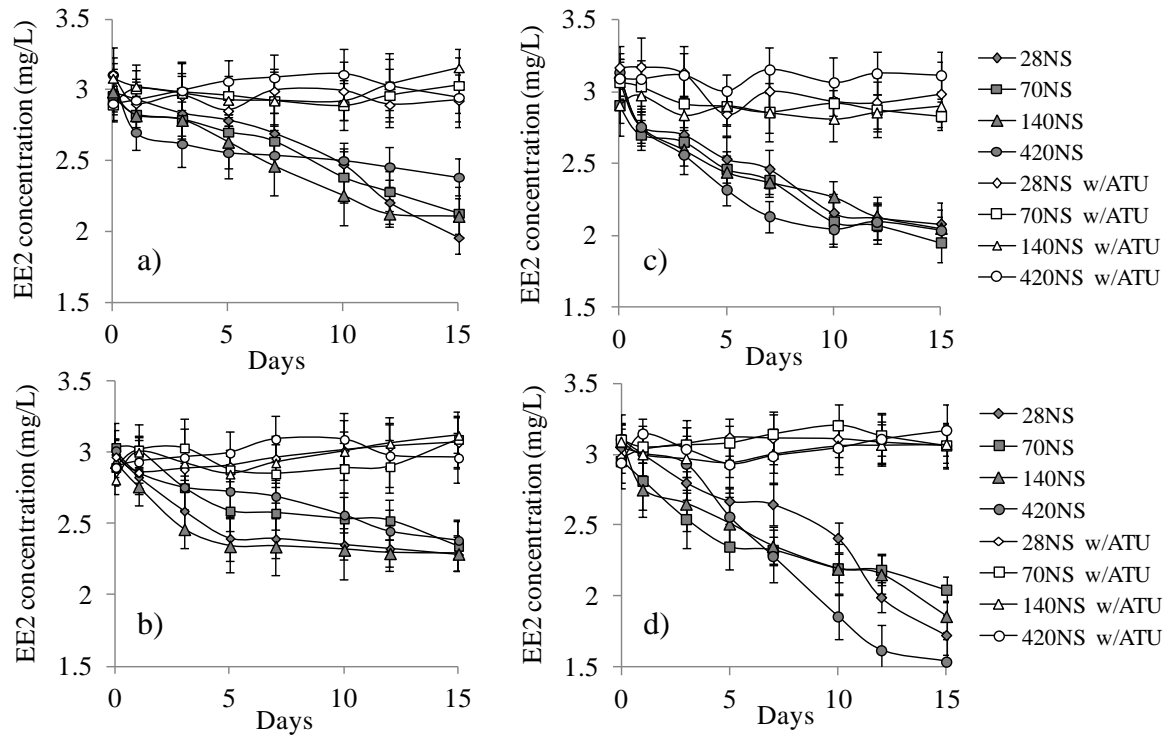
16



23 **Figure 1.** Concentration profiles of inorganic nitrogen species during sludge
 24 enrichment with NH_3 concentration of a) 28 mg N/L, b) 70 mg N/L, c) 140 mg N/L
 25 and d) 420 mg N/L



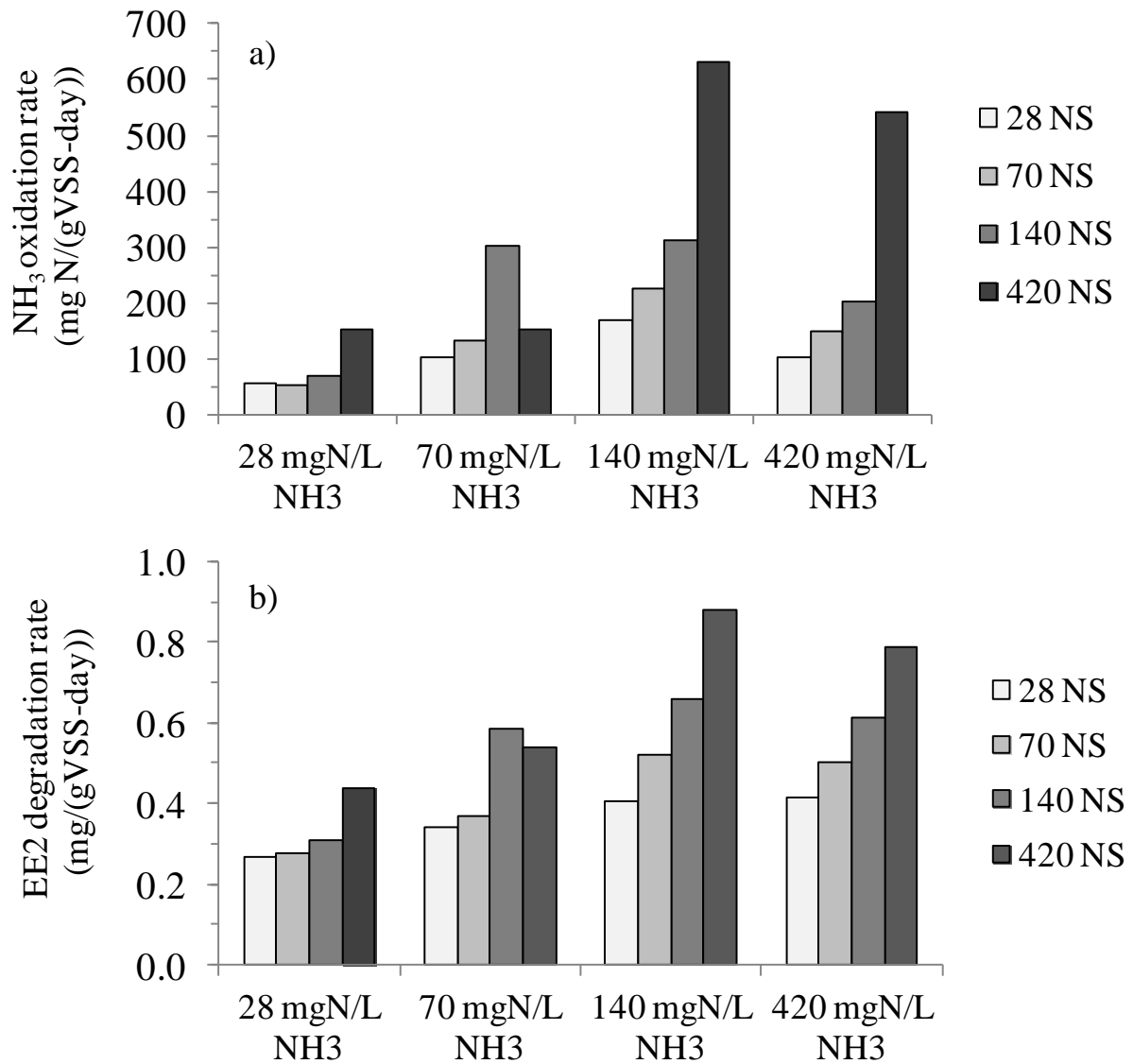
1 **Figure 2.** Profiles of NH₃ and NO₃⁻ concentration during incubation test with and without adding ATU at initial NH₃ concentration of 28 mg N/L (a-d), 70 mg N/L (e-h), 140 mg N/L (i-l) and 420 mg N/L (m-p) using sludge 28 NS (a,e,i,m), 70 NS (b,f,j,n), 140 NS (c,g,k,o) and 420 NS (d,h,l,p).



1

2 **Figure 3.** EE2 degradation using different sludge at initial NH_3 concentration a) 28 mg N/L

3 b) 70 mg N/L c) 140 mg N/L d) 420 mg N/L



1

2 **Figure 4.** The degradation rate of a) NH_3 and b) EE2 under different sludge and initial NH_3

3 concentration

4

5

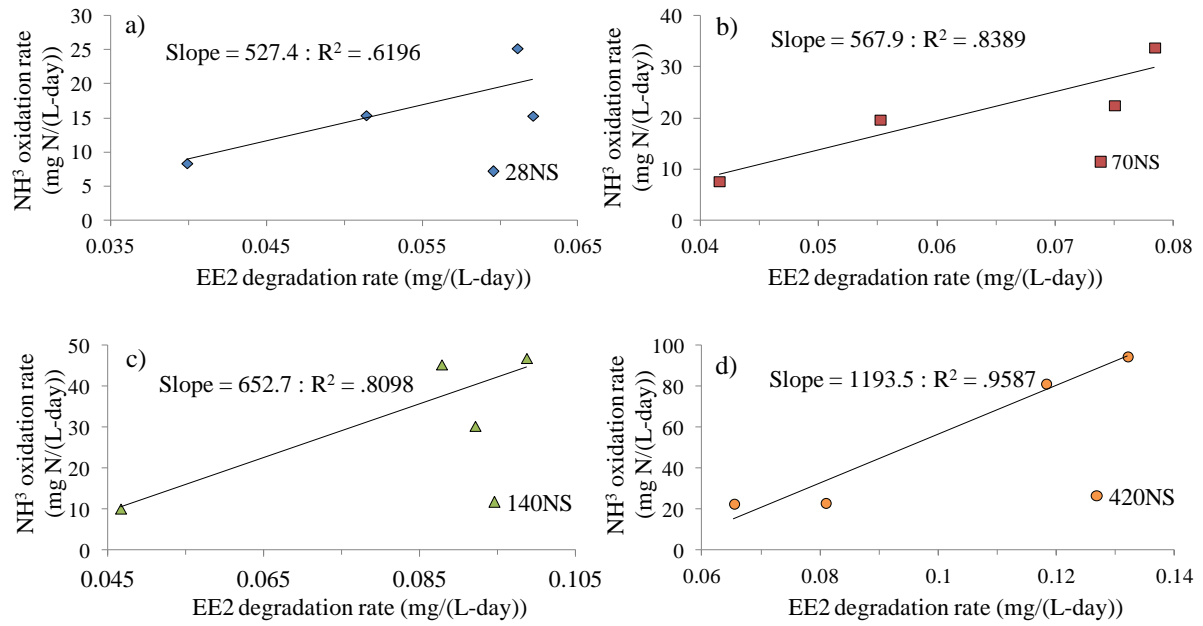
6

7

8

9

10



1

2 **Figure 5.** The relationship between NH_3 and EE2 degradation rate for a) 28 NS b) 70 NS c)

3 140 NS d) 420 NS

4