

تحلیل ساختار جامعه میکروبی موجود در هاضم بی‌هوازی لجن فاضلاب شهری با استفاده از تکنیک توالی یابی نسل بعدی

مهسا صدیقی*: استادیار گروه پژوهشی محیط زیست، پژوهشکده انرژی و محیط زیست، پژوهشگاه نیرو، تهران، ایران.

msedighi@nri.ac.ir

چکیده

کارایی و پایداری فناوری هضم بی‌هوازی، به جوامع میکروبی پیچیده و فعالیت آن‌ها بستگی دارد. تنوع میکروبی، نقش مهمی در عملکرد اکوسیستم‌های طبیعی و مهندسی شده ایفا می‌کند. در دهه گذشته پیشرفت‌های قابل توجهی در شناسایی گروه‌های کلیدی میکروارگانیسم‌ها که بر فرآیندهای هضم بی‌هوازی تأثیر می‌گذارند، حاصل شده است. فناوری توالی‌یابی نسل بعدی که به تازگی توسعه یافته است، می‌تواند برای توصیف کامل جامعه میکروبی هاضم استفاده شود. در تحقیق حاضر، از این تکنیک برای شناسایی و تحلیل ساختار میکروبی موجود در هاضم بی‌هوازی لجن فاضلاب شهری استفاده شده است. در این تحقیق، از جریان لجن خروجی از هاضم بی‌هوازی لجن فاضلاب شهری در بازه‌های زمانی مختلف جهت انجام تست های شناسایی مولکولی با استفاده از فناوری توالی یابی نسل بعدی، نمونه گرفته شد. سپس نمونه‌ها تحت تجزیه و تحلیل توالی‌یابی کل ژنوم قرار گرفتند تا یافته‌هایی در مورد ترکیب ژنتیکی و تنوع جامعه میکروبی (نوع و فراوانی گونه‌ها) به دست آید.

مجموع شاخص‌های تنوع آلفا نشان داد که هاضم بی‌هوازی مورد مطالعه دارای یک جامعه میکروبی غنی، متنوع و نسبتاً متعادل است. بررسی جامعه باکتریایی نشان داد که پروتئوباکتريا و فیرمیکوتس شاخه‌های باکتریایی غالب در هاضم بی‌هوازی هستند، درحالی‌که جامعه آرکی‌ها از انواع متانوزن‌های استوکلاستیک، هیدروژنوتروفیک، و متیلوتروفیک، تشکیل شده بود. متانوتریکس بیشترین فراوانی را در هاضم مورد بررسی داشت. تنوع مناسب باکتری‌ها در هاضم مورد بررسی، بیانگر پایداری مناسب و ظرفیت مطلوب برای انجام فرآیندهای هضم بی‌هوازی و وجود افزونگی عملکردی در جامعه میکروبی است که می‌تواند مقاومت سامانه را در برابر تنش‌ها و تغییرات عملیاتی افزایش دهد. فراوانی بیشتر متانوتریکس نشان می‌دهد که احتمالاً مسیر متان‌زایی استوکلاستیک در هاضم، غالب است. فراوانی بیشتر متانوتریکس همچنین با بهره‌برداری پایدار هاضم در تولید ثابت متان سازگار است. در مجموع تحلیل ساختار میکروبی در کنار شرایط عملیاتی، ویژگی‌های فیزیوشیمیایی هاضم و عملکرد مناسب آن در تولید متان نشان داد که هاضم مورد بررسی به لحاظ پایداری فرایند هضم و تولید ثابت متان در شرایط مطلوبی می‌باشد.

کلمات کلیدی: هضم بی‌هوازی، لجن فاضلاب شهری، ساختار جامعه میکروبی، توالی‌یابی نسل بعدی

مقدمه

به عنوان یک فرآیند تصفیه زیستی، هم کارایی و هم پایداری فناوری هضم بی‌هوازی (AD^۱) به طور بنیادی به جوامع میکروبی پیچیده و فعالیت‌های آن‌ها در هاضم‌ها بستگی دارد. به همین دلیل، در طول سال‌ها، دانشمندان و مهندسان فعال در این حوزه توجه خود را به پاسخ به سوالات اساسی نظیر: (۱) کدام میکروارگانیسم‌ها حضور دارند، (۲) چند نوع مختلف میکروارگانیسم وجود دارد، (۳) کدام میکروارگانیسم‌ها فعال و در حال رشد هستند، (۴) میکروارگانیسم‌ها تحت شرایط محیطی خاص چگونه رفتار می‌کنند، و (۵) ساختار جامعه میکروبی چگونه با عملکرد هاضم مرتبط است، معطوف کرده‌اند. با وجود گزارش‌های متعدد که تأثیر پارامترهای محیطی بر ساختار جامعه میکروبی را توصیف می‌کنند، رویکرد معکوس که تأثیر ساختار جامعه میکروبی بر عملکرد و پایداری هاضم را توصیف می‌کند، کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. محققان به تازگی شروع به استفاده از اطلاعات مربوط به ساختار جامعه میکروبی کرده‌اند تا تأثیرات آن بر عملکرد هاضم را درک یا پیش‌بینی کنند [۱].

تنوع میکروبی، که به طور خاص به عنوان غنای گونه‌ای^۲ (تعداد گونه‌ها) و یکنواختی^۳ (فراوانی نسبی گونه‌ها) اندازه‌گیری می‌شود، نشان داده است که نقش مهمی در عملکرد اکوسیستم‌های طبیعی و مهندسی‌شده ایفا می‌کند. اکوسیستم‌هایی که در آن‌ها چندین ارگانیسم با فراوانی نسبتاً برابر قادر به انجام یک عملکرد زیستی مشابه هستند، به دلیل برخورداری از غنای عملکردی و یکنواختی بالا، از افزونگی عملکردی بیشتری بهره‌مند بوده و در نتیجه ثبات عملکردی بالاتری دارند. این یک نوع بیمه عملکردی برای یک اکوسیستم است که دارای غنای بالا و یکنواختی بر اساس رشد جبرانی باشد. اگر جمعیت یک گونه درون یک گروه عملکردی به دلیل اختلال در سیستم کاهش یابد یا از بین برود، آنگاه گونه دیگری از همان گروه عملکردی، اما با مقاومت بیشتر به اختلال، ممکن است به سرعت جای آن را بگیرد، البته اگر در ابتدا به تعداد کافی وجود داشته باشد [۱].

سیستم‌های بیولوژیکی مهندسی‌شده، مانند هاضم‌های بی‌هوازی، اغلب به ناپایداری عملکردی دچار می‌شوند و به همین دلیل مورد انتقاد قرار می‌گیرند؛ بنابراین، مطالعاتی که به بررسی مقاومت و تاب‌آوری عملکردی سیستم‌های تصفیه بیولوژیکی پس از اختلال می‌پردازند، بر ارتباط تنوع گونه‌ای و یکنواختی با پایداری کلی عملکردی تمرکز کرده‌اند. ویتبول و همکارانش^۴ در مطالعه‌ای بر روی باکتری‌های دنیتریفایر، گزارش دادند که جوامع با یکنواختی بالاتر، نرخ‌های بالاتری از دنیتریفیکاسیون را در مقایسه با جوامع با یکنواختی پایین‌تر در معرض سمیت نمک نشان دادند [۱]. در مقالات دیگری، فرناندز و همکاران^۵ و هاششام و همکاران^۶ در مطالعه اختلال هاضم‌های متان‌زا با استفاده از بارگذاری گلوکز نتیجه‌گیری کردند که پایداری عملکردی بیشتری در جوامعی که چندین میکروارگانیسم درون یک گروه عملکردی مشابه داشتند، مشاهده شد. [۱].

¹ Anaerobic Digestion

² species richness

³ species evenness

⁴ Wittebolle et al.

⁵ Fernandez et al.

⁶ Hashshsam et al.

در دهه گذشته پیشرفت‌های قابل توجهی در شناسایی گروه‌های کلیدی میکروارگانیسم‌ها که بر مراحل تغذیه‌ای هضم بی‌هوازی تأثیر می‌گذارند و همچنین چگونگی تأثیر شرایط محیطی مختلف بر ساختار جامعه میکروبی و عملکرد هاضم صورت گرفته است. کارهای تجربی آینده می‌تواند به گونه‌ای تصور شود که در آن تعداد زیادی از جوامع میکروبی مختلف از هاضم‌های بی‌هوازی کنترل‌شده مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرند و از فناوری توالی‌یابی نسل بعدی (NGS⁷) استفاده شود. فناوری توالی‌یابی نسل بعدی که به تازگی توسعه یافته است، ممکن است یک پیشرفت بزرگ را فراهم کند. در عین حال، به جای تجزیه و تحلیل یک گروه خاص عملکردی یا تاکسونومیکی، توالی‌یابی نسل بعدی می‌تواند برای توصیف کامل جامعه میکروبی هاضم استفاده شود، چه با استفاده از رویکرد متاژنومیک، یا با به کارگیری پرایمرهای جهانی ژن S16 rRNA، یا با سایر رویکردها [2]. داده‌های جامعه میکروبی و عملکرد سپس می‌توانند برای تعیین روابط پیش‌بینی‌کننده، تجربی یا مکانیکی بین ساختار جامعه و توصیف‌کننده‌های عملکرد هاضم، از جمله نرخ تولید متان، استفاده شوند. این یک تلاش ارزشمند و یک گام مهم به جلو در این حوزه خواهد بود.

هدف از انجام این پژوهش، تحلیل ساختار جامعه میکروبی هاضم بی‌هوازی است که برای دستیابی به یک رابطه کمی و پیش‌بینی‌کننده میان ساختار میکروبی و توصیف‌کننده‌های عملکرد هاضم (تولید متان)، ضروری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری در بازه‌های زمانی مختلف

در این پژوهش، هاضم فاضلاب شهری در تصفیه‌خانه فاضلاب جنوب تهران به عنوان هاضم نمونه انتخاب شد. دلیل این امر در مدار قرار گرفتن هاضم مورد نظر پس از لایروبی در هنگام شروع نمونه‌گیری‌ها بود که امکان نمونه‌گیری از این هاضم را به مدت شش ماه با احتمال از مدار خارج شدن کمتری نسبت به هاضم‌های دیگر فراهم می‌کرد. در این مرحله، از جریان لجن خروجی از هاضم، در بازه‌های زمانی مختلف (هر ماه یک نمونه) جهت انجام تست‌های شناسایی مولکولی با استفاده از فناوری توالی‌یابی نسل بعدی (NGS) و تعیین نوع (باکتریایی و آرکی‌ها) و همچنین فراوانی گونه‌ها، نمونه گرفته شد. نمونه‌ها به‌طور مستقیم از جریان خروجی از هاضم مورد بررسی، در بطری‌های پلاستیکی اتوکلاو شده با حجم ۱ لیتر جمع‌آوری شدند. بطری‌های نمونه در یک جعبه یخ قرار داده شدند و به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه، نمونه‌ها پس از هموژن‌سازی، به حجم‌های کمتر تقسیم شده و در دمای ۱۸- درجه سانتیگراد فریز شدند و برای انجام آزمایشات مربوط به آنالیز میکروبی نگهداری شدند. در شکل ۱، مراحل و چگونگی نمونه‌گیری به صورت شماتیک نشان داده شده است (پروتکل استاندارد نمونه‌گیری از لجن هاضم بی‌هوازی). جدول ۱، بیانگر شرایط فرایندی هاضم مورد بررسی در طول دوره نمونه‌برداری می‌باشد.

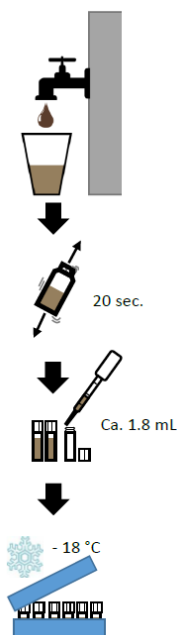
آنالیز میکروبی نمونه‌ها با استفاده از فناوری توالی‌یابی نسل بعدی (NGS)

در این مرحله، نمونه‌های گرفته شده از جریان لجن خروجی هاضم، تحت تجزیه و تحلیل توالی‌یابی کل ژنوم^۸ (WGS) قرار گرفتند تا یافته‌هایی در مورد ترکیب ژنتیکی و تنوع جامعه میکروبی به دست آید. استخراج DNA میکروبی طبق

⁷ Next Generation Sequencing

⁸ whole genome sequencing

روش‌شناسی ارائه شده توسط رمضانی و همکاران انجام شد [۳]. توالی‌یابی DNA ژنومی بر روی پلتفرم Illumina Hiseq High Output با طول خوانش ۲ * ۱۵۰ bp انجام شد که توسط شرکت Novogene مستقر در بریتانیا تسهیل



شکل ۱- شماتیک پروتکل استاندارد نمونه‌گیری از لجن هاضم بی‌هوازی.

Figure 1- Schematic of the standard sampling protocol for anaerobic digester sludge.

گردید. پس از کنترل کیفیت داده‌های حاصل از توالی‌یابی کل ژنوم، تحلیل تاکسونومیک نمونه‌ها با استفاده از پلتفرم‌های MG-RAST و OneCodex انجام شد. در هر دو پلتفرم، فراوانی نسبی تاکسون‌ها بر اساس نسبت تعداد خوانش‌های تخصیص‌یافته به هر تاکسون به کل خوانش‌های طبقه‌بندی‌شده محاسبه و به‌صورت درصد گزارش شد. نمودارهای تاکسونومیک مورد استفاده در این مطالعه بر اساس خروجی همین پلتفرم‌ها و در سطوح مختلف رده‌بندی (شاخه، جنس) تهیه شدند.

MG-RAST یکی از پرکاربردترین سامانه‌های متن‌باز برای تحلیل داده‌های متاژنومیک است که امکان کنترل کیفیت داده‌ها، حذف توالی‌های مصنوعی و آلاینده، پیش‌بینی ژن‌ها، طبقه‌بندی تاکسونومیک و حاشیه‌نویسی عملکردی را فراهم می‌کند. در این سامانه، طبقه‌بندی تاکسونومیک بر اساس هم‌ترازی توالی‌ها با پایگاه‌های داده مرجع انجام می‌شود و امکان تعیین فراوانی نسبی میکروارگانیسم‌ها در سطوح مختلف رده‌بندی فراهم می‌شود. علاوه بر این، MG-RAST قابلیت تحلیل عملکردی ژن‌ها و مسیرهای متابولیکی را نیز در اختیار پژوهشگر قرار می‌دهد [۴و۵].

به‌منظور افزایش دقت در شناسایی گونه‌ها، داده‌های WGS همچنین در پلتفرم One Codex مورد تحلیل قرار گرفتند. One Codex با مقایسه قطعات کوتاه توالی با پایگاه داده‌ای گسترده از ژنوم‌های مرجع میکروبی، شناسایی تاکسونومیک را با قدرت تفکیک بالا، به‌ویژه در سطح گونه، انجام می‌دهد. این سامانه علاوه بر تعیین فراوانی نسبی تاکسون‌ها، شاخص‌های

متداول تنوع زیستی از جمله شاخص‌های شانون^۹، جینی-سیمپسون^{۱۰}، کائو^{۱۱} و مقدار پوشش^{۱۲} را نیز محاسبه می‌کند که به ترتیب برای ارزیابی تنوع گونه‌ای، یکنواختی جامعه، برآورد غنای گونه‌ای و کفایت عمق توالی‌یابی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۶].

به منظور افزایش قابلیت اطمینان نتایج، طبقه‌بندی تاکسونومیکی حاصل از دو پلتفرم با یکدیگر مقایسه شد و نتایج نهایی بر اساس خروجی‌های همسو و قابل تأیید مورد تفسیر قرار گرفت.

جدول ۱- شرایط عملیاتی و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی هاضم مورد بررسی

Table 1- Operating conditions and physicochemical characteristics of the studied digester

هاضم مورد بررسی	
پارامترها	مقادیر
ظرفیت هاضم (m^3)	۸۹۰۰
pH	۷
دما ($^{\circ}C$)	۳۷/۷
میزان خوراک‌دهی (m^3/day)	۳۴۵
زمان ماند هیدرولیکی (days)	۲۶
نرخ بارگذاری آلی ($kg\ COD/m^3 \cdot day$)	۲/۳
جامد خشک (%)	۵/۲
جامد فرار (%)	۸۰/۶
اسید چرب فرار ($mg\ CH_3COOH/l$)	۲۲۴۳
قلیائیت ($mg\ CaCO_3/l$)	۵۴۲۴
نرخ تولید بیوگاز (m^3/day)	۴۴۵۵
محتوای متان (%)	۶۷/۴۲

نتایج

تحلیل ساختار جامعه میکروبی هاضم

همانطور که پیش‌تر نیز اشاره شد، تنوع میکروبی، که به‌طور خاص به‌عنوان غنای گونه‌ای (تعداد گونه‌ها) و یکنواختی (فراوانی نسبی گونه‌ها) اندازه‌گیری می‌شود، نقش مهمی در عملکرد اکوسیستم‌های طبیعی و مهندسی‌شده ایفا می‌کند. اکوسیستم‌هایی که شامل بیش از یک ارگانیسم قادر به انجام یک عملکرد خاص (غنای بالا) با فراوانی نسبتاً برابر (یکنواختی بالا) هستند،

⁹ Shannon

¹⁰ Gini-Simpson

¹¹ Chao1

¹² Good's Coverage

احتمال بیشتری برای داشتن افزونگی عملکردی یا ثبات عملکردی دارند. بر این اساس در این بخش، ابتدا تنوع میکروبی در لجن خروجی از هاضم مورد بررسی قرار گرفته است. سپس، ساختار جامعه میکروبی در هاضم به تفصیل مورد تحلیل قرار گرفته است.

بررسی تنوع میکروبی (تعداد و فراوانی نسبی گونه‌ها) در هاضم مورد بررسی

توالی‌یابی کل ژنوم بر روی نمونه‌های لجن خروجی از هاضم، به منظور تجزیه و تحلیل جامعه میکروبی انجام شد. این آزمون با هدف بررسی تأثیر محیط چالش‌برانگیز درون هاضم بر ترکیب جامعه میکروبی انجام شد. شاخص‌های تنوع میکروبی به‌دست‌آمده از نمونه‌های لجن هاضم بی‌هوازی، اطلاعات مهمی درباره ساختار جامعه میکروبی، غنای گونه‌ای، یکنواختی توزیع جمعیت‌ها و میزان کفایت نمونه‌برداری توالی‌یابی ارائه می‌کنند. نتایج بدست آمده، در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲- شاخص‌های تنوع آلفا جامعه میکروبی در لجن خروجی هاضم بی‌هوازی

Table 2- Alpha diversity indices of microbial community in anaerobic digester sludge

نمونه	OTUs	Shannon	Simpson	Chao1	Coverage (%)
لجن خروجی از هاضم	۵۸۳۸۶۷	۴/۷۷ ± ۰/۷۲	۰/۸۵ ± ۰/۰۹	۱۱۷۷ ± ۲۰۹/۶	۹۹

در فرآیند هضم بی‌هوازی، عملکرد سیستم وابسته به یک کنسرسیوم پیچیده از باکتری‌ها و آرکی‌ها است که به‌صورت هماهنگ در مراحل هیدرولیز، اسیدزایی، استات‌زایی و متان‌زایی فعالیت می‌کنند [۷۰]. شاخص مقدار پوشش میزان کفایت عمق توالی‌یابی را نشان می‌دهد و بیانگر سهم جمعیت میکروبی است که توسط داده‌های توالی‌یابی پوشش داده شده‌اند. مقدار پوشش^{۱۳} برابر ۹۹٪ نشان می‌دهد عمق توالی‌یابی کافی بوده و تقریباً تمام تنوع میکروبی موجود در نمونه شناسایی شده است. مقادیر بالای پوشش توالی‌یابی بیانگر قابلیت اعتماد بیشتر شاخص‌های تنوع و کاهش احتمال عدم شناسایی تاکسون‌های مهم است [۸].

شاخص کائو ۱ یک برآوردگر غیرپارامتری برای غنای گونه‌ای است که تعداد گونه‌های مشاهده‌نشده را نیز بر اساس گونه‌های نادر تخمین می‌زند [۹]. شاخص کائو ۱ برابر ۱۱۷۷ نشان‌دهنده غنای گونه‌ای بالا در هاضم بی‌هوازی است. این شاخص تخمینی از تعداد کل تاکسون‌های موجود در جامعه میکروبی ارائه می‌دهد و مقدار بالای آن بیانگر حضور تعداد زیادی گروه میکروبی در لجن هاضم است. غنای گونه‌ای بالا معمولاً با وجود مسیرهای متابولیکی متنوع و توانایی بیشتر سیستم در پاسخ به تغییرات محیطی مرتبط است [۸].

¹³ coverage

شاخص شانون علاوه بر تعداد گونه‌ها، یکنواختی توزیع فراوانی آن‌ها را نیز در نظر می‌گیرد و یکی از متداول‌ترین شاخص‌های ارزیابی تنوع زیستی محسوب می‌شود [۹]. شاخص شانون برابر $4/77$ نشان‌دهنده تنوع میکروبی نسبتاً زیاد است. شاخص شانون هم غنای گونه‌ای و هم یکنواختی توزیع گونه‌ها را در نظر می‌گیرد؛ بنابراین مقدار $4/77$ بیانگر وجود یک جامعه میکروبی پیچیده با پراکنش نسبتاً متعادل جمعیت‌ها است. در سامانه‌های هضم بی‌هوازی، تنوع بیشتر معمولاً با پایداری عملکردی بالاتر، مقاومت بیشتر در برابر شوک‌های عملیاتی و حفظ کارایی تولید بیوگاز ارتباط دارد [۱].

شاخص سیمپسون میزان غالب بودن گونه‌های خاص در جامعه را ارزیابی می‌کند و به یکنواختی توزیع جمعیت حساس است [۹]. مقدار سیمپسون برابر $0/85$ نیز نشان می‌دهد که جامعه میکروبی تحت سلطه تعداد محدودی میکروارگانیسم قرار ندارد و توزیع جمعیت میکروبی نسبتاً متعادل است. شاخص سیمپسون برای ارزیابی غالب بودن گونه‌ها و یکنواختی جامعه کاربرد دارد و مقادیر بالاتر آن معمولاً نشان‌دهنده تنوع مطلوب‌تر و کاهش احتمال غلبه یک گروه محدود از میکروارگانیسم‌ها است [۸].

تعداد بالای OTUs نیز بیانگر پیچیدگی بالای جامعه میکروبی است. مطالعات مختلف بر روی هاضم‌های بی‌هوازی نشان داده‌اند که این سامانه‌ها معمولاً دارای جوامع میکروبی بسیار متنوع شامل گروه‌های مختلف باکتریایی و آرکیایی هستند که در آن شاخه‌های باکتریایی مانند فرمیکیوتس^{۱۴}، پروتئوباکتیریا^{۱۵}، باکترویدیتس^{۱۶} و کلروفلکسی^{۱۷} غالب بوده و آرکی‌های متان‌ساز نقش کلیدی در تولید متان ایفا می‌کنند [۱۱].

نتایج حاصل از این پژوهش با گزارش طهماسبی و علی‌اصغری و شاره در مطالعه هاضم بی‌هوازی پسماند شهری، که از همین شاخص‌ها برای ارزیابی تنوع آلفای جامعه میکروبی استفاده کرده‌اند، همخوانی دارد [۱۰]. بر اساس مجموع شاخص‌های به‌دست‌آمده، می‌توان نتیجه گرفت که هاضم بی‌هوازی مورد مطالعه دارای یک جامعه میکروبی غنی، متنوع و نسبتاً متعادل است که احتمالاً از نظر عملکردی دارای پایداری مناسب و ظرفیت مطلوب برای انجام فرآیندهای هیدرولیز، اسیدزایی، استات‌زایی و متان‌زایی است. همچنین چنین ساختاری معمولاً بیانگر وجود افزونگی عملکردی در جامعه میکروبی است که می‌تواند مقاومت سامانه را در برابر تنش‌ها و تغییرات عملیاتی افزایش دهد [۱].

البته باید توجه داشت که شاخص‌های شانون، سیمپسون، کائو و OTU تنها تنوع آلفا را توصیف می‌کنند و برای شناسایی دقیق ساختار جامعه میکروبی (مانند تعیین جنس‌ها یا گونه‌های غالب) به داده‌های ترکیب تاکسونومیک نیاز است [۱۱].

بررسی ترکیب و ساختار جامعه میکروبی در هاضم مورد بررسی

جامعه باکتری‌ها

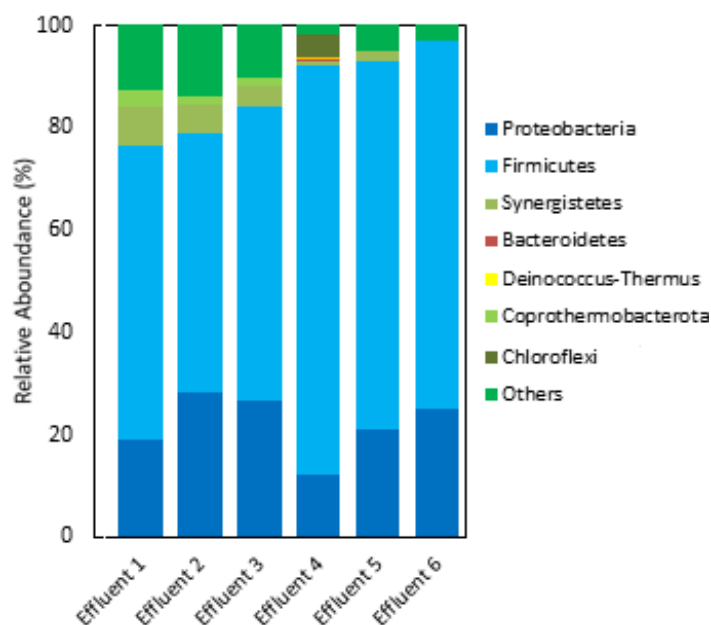
¹⁴ Firmicutes

¹⁵ Proteobacteria

¹⁶ Bacteroidetes

¹⁷ Chloroflexi

نتایج بررسی جامعه میکروبی در جریان لجن خروجی از هاضم در سطح شاخه (phylum)، در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که نماینده فیلاها در جریان لجن خروجی شامل پروتئوباکتیریا (۲۲/۰۳٪)، فرمیکوتس (۶۴/۹۳٪)، سینرگیستتر^{۱۸} (۳/۲۴٪)، باکتریدیتس (۰/۰۸٪)، کوپروتروموباکتروتا^{۱۹} (۰/۰۱٪)، و کلروفلکسی (۰/۷۶٪) می‌باشد. همان‌طور که در شکل نشان داده شده است، دو فیلای غالب در جریان لجن خروجی، پروتئوباکتیریا و فرمیکوتس می‌باشند. پروتئوباکتیریا، یک شاخه متنوع از باکتری‌های گرم منفی، نقش مهمی در فرآیندهای هضم بی‌هوازی ایفا می‌کنند. این شاخه به خاطر تنوع متابولیکی خود شناخته می‌شود و شامل چندین کلاس است که گاما پروتئوباکتیریا^{۲۰} و دلتا پروتئوباکتیریا^{۲۱} به‌ویژه در محیط‌های بی‌هوازی تأثیرگذار هستند. پروتئوباکتیریاها در تجزیه مواد آلی پیچیده، از جمله سلولز و پروتئین‌ها، نقش دارند. آن‌ها به مرحله هیدرولیز در هضم بی‌هوازی کمک می‌کنند و این زیرمجموعه‌ها را به ترکیبات ساده‌تر تبدیل می‌کنند که سپس توسط متان‌سازها برای تولید متان استفاده می‌شود [۱۲ و ۱۳]. بسیاری از پروتئوباکتیریاها در شراکت‌های سینتروفیک با



شکل ۲- فراوانی نسبی شاخه‌های باکتریایی شناسایی شده بر اساس داده‌های توالی‌یابی کل ژنوم. فراوانی هر شاخه بر اساس درصد خوانش‌های طبقه‌بندی شده محاسبه شده است. شاخه‌هایی که در هر نمونه کمتر از ۱٪ از کل فراوانی نسبی را تشکیل داده‌اند، در گروه "سایرین" ادغام شده‌اند.

Figure 2- Relative abundance of bacterial phyla identified by whole-genome shotgun sequencing (WGS). Relative abundance was calculated based on the percentage of classified reads assigned

¹⁸ Synergistetes

¹⁹ Coprothermobacterota

²⁰ Gammaproteobacteria

²¹ Deltaproteobacteria

to each phylum. Taxa representing less than 1% relative abundance in each sample were grouped as "Others".

آرکی‌های متان‌زا شرکت می‌کنند. آن‌ها انتقال الکترون بین گونه‌ها را تسهیل می‌کنند، عمدتاً از طریق تولید هیدروژن که متان‌سازها از آن برای تولید متان استفاده می‌کنند. این تعامل متابولیکی برای حفظ غلظت‌های پایین هیدروژن حیاتی است و به این ترتیب تولید کارآمد متان را ترویج می‌کند [۱۳]. ترکیب جوامع میکروبی در هاضم‌های بی‌هوازی می‌تواند در طول زمان به طور قابل توجهی تغییر کند. به عنوان مثال، در یک مطالعه که مراحل مختلف هضم را بررسی می‌کرد، پروتئوباکتیریا نسبت‌های متفاوتی از میکروبیوم را نمایندگی می‌کردند (تا ۲۳/۹٪ در هفته ششم) اما با افزایش تسلط گروه‌های باکتریایی دیگر، کاهش نشان دادند. این موضوع نقش آن‌ها را در مراحل اولیه هضم نشان می‌دهد و ماهیت پویای جمعیت‌های میکروبی در سیستم‌های هضم بی‌هوازی را برجسته می‌کند [۱۲].

به عنوان بی‌هوازی‌های اختیاری، بسیاری از پروتئوباکتری‌ها می‌توانند در شرایط هوازی و بی‌هوازی رشد کنند. این سازگاری به آن‌ها اجازه می‌دهد تا در نواحی مختلف درون هاضم که سطح اکسیژن نوسان دارد، زندگی کنند و به پایداری و استحکام جامعه میکروبی کمک کنند [۱۴]. حضور و فعالیت پروتئوباکتری‌ها می‌تواند به طور قابل توجهی بر کارایی سیستم‌های هضم بی‌هوازی تأثیر بگذارد. آن‌ها در چرخه مواد مغذی درون هاضم شرکت دارند و به حفظ یک محیط بهینه برای سایر میکروارگانیسم‌ها کمک می‌کنند. برخی از اعضای این گروه، با ایجاد رقابت و جلوگیری از رشد باکتری‌های پاتوژن، به بهبود سلامت کلی جامعه میکروبی کمک می‌کنند [۱۵]. با تسهیل تجزیه زیرلایه‌های آلی و حمایت از فرایندهای متانوژنی، پروتئوباکتری‌ها به طور مستقیم به تولید بیوگاز کمک می‌کنند که یک عامل حیاتی برای قابلیت اقتصادی سیستم‌های هضم بی‌هوازی است [۱۶].

شاخه فرمیکیتوس نقش مهمی در هضم بی‌هوازی لجن فاضلاب ایفا می‌کند و به تجزیه مواد آلی و تولید متان کمک می‌کند. باکتری‌های فرمیکیتوس، به‌ویژه اعضای کلاس کلاستریدا^{۲۲}، باکتری‌های هیدرولیتیکی حیاتی هستند که ترکیبات آلی پیچیده را به مولکول‌های ساده‌تر تجزیه می‌کنند. این هیدرولیز یک مرحله‌ی اولیه‌ی حیاتی در هضم بی‌هوازی است، جایی که زیرلایه‌های پیچیده به اسیدهای چرب فرار (VFAs^{۲۳}) و سایر واسطه‌ها تبدیل می‌شوند که می‌توانند توسط آرکی‌های متان‌ساز بیشتر پردازش شوند [۱۷]. فرمیکوت‌ها اغلب در روابط سینتروفیک با آرکی‌های متان‌ساز درگیر هستند. آن‌ها هیدروژن و اسیدهای چرب فرار تولید می‌کنند که سپس توسط متان‌سازها برای تولید متان استفاده می‌شود. این انتقال هیدروژن بین گونه‌ها برای حفظ اکوسیستم بی‌هوازی و اطمینان از تولید مؤثر بیوگاز حیاتی است [۱۸]. جنس‌هایی مانند *کاندیداتوس کلواکاموناس*^{۲۴} که در شاخه فرمیکیتوس شناسایی شده‌اند، به عنوان باکتری‌های سینتروفیک تولیدکننده هیدروژن شناخته شده‌اند که با تسهیل این تبادلات متابولیکی، کارایی هضم بی‌هوازی را افزایش می‌دهند [۱۷]. در مطالعاتی که به تحلیل ساختارهای جامعه میکروبی در سیستم‌های هضم بی‌هوازی پرداخته‌اند، مشخص شده است که فرمیکوت‌ها یکی از شاخه‌های غالب هستند و معمولاً بخش قابل توجهی از جامعه باکتریایی را در کنار باکتریویدیتس و پروتئوباکتیریا تشکیل

²² Clostridia

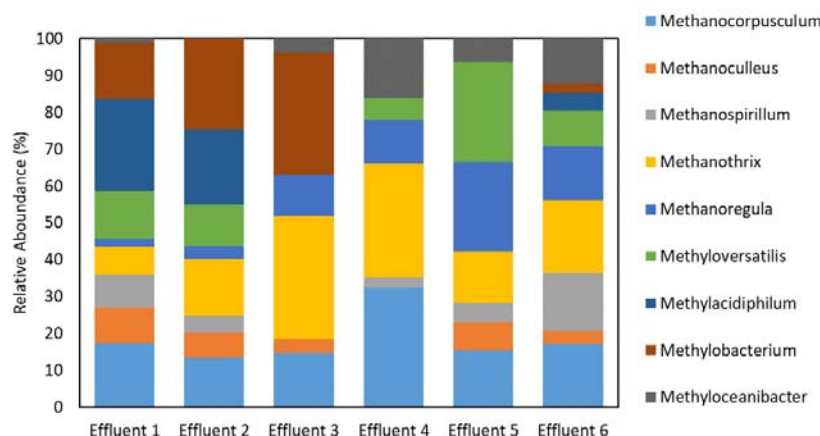
²³ Volatile Fatty Acids

²⁴ Candidatus Cloacamonas

می‌دهند [۱۶و۱۲]. حضور آن‌ها به ثبات و تاب‌آوری جامعه میکروبی کمک می‌کند که برای عملکرد پایدار هاضم ضروری است. تنوع در ترکیب جامعه می‌تواند بر اساس شرایط عملیاتی مانند تغذیه با سوبستراهای مشترک رخ دهد؛ با این حال، فرمیکیتوس به طور کلی حضور ثابتی را حفظ می‌کنند که نشان‌دهنده سازگاری و اهمیت آن‌ها در محیط‌های مختلف هضم بی‌هوازی است [۱۶و۱۸]. در مطالعه حاضر نیز این پدیده مشاهده می‌شود. حضور باکتری‌های فرمیکیتوس به پایداری هاضم‌های بی‌هوازی کمک می‌کند. توانایی آن‌ها در سازگاری با شرایط محیطی متغیر به حفظ عملکرد هاضم در طول زمان کمک می‌کند، حتی زمانی که تحت نوسانات در ترکیب زیرلایه یا پارامترهای عملیاتی قرار می‌گیرند [۱۶]. تنوع در شاخه فرمیکیتوس ظرفیت عملکردی هاضم‌های بی‌هوازی را افزایش می‌دهد. گونه‌های مختلف ممکن است به هدف قرار دادن زیرلایه‌های مختلف بپردازند و در نتیجه کارایی کلی تجزیه و تولید بیوگاز را بهبود بخشند [۱۷]. غالب بودن این شاخه در هاضم مورد بررسی، می‌تواند یکی از دلایل پتانسیل بالای تولید بیوگاز در این هاضم باشد (مطابق جدول ۱).

جامعه آرکی‌ها

متانوژن‌های غالب در هاضم مورد بررسی، در شکل ۳ نشان داده شده‌اند. همانطور که در شکل نشان داده شده است، متانوژن‌های غالب در هاضم شامل ۱۸/۴۱٪ متانوکورپوسکولوم^{۲۵}، ۵/۲۶٪ متانوکولیوس^{۲۶}، ۶/۱۸٪ متانواسپیریلیوم^{۲۷}، ۲۰/۱۹٪ متانوتریکس^{۲۸}، ۱۱/۲۳٪ متانورگولا^{۲۹}، ۱۱/۱۳٪ متیلورساتیلیس^{۳۰}، ۱۶/۶۹٪ متیل‌اسیدیفیلوم^{۳۱}، ۱۲/۶۱٪ متیلوباکتریوم^{۳۲}، و ۶/۵۹٪ متیل‌اوئسنی‌باکتر^{۳۳} می‌باشند.



²⁵ *Methanocorpusculum*

²⁶ *Methanoculleus*

²⁷ *Methanospirillum*

²⁸ *Methanotherix*

²⁹ *Methanoregula*

³⁰ *Methyloversatilis*

³¹ *Methylacidiphilum*

³² *Methylobacterium*

³³ *Methyloceanibacter*

شکل ۳- متانوزن‌های غالب در هاضم مورد بررسی در سطح جنس

Figure 3- Dominant methanogens at the genus level in the studied digester.

با توجه به شکل ۳، مشخص می‌شود که جامعه آرکئایی هاضم مورد بررسی که در مرحله تولید متان نقش مؤثری دارد، از انواع متانوزن‌های استوکلاستیک، هیدروژنوتروفیک، و متیلوتروفیک، تشکیل شده است. متانوزن‌ها متان را از طریق چندین مسیر متمایز تولید می‌کنند:

متان‌زایی هیدروژنوتروفیک: که شامل کاهش CO_2 با استفاده از H_2 به عنوان اهداکننده الکترون می‌باشد؛
متان‌زایی استوکلاستیک: که شامل تجزیه استات است؛ و

متان‌زایی متیلوتروفیک: که از ترکیبات متیله شده مانند متانول یا متیل‌آمین‌ها استفاده می‌کند [۱۹].

این مسیرها به متانوزن‌ها اجازه می‌دهند تا در محیط‌های مختلف بی‌هوازی، از واحدهای بیوگاز کشاورزی تا روده انسان، به خوبی رشد کنند و نقش حیاتی در چرخه کربن جهانی و تولید بیوانرژی ایفا کنند.

در مورد متان‌زایی استوکلاستیک، انتظار می‌رود که استات به‌طور مستقیم توسط متانوزن‌های استوکلاستیک به متان تبدیل شود. با این حال، بخشی از استات (بسته به شرایط هاضم)، می‌تواند توسط باکتری‌های سینتروفیک اکسیدکننده استات، به گاز هیدروژن و CO_2 اکسید شود؛ به جای اینکه به‌طور مستقیم توسط متانوزن‌های استوکلاستیک به متان تبدیل شود. اکسیداسیون سینتروفیک استات به H_2 و CO_2 از نظر ترمودینامیکی بسیار نامطلوب است و تنها می‌تواند در مقادیر بسیار پایین فشار جزئی H_2 ، یعنی بین $2/6$ و 74 Pa ، انجام شود. تنها در این بازه باریک از غلظت‌های گاز هیدروژن، اکسیداسیون سینتروفیک استات و متان‌زایی هیدروژنوتروفیک بعدی (SAO-HM^{34}) از نظر ترمودینامیکی ممکن است. بنابراین، باکتری‌های اکسیدکننده استات به ارگانسیم‌های شریک نیاز دارند که آن‌ها را در متانوزن‌های هیدروژنوتروفیک پیدا می‌کنند [۲۰].

اختلالات مختلفی باعث تغییر در مسیر تجزیه استات از شکست مستقیم استات به سمت اکسیداسیون سینتروفیک استات همراه با متان‌زایی هیدروژنوتروفیک می‌شود. غلظت‌های بالای آمونیاک در محدوده ۳۰۰۰ میلی‌گرم برلیتر، افزایش نرخ بارگذاری آلی که منجر به انباشت اسیدهای چرب، به‌ویژه اسید استیک می‌شود و افزایش غلظت استات انباشته شده تا مقدار ۳۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، دمای هاضم (دماهای ترموفیلیک) و افزایش زمان ماند هیدرولیکی، از عوامل این تغییر مسیر به شمار می‌آیند [۲].

با توجه به شکل ۳، متانوتریکس (که به متانوسائتا^{۳۵} نیز شناخته می‌شود)، بیشترین فراوانی را در هاضم مورد بررسی دارا بوده است. فراوانی این جنس می‌تواند بیانگر شرایطی باشد که با غلبه مسیر متان‌زایی استوکلاستیک (شکست مستقیم استات) (شکل ۴) و بهره‌برداری پایدار هاضم در تولید ثابت متان سازگار است (مطابق جدول ۱)؛ اگرچه، این موضوع به‌تنهایی برای

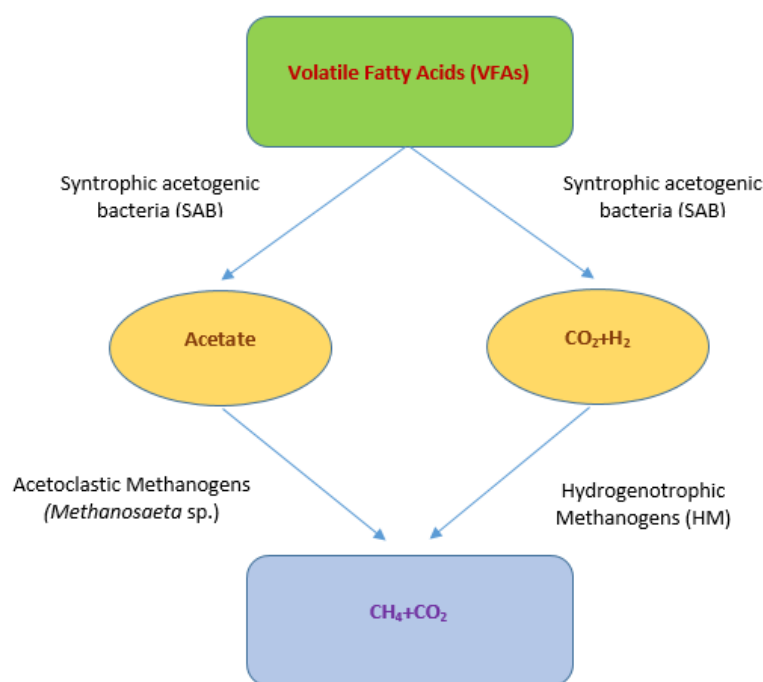
³⁴ syntrophic acetate oxidation and hydrogenotrophic methanogenesis

³⁵ *Methanosaeta*

اثبات عدم وجود اختلالات عملیاتی کافی نیست و باید همراه با سایر شواهد ارزیابی شود. از طرف دیگر، حضور انواع متانوزن‌های هیدروژنوتروفیک و متیلوتروفیک نشان می‌دهد که سایر مسیرهای تولید متان نیز فعال می‌باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

به عنوان یک فرآیند تصفیه زیستی، هم کارایی و هم پایداری فناوری هضم بی‌هوازی به طور بنیادی به جوامع میکروبی پیچیده و فعالیت‌های آن‌ها در هاضم‌ها بستگی دارد. در این پژوهش، ساختار جامعه میکروبی هاضم فاضلاب شهری در تصفیه‌خانه فاضلاب جنوب تهران، مورد بررسی قرار گرفته است. برای این منظور مراحل مختلفی شامل نمونه‌گیری از لجن داخل هاضم در بازه‌های زمانی مختلف (هر ماه)، آنالیز میکروبی نمونه‌ها جهت تعیین نوع و فراوانی گونه‌های اصلی و در نهایت تحلیل ساختار جامعه میکروبی هاضم بی‌هوازی، انجام شد.



شکل ۴- مسیرهای احتمالی تولید متان در هاضم مورد بررسی

Figure 4- Possible methane production pathways in the studied digester.

تحلیل جامعه باکتریایی هاضم نشان داد که باکتری‌های حاضر در مراحل هیدرولیز، اسیدسازی و استات‌سازی از تنوع و فراوانی مناسبی برخوردار هستند. مقادیر شاخص‌های تنوع زیستی نیز این موضوع را تأیید می‌کنند و بیانگر وجود یک جامعه میکروبی متنوع و نسبتاً یکنواخت هستند. چنین ساختاری موجب افزایش افزونگی عملکردی شده و توانایی هاضم را برای حفظ عملکرد در برابر نوسانات محیطی افزایش می‌دهد. در نتیجه، ظرفیت تولید متان و پایداری فرآیند هضم بی‌هوازی در طول زمان حفظ می‌شود. این یافته با نتایج مطالعات پیشین همخوانی دارد که نشان دادند تنوع بالاتر جامعه میکروبی با افزایش پایداری عملکرد هاضم و مقاومت بیشتر در برابر تنش‌های عملیاتی همراه است [۲۱ و ۲۲].

در این پژوهش، پروتئوباکتريا و فرمیکوتس به عنوان شاخه‌های غالب باکتریایی شناسایی شدند. غالب بودن این دو شاخه در بسیاری از هاضم‌های بی‌هوازی شهری و صنعتی نیز گزارش شده است. باکتری‌های متعلق به شاخه فرمیکوتس نقش مهمی در هیدرولیز پلیمرهای آلی و تولید اسیدهای چرب فرار دارند، در حالی که بسیاری از اعضای پروتئوباکتريا در تجزیه ترکیبات آلی محلول و تولید پیش‌سازهای مورد نیاز متانوژن‌ها مشارکت می‌کنند. این نتایج با گزارش‌های پیشین مطابقت دارد [۲۳ و ۲۴].

نتایج حاصل از تحلیل جامعه آرکئایی نشان داد که انواع متانوژن‌های استوکلاستیک، هیدروژنوتروفیک و متیلوتروفیک در هاضم حضور دارند، اما متانوتریکس (متانوسائتا) بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داده است. غالب بودن این جنس معمولاً نشان‌دهنده غالب بودن مسیر متان‌زایی استوکلاستیک در شرایط بهره‌برداری پایدار و غلظت‌های نسبتاً پایین استات و آمونیاک است. مطالعات متعددی گزارش کرده‌اند که در هاضم‌هایی با عملکرد پایدار، زمان ماند مناسب و غلظت پایین آمونیاک آزاد، فراوانی متانوتریکس نسبت به سایر متانوژن‌ها بیشتر است [۲۵ و ۲۶]. در پژوهش حاضر نیز شرایط عملیاتی و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی هاضم، از جمله pH، دما و سایر پارامترهای بهره‌برداری، با این یافته همخوانی داشته و از غالب بودن مسیر استوکلاستیک حمایت می‌کنند.

در مقابل، حضور متانوژن‌های هیدروژنوتروفیک و متیلوتروفیک نشان می‌دهد که علاوه بر مسیر استوکلاستیک، سایر مسیرهای متان‌زایی نیز در هاضم فعال هستند. فعال بودن هم‌زمان چند مسیر متان‌زایی، انعطاف‌پذیری متابولیکی جامعه آرکئایی را افزایش داده و پایداری فرآیند را در برابر تغییرات شرایط بهره‌برداری تقویت می‌کند. چنین ساختاری در بسیاری از هاضم‌های بی‌هوازی با عملکرد پایدار نیز گزارش شده است [۲۲].

به‌طور کلی، نتایج حاصل از تحلیل جامعه میکروبی، در کنار شرایط عملیاتی، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی هاضم و عملکرد مناسب آن در تولید متان، نشان می‌دهد که هاضم مورد مطالعه از یک جامعه میکروبی پایدار و متنوع برخوردار است. این یافته‌ها با نتایج مطالعات پیشین در زمینه هاضم‌های بی‌هوازی شهری همخوانی دارد، هرچند ترکیب نسبی برخی تاکسون‌ها می‌تواند تحت تأثیر عواملی نظیر نوع خوراک، زمان ماند هیدرولیکی، دمای بهره‌برداری و شرایط محیطی هر هاضم متفاوت باشد.

قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی شرکت فاضلاب تهران انجام شده است. از همین رو، نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به این سازمان ابراز نمایند. نویسندگان همچنین از مساعدت‌های ارزشمند ارائه شده توسط تصفیه‌خانه فاضلاب جنوب تهران در راستای تحقق اهداف تحقیق، سپاسگزاری می‌کنند.

References

- [1] Venkiteshwaran, K., Bocher, B., Maki, J., Zitomer, D., Relating Anaerobic Digestion Microbial Community and Process Function. *Microbiology Insights*. 2016; 8(S2): 37-44. <https://doi.org/10.4137/MBI.S33593>.
- [2] Amekan, Y., The Influence of Microbial Community Dynamics on Anaerobic Digestion Efficiency and Stability: A Review. *International Journal of Renewable Energy Development*. 2020; 9(1): 85-95. <https://doi.org/10.14710/ijred.9.1.85-95>.
- [3] Ramezani, M., Zamir, S.M., Treatment of nitrous oxide in a trickling bioreactor in the presence of glucose or phenol as the carbon source: performance, kinetic study, and characterization of microbial community shift. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2022; 10(6): 108763. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108763>.
- [4] Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E. M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., Wilkening, J., & Edwards, R. A., The metagenomics RAST server: A public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*. 2008; 9, 386. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-386>.
- [5] Keegan, K. P., Glass, E. M., & Meyer, F., MG-RAST, a metagenomics service for analysis of microbial community structure and function. In F. Martin & S. Uroz (Eds.), *Microbiome Analysis: Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology, Vol. 1399, pp. 207–233). Humana Press. 2016; https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3369-3_13.
- [6] Minot, S. S., Krumm, N., & Greenfield, N. B., One Codex: A sensitive and accurate data platform for genomic microbial identification. *bioRxiv*. 2016; <https://doi.org/10.1101/027607>.
- [7] Appels, L., Baeyens, J., Degreè, J., Dewil, R., Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2008; 34(6): 755–781. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2008.06.002>.
- [8] Haegeman, B., Hamelin, J., Moriarty, J., Neal, P., Dushoff, J., Weitz, J. S., Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. *The ISME Journal*. 2013; 7(6): 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.10>.
- [9] Chaudhari, H. G., Wardah, Z. H., Sagar, P. R., Prajapati, V. S., Mangrola, A. V., & Raol, G. G., A preliminary report on bacterial diversity in solar salterns located at the Gulf of Khambhat, India using 16S amplicon sequencing. *Heliyon*. 2025; 11, e44103. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e44103>.
- [10] Tahmasebi, M., & Aliasghari Veshareh, A., Study of the microbial population in the anaerobic digester of Isfahan's municipal solid waste using next-generation sequencing technique. *Journal of Microbial Biology*, 2026; 15(57), 17–32. <https://doi.org/10.22108/bjm.202.6.147268.1658>.
- [11] Nelson, M. C., Morrison, M., Yu, Z., A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. *Bioresour Technol*, 2011; 102(4), 3730–3739. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.119>.
- [12] Loughrin, J.H., Parekh, R.R., Agga, G.E., Silva, P.J., Sistani, K.R., Microbiome Diversity of Anaerobic Digesters Is Enhanced by Microaeration and Low Frequency Sound. *Microorganisms*. 2023; 11(9): 2349. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092349>.
- [13] Abid, N., Karray, F., Kallel, I., Slim, M., Role of biochar in anaerobic microbiome enrichment and methane production enhancement during olive mill wastewater biomethanization. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023; 10: 1100533. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1100533>.
- [14] Gouveia, M.I.M., Bernalier-Donadille, A., Jubelin, G., Enterobacteriaceae in the Human elinst: Dynamics and Ecological Roles in Health and Disease. *Biology*. 2024; 13(3): 142. <https://doi.org/10.3390/biology13030142>.
- [15] Moon, C.D., Young, W., Mavlean, P.H., Cookson, A., Bermingham, E.N., Metagenomic insights into the roles of *Proteobacteria* in the gastrointestinal microbiomes of healthy dogs and cats. *Microbiologyopen*. 2018; 7(5): e00677. <https://doi.org/10.1002/mbo3.677>.
- [16] Walter, A., Probst, M., Franke-Whittle, I.H., Ebner, C., Podmirseg, S.M., Etemadi-Shalamzari, M., Hupfau, S., Insam, H., Microbiota in anaerobic digestion of sewage sludge with and without co-substrates. *Water and Environment Journal*, 2018; 33(2): 214-222. <https://doi.org/10.1111/wej.12332>.

- [17] Guo, J., Peng, Y., Ni, B.J., Han, X., Fan, L., Yuan, Z., Dissecting microbial community structure and methane-producing pathways of a full-scale anaerobic reactor digesting activated sludge from wastewater treatment by metagenomic sequencing. *Microbial Cell Factories*. 2015; 14: 33. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0213-7>.
- [18] Kampmann, K., Ratering, S., Kramer, I., Schmidt, M., Zerr, W., Schnell, S., Unexpected Stability of Bacteroidetes and Firmicutes Communities in Laboratory Biogas Reactors Fed with Different Defined Substrates. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012; 78(6): 2106-2119. <https://doi.org/10.1128/AEM.06723-11>.
- [19] Pyzik, A., Cieczkowska, M., Krawczyk, P.S., et al., Comparative analysis of deep sequenced methanogenic communities: identification of microorganisms responsible for methane production. *Microbial Cell Factories*, 2018; 17: 197. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1023-0>.
- [20] Ali Shah, F., Mahmood, Q., Maroof Shah, M., Pervez, A., Asad, S.A., Microbial Ecology of Anaerobic Digesters: The Key Players of Anaerobiosis. *The Scientific World Journal*. 2014; 385236. <https://doi.org/10.1155/2014/385236>.
- [21] De Vrieze, J., Pinto, A. J., Sloan, W. T., & Ijaz, U. Z., The active microbial community more accurately reflects the anaerobic digestion process: 16S rRNA (gene) sequencing as a predictive tool. *Microbiome*, 2018; 6(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0449-9>.
- [22] Vanwonterghem, I., Jensen, P. D., Dennis, P. G., Hugenholtz, P., Rabaey, K., & Tyson, G. W., Deterministic processes guide long-term synchronised population dynamics in replicate anaerobic digesters. *The ISME Journal*. 2014; 8(10), 2015–2028. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.50>
- [23] Campanaro, S., Treu, L., Kougias, P. G., Zhu, X., & Angelidaki, I., Metagenomic analysis and functional characterization of the biogas microbiome using high-throughput shotgun sequencing and a novel binning strategy. *Biotechnology for Biofuels*. 2016; 9, 26. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0441-1>
- [24] De Vrieze, J., Saunders, A. M., He, Y., Fang, J., Nielsen, P. H., Verstraete, W., & Boon, N., Ammonia and temperature determine potential clustering in the anaerobic digestion microbiome. *Water Research*. 2015; 75, 312–323. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.025>
- [25] Conklin, A., Stensel, H. D., & Ferguson, J., Growth kinetics and competition between *Methanosarcina* and *Methanosaeta* in mesophilic anaerobic digestion. *Water Environment Research*. 2006; 78(5), 486–496. <https://doi.org/10.2175/106143005X73815>.
- [26] De Vrieze, J., Henebel, T., Boon, N., & Verstraete, W., Methanosarcina: The rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresour Technol*. 2012; 112, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.079>