



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Microbial Biology

E-ISSN: 3060-7647

15rd Year, Vol. 15, No. 58, 2026 pp. 25-40

Received: 25/05/2026

Accepted: 29/08/2026

(Research Paper)

Analysis of the Microbial Community Structure in an Anaerobic Digester of Urban Wastewater Sludge Using Next-Generation Sequencing Technique

Mahsa Sedighi 

Energy and Environment Research Center, Niroo Research Institute, Tehran, Iran

msedighi@nri.ac.ir

Abstract

The efficiency and stability of anaerobic digestion technology depend on complex microbial communities and their activities. Microbial diversity plays a crucial role in the performance of natural and engineered ecosystems. Over the past decade, significant progress has been made in identifying key groups of microorganisms that influence anaerobic digestion processes. Recently developed next-generation sequencing technologies can be used for a comprehensive description of the microbial community in a digester. In the present study, this technique was used to identify and analyze the microbial structure present in an anaerobic digester of urban wastewater sludge. Samples were taken from the effluent sludge flow of an urban wastewater sludge anaerobic digester at different time intervals to perform molecular identification tests using next-generation sequencing technology. The samples then underwent whole-genome sequencing analysis to obtain findings regarding the genetic composition and diversity of the microbial community (species type and abundance). Alpha diversity indices showed that the studied anaerobic digester had a rich, diverse, and relatively balanced microbial community. Bacterial community analysis revealed that Proteobacteria and Firmicutes were the dominant bacterial phyla in the anaerobic digester, while the archaeal community consisted of acetoclastic, hydrogenotrophic, and methylotrophic methanogens. Methanotrix had the highest abundance in the studied digester. The appropriate diversity of bacteria in the studied digester indicates good stability and optimal capacity for anaerobic digestion processes, as well as functional redundancy in the microbial community, which can increase the system's resistance to stresses and operational changes. The higher abundance of Methanotrix suggests that the acetoclastic methanogenesis pathway is likely dominant in the digester. The higher abundance of Methanotrix also indicates that there are no functional disturbances in the digester. Overall, the analysis of the microbial structure showed that the studied digester is in an optimal condition in terms of digestion process stability and consistent methane production.

Keywords: Anaerobic digestion, Municipal sewage sludge, Microbial community structure, Next-generation sequencing.

¹ *Corresponding Author

[3060-7647/](https://doi.org/10.22108/bjm.2026.149031.1676) © 2022 The Authors



Introduction

Anaerobic digestion (AD) is an important biological technology for the treatment and stabilization of wastewater sludge and the recovery of renewable energy through biogas production. The efficiency, stability, and resilience of anaerobic digestion depend strongly on the structure and activity of complex microbial communities. The degradation of organic matter in anaerobic digesters occurs through a series of interconnected biochemical stages, including hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis, and methanogenesis, each of which is mediated by different groups of microorganisms. Therefore, the composition, diversity, and relative abundance of bacterial and archaeal communities can directly influence substrate degradation, intermediate metabolite conversion, methane formation, and overall digester performance.

Microbial diversity is a critical ecological characteristic of natural and engineered ecosystems because diverse microbial communities may provide complementary metabolic functions and improve the capacity of a system to withstand environmental and operational changes. In anaerobic digesters, the interactions among fermentative bacteria, syntrophic microorganisms, and methanogenic archaea are particularly important because the products generated by one microbial group frequently serve as substrates for another. Over the past decade, substantial advances in next-generation sequencing (NGS) technologies have enabled more comprehensive characterization of complex microbial communities. Compared with conventional cultivation-based approaches, sequencing-based methods can identify a much broader range of microorganisms, including populations that are difficult or impossible to cultivate.

Urban wastewater sludge represents a highly complex substrate for anaerobic digestion, and its microbial community may vary in response to changes in feed characteristics, operating conditions, and environmental factors. Characterizing the microbial structure of sludge digesters can therefore provide valuable information for understanding the biological mechanisms underlying digester performance. In the present study, NGS and whole-genome sequencing (WGS) were applied to identify and characterize the microbial community of an anaerobic digester treating urban wastewater sludge. The objectives were to evaluate microbial diversity, identify the dominant bacterial and archaeal groups, characterize the methanogenic community, and examine the relationship between microbial community structure and the overall condition of the digester.

Materials & Methods

Samples were collected from the effluent sludge flow of an urban wastewater sludge anaerobic digester at different time intervals. The sampling strategy was designed to assess the microbial community under the prevailing operating conditions and to identify potential temporal changes in microbial composition. The collected samples were subjected to molecular analysis, including DNA extraction and preparation for NGS. WGS was subsequently performed to obtain comprehensive information on the genetic composition and diversity of the microbial community.

The sequencing data were analyzed using bioinformatic approaches to determine taxonomic composition and relative abundance at different taxonomic levels. Particular attention was given to the major bacterial and archaeal populations involved in anaerobic digestion and methane formation. Alpha-diversity indices were calculated to characterize microbial richness, diversity, and community evenness. These indices included the Shannon diversity index, Simpson diversity index, Chao1 richness estimator, and sequencing coverage. The bacterial and archaeal communities were evaluated separately to identify the dominant microbial groups and the major methanogenic populations. The sequencing results were subsequently interpreted in relation to the available operating conditions and physicochemical characteristics of the digester.

Discussion of Results & Conclusions

The alpha-diversity analysis indicated that the investigated anaerobic digester supported a relatively rich, diverse, and balanced microbial community. The high sequencing coverage demonstrated that the generated sequencing dataset provided substantial representation of the microbial populations present in the analyzed samples. The observed richness and diversity are consistent with the complex ecological structure expected in anaerobic digesters, in which a large number of microorganisms cooperate through sequential and syntrophic metabolic pathways.

The bacterial community analysis showed that the phyla *Proteobacteria* and *Firmicutes* were among the dominant bacterial phyla in the anaerobic digester. These groups are frequently associated with anaerobic wastewater treatment systems and can contribute to several stages of organic matter degradation. Their presence may reflect active participation in the breakdown and fermentation of complex organic compounds and the production of intermediate substrates required by methanogenic microorganisms. The coexistence of different bacterial groups indicates that the degradation of organic matter in the studied digester was supported by a complex microbial network rather than by a single dominant population.

The archaeal community consisted of several functional groups of methanogens, including acetoclastic, hydrogenotrophic, and methylotrophic methanogens. The presence of these groups indicates that methane production potentially occurred through multiple biochemical pathways. Hydrogenotrophic methanogens utilize hydrogen and carbon dioxide, acetoclastic methanogens convert acetate into methane and carbon dioxide, and methylotrophic methanogens use methyl-containing compounds as substrates. The coexistence of these functional groups suggests that the microbial community possessed metabolic flexibility and could potentially maintain methane formation under changes in substrate availability.

Among the detected methanogenic microorganisms, *Methanothrix* showed the highest abundance. This finding is particularly important because *Methanothrix* is a major acetoclastic methanogen and is frequently associated with acetate conversion in anaerobic digestion systems. Its relatively high abundance suggests that acetoclastic methanogenesis may represent an important pathway for methane formation in the investigated digester. The coexistence of *Methanothrix* with hydrogenotrophic and methylotrophic methanogens also indicates that methane production was potentially supported by complementary metabolic routes rather than being dependent exclusively on one methanogenic group.

The relatively high microbial diversity observed in the digester may contribute to the functional stability and resilience of the anaerobic digestion process. The presence of multiple microbial populations with complementary or overlapping functions can provide a degree of functional redundancy, allowing the microbial community to respond to environmental fluctuations and operational disturbances. A diverse microbial consortium may therefore improve the ability of the digester to maintain metabolic activity when changes occur in substrate characteristics or process conditions.

However, microbial diversity alone cannot be considered a definitive indicator of anaerobic digester stability. Process stability is a multidimensional characteristic that should be evaluated through the integration of microbial information with operational and physicochemical parameters, including temperature, pH, alkalinity, volatile fatty acids, ammonia concentration, organic loading, solids or COD removal, and quantitative biogas and methane production. In this study, the observed microbial structure, together with the available physicochemical characteristics and proper methane-producing performance of the digester, provided evidence of a favorable biological condition and effective anaerobic digestion.

The predominance of *Methanothrix* was also consistent with the stable operation of the digester and steady methane production. Nevertheless, relative abundance should not be interpreted as a direct measurement of microbial activity. A microorganism may be highly abundant but not necessarily metabolically active under all conditions. Therefore, confirmation of the functional contribution of *Methanothrix* would require additional approaches, such as metatranscriptomic, metaproteomic, or targeted functional analyses, together with direct measurements of methane production and acetate conversion. Such analyses could provide stronger evidence regarding the mechanisms controlling methane formation.

The results demonstrated that NGS and WGS are effective tools for characterizing the complex microbial ecology of anaerobic digesters treating urban wastewater sludge. The investigated digester contained a rich and diverse microbial community comprising major bacterial and archaeal groups involved in the different stages of anaerobic digestion. The phyla *Proteobacteria* and *Firmicutes* were dominant bacterial phyla, while the archaeal community included acetoclastic, hydrogenotrophic, and methylotrophic methanogens. *Methanothrix* showed the highest abundance among the identified methanogenic microorganisms, suggesting that the acetoclastic pathway may play an important role in methane formation.

Overall, the observed microbial diversity and community structure, together with the operating conditions, physicochemical characteristics, and satisfactory methane-producing performance, indicate that the investigated anaerobic digester was in a favorable state with respect to biological functioning and process performance. The findings also demonstrate the potential value of microbial community analysis as a complementary approach for monitoring anaerobic digesters. However, future studies should combine sequencing data with quantitative methane production, volatile fatty acid profiles, substrate removal, and functional activity measurements to establish stronger causal relationships between microbial community dynamics and anaerobic digestion performance.

تحلیل ساختار جامعه میکروبی موجود در هاضم بی‌هوازی لجن فاضلاب شهری با استفاده از تکنیک توالی‌یابی 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 مهندسی‌شده دارد. در دهه گذشته پیشرفت‌های چشمگیری در شناسایی گروه‌های کلیدی میکروارگانیسم‌ها حاصل شده است که بر فرایندهای هضم بی‌هوازی تأثیر می‌گذارند. فناوری توالی‌یابی نسل بعدی که به‌تازگی 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 برای انجام تست‌های شناسایی مولکولی با استفاده از فناوری توالی‌یابی نسل بعدی، نمونه گرفته شد. سپس نمونه‌ها تحت تجزیه و تحلیل توالی‌یابی کل ژنوم قرار گرفتند تا یافته‌هایی درباره ترکیب ژنتیکی و تنوع جامعه میکروبی (نوع و فراوانی گونه‌ها) به دست آید. مجموع شاخص‌های تنوع آلفا نشان داد هاضم بی‌هوازی مطالعه‌شده دارای یک جامعه میکروبی غنی، متنوع و نسبتاً متعادل است. بررسی جامعه باکتریایی نشان داد پروتئوباکتیریا و فیرمیکیوتس شاخه‌های باکتریایی غالب در هاضم بی‌هوازی هستند؛ درحالی‌که جامعه آرکی‌ها از انواع متانوژن‌های استوکلاستیک، هیدروژنوتروفیک، و متیلوتروفیک تشکیل شده بود. متانوتریکس بیشترین فراوانی را در هاضم بررسی‌شده داشت. تنوع مناسب باکتری‌ها در هاضم بررسی‌شده، بیان‌کننده پایداری مناسب و ظرفیت مطلوب برای انجام فرایندهای 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 احتمالاً مسیر متان‌زایی استوکلاستیک در هاضم، غالب است. فراوانی بیشتر متانوتریکس همچنین با بهره‌برداری پایدار هاضم در تولید ثابت متان سازگار است. درمجموع تحلیل ساختار میکروبی در کنار شرایط عملیاتی، ویژگی‌های فیزیوشیمیایی هاضم و عملکرد مناسب آن در تولید متان نشان داد هاضم بررسی‌شده از لحاظ پایداری فرایند هضم و تولید ثابت متان در شرایط مطلوبی است.

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

* نویسنده مسئول مکاتبات

صدیقی، مهسا. تحلیل ساختار جامعه میکروبی موجود در هاضم بی‌هوازی لجن فاضلاب شهری با استفاده از تکنیک توالی‌یابی نسل بعدی. زیست‌شناسی میکروبی، ۱۴۰۵؛ ۵۸(۱۵): ۲۵-۴۰.

doi: 10.22108/bjm.2026.149031.1676

3060-7647/ © 2026 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



مقدمه

به‌عنوان یک فرایند تصفیه زیستی، هم‌کارایی و هم‌پایداری فناوری هضم بی‌هوازی (AD)^۲ به‌طور 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 سؤالات اساسی معطوف کرده‌اند؛ نظیر (۱) کدام میکروارگانیسم‌ها حضور دارند، (۲) چند نوع مختلف میکروارگانیسم وجود دارد، (۳) کدام میکروارگانیسم‌ها فعال و درحال رشد هستند، (۴) میکروارگانیسم‌ها تحت شرایط محیطی خاص چگونه رفتار می‌کنند و (۵) ساختار جامعه میکروبی چگونه با عملکرد هاضم مرتبط است.

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 مطالعه شده است. محققان به‌تازگی 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 به‌طور خاص به‌عنوان غنای گونه‌ای^۳ (تعداد گونه‌ها) و یکنواختی^۴ (فراوانی نسبی گونه‌ها) اندازه‌گیری می‌شود، نشان داده است نقش مهمی در عملکرد اکوسیستم‌های طبیعی و مهندسی شده دارد. اکوسیستم‌هایی که در آنها چندین ارگانیسم با فراوانی نسبتاً برابر قادر به انجام یک عملکرد زیستی مشابه هستند، به‌دلیل برخورداری از غنای عملکردی و یکنواختی بالا، از افزونگی عملکردی بیشتری بهره‌مند هستند و در نتیجه ثبات عملکردی بالاتری دارند. این یک نوع بیمه عملکردی برای یک اکوسیستم است که دارای غنای بالا و یکنواختی براساس رشد جبرانی

است. اگر جمعیت یک گونه درون یک گروه عملکردی به‌دلیل 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. (Wittebolle et al. (2009 در مطالعه‌ای 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، Fernanadez et al. (2000 و Hashsham et al. (2000 در مطالعه اختلال هاضم‌های متان‌زا با استفاده از بارگذاری گلوکز نتیجه‌گیری کردند پایداری عملکردی بیشتری در جوامعی مشاهده شد که چندین میکروارگانیسم درون یک گروه عملکردی مشابه داشتند [۱].

در دهه گذشته پیشرفت‌های چشمگیری 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 به‌گونه‌ای تصور شود که در آن تعداد زیادی از جوامع میکروبی مختلف از هاضم‌های بی‌هوازی کنترل‌شده تجزیه و تحلیل شوند و از فناوری توالی‌یابی نسل بعدی (NGS)^۵ استفاده شود. فناوری توالی‌یابی نسل بعدی که به‌تازگی

⁵ Next Generation Sequencing

² Anaerobic Digestion

³ species richness

⁴ species evenness

بطری‌های نمونه در یک جعبه یخ قرار داده و به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه، نمونه‌ها پس از هموژن‌سازی، به حجم‌های کمتر، تقسیم و در دمای ۱۸- درجه سانتیگراد فریز شدند و برای انجام آزمایش‌های مربوط به آنالیز میکروبی نگهداری شدند. در **شکل ۱**، مراحل و چگونگی نمونه‌گیری به‌صورت شماتیک نشان داده شده است (پروتکل استاندارد نمونه‌گیری از لجن هاضم بی‌هوازی). **جدول ۱**، بیان‌کننده شرایط فرایندی هاضم بررسی شده در طول دوره نمونه‌برداری است.

آنالیز میکروبی نمونه‌ها با استفاده از فناوری

توالی‌یابی نسل بعدی (NGS)

در این مرحله، نمونه‌های گرفته‌شده از جریان لجن خروجی هاضم، تحت تجزیه و تحلیل توالی‌یابی کل ژنوم (WGS)^۶ قرار گرفتند تا یافته‌هایی درباره ترکیب ژنتیکی و تنوع جامعه میکروبی به دست آیند. استخراج DNA میکروبی طبق روش‌شناسی ارائه‌شده توسط Ramezani et al. (2022) انجام شد [۳]. توالی‌یابی DNA ژنومی روی پلتفرم Illumina Hiseq High Output با طول خوانش ۲ bp * ۱۵۰ انجام شد که توسط شرکت Novogene مستقر در بریتانیا تسهیل شد.

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 براساس نسبت تعداد خوانش‌های تخصیص یافته به هر تاکسون به کل خوانش‌های طبقه‌بندی‌شده، محاسبه و به‌صورت درصد گزارش شد. نمودارهای تاکسونومیک استفاده‌شده در این مطالعه براساس خروجی همین پلتفرم‌ها و در سطوح مختلف رده‌بندی (شاخه و جنس) تهیه شدند.

توسعه یافته است، ممکن است یک پیشرفت بزرگ را فراهم کند. در عین حال، به‌جای تجزیه و تحلیل یک گروه خاص عملکردی یا تاکسونومیک، توالی‌یابی نسل بعدی می‌تواند برای توصیف کامل جامعه میکروبی هاضم استفاده شود؛ با استفاده از رویکرد متاژنومیک یا با به‌کارگیری پرایمرهای جهانی ژن 16S rRNA یا با سایر رویکردها [۲]. 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 روبه‌جلو 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 است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری در بازه‌های زمانی مختلف

در این پژوهش، هاضم فاضلاب شهری در تصفیه‌خانه فاضلاب جنوب تهران به‌عنوان هاضم نمونه انتخاب شد. دلیل این امر در مدار قرار گرفتن هاضم مدنظر 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) برای 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 بررسی شده، در بطری‌های پلاستیکی اتوکلاو شده با حجم ۱ لیتر جمع‌آوری شدند.

^۶ whole genome sequencing

این سامانه علاوه بر تعیین فراوانی نسبی تاکسون‌ها، شاخص‌های متداول تنوع زیستی از جمله شاخص‌های شانون^۷، جینی-سیمپسون^۸، کائو^۹ و مقدار پوشش^{۱۰} را نیز محاسبه می‌کند که به ترتیب برای ارزیابی تنوع گونه‌ای، یکنواختی جامعه، برآورد غنای گونه‌ای و کفایت عمق توالی‌یابی استفاده می‌شوند [۶].

به منظور افزایش قابلیت اطمینان نتایج، طبقه‌بندی تاکسونومیکی حاصل از دو پلتفرم با یکدیگر مقایسه شد و نتایج نهایی براساس خروجی‌های همسو و قابل تأیید تفسیر شدند.

جدول ۱- شرایط عملیاتی و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی هاضم مورد

بررسی

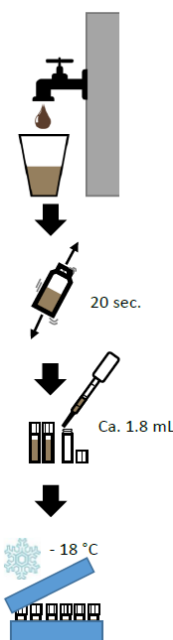
Table 1- Operating conditions and physicochemical characteristics of the studied digester

هاضم مورد بررسی	
ظرفیت هاضم (m ³)	۸۹۰۰
pH	۷
دما (°C)	۳۷/۷
میزان خوراک‌دهی (m ³ /day)	۳۴۵
زمان ماند هیدرولیکی (days)	۲۶
نرخ بارگذاری آلی (kg COD/m ³ .day)	۲/۳
جامد خشک (%)	۵/۲
جامد فرار (%)	۸۰/۶
اسید چرب فرار (mg CH ₃ COOH/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



شکل ۱- شماتیک پروتکل استاندارد نمونه‌گیری از لجن هاضم

بی‌هوازی.

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

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 تاکسونومیکی و حاشیه‌نویسی عملکردی را فراهم می‌کند. در این سامانه، طبقه‌بندی تاکسونومیکی براساس 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 [۴، ۵].

به‌منظور افزایش دقت در شناسایی گونه‌ها، داده‌های WGS همچنین در پلتفرم One Codex تحلیل شدند. One Codex با مقایسه قطعات کوتاه توالی با پایگاه داده‌ای گسترده از ژنوم‌های مرجع میکروبی، شناسایی تاکسونومیکی را با قدرت تفکیک بالا، به‌ویژه در سطح گونه انجام می‌دهد.

⁹ Chao1

¹⁰ Good's Coverage

⁷ Shannon

⁸ Gini-Simpson

بررسی تنوع میکروبی (تعداد و فراوانی نسبی

گونه‌ها) در هاضم بررسی شده

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

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

شاخص کائو ۱ یک برآوردگر غیرپارامتری برای غنای گونه‌ای است که تعداد گونه‌های مشاهده نشده را نیز براساس 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 بیان‌کننده 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].

شاخص شانون علاوه بر تعداد گونه‌ها، یکنواختی توزیع فراوانی آنها را نیز در نظر می‌گیرد و یکی از متداول‌ترین

عملکرد اکوسیستم‌های طبیعی و مهندسی شده دارد. اکوسیستم‌هایی که شامل بیش از یک ارگانیسم دارای یک عملکرد خاص (غنای بالا) با فراوانی نسبتاً برابر (یکنواختی بالا) هستند، احتمال بیشتری برای داشتن افزونگی عملکردی یا ثبات عملکردی دارند. بر این اساس در این بخش، ابتدا تنوع میکروبی در لجن خروجی از هاضم بررسی شده است. سپس، ساختار جامعه میکروبی در هاضم به تفصیل تحلیل شده است.

در فرایند هضم بی‌هوازی، عملکرد سیستم وابسته به یک کنسرسیوم پیچیده از باکتری‌ها و آرکی‌ها است که به صورت هماهنگ در مراحل هیدرولیز، اسیدزایی، استات‌زایی و متان‌زایی فعالیت می‌کنند [۷، ۱]. شاخص مقدار پوشش میزان کفایت عمق توالی‌یابی را نشان می‌دهد و بیان‌کننده سهم جمعیت میکروبی است که توسط داده‌های توالی‌یابی پوشش داده شده‌اند. مقدار پوشش ۱۱ برابر ۹۹ درصد نشان می‌دهد عمق توالی‌یابی کافی بوده است و تقریباً تمام تنوع میکروبی موجود در نمونه شناسایی شده‌اند. مقادیر بالای پوشش توالی‌یابی بیان‌کننده قابلیت اعتماد بیشتر شاخص‌های تنوع و کاهش احتمال عدم شناسایی تاکسون‌های مهم است [۸].

شاخص‌های ارزیابی تنوع زیستی محسوب می‌شود [۹]. شاخص شانون برابر $4/77$ نشان‌دهنده تنوع میکروبی نسبتاً زیاد است. شاخص شانون هم‌گنای گونه‌ای و هم‌یکنواختی توزیع گونه‌ها را در نظر می‌گیرد؛ بنابراین، مقدار $4/77$ بیان‌کننده 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 غالب‌بودن گونه‌های خاص در جامعه را ارزیابی می‌کند و به یکنواختی توزیع جمعیت حساس است [۹]. مقدار سیمپسون برابر $0/85$ نیز نشان می‌دهد جامعه میکروبی تحت سلطه تعداد محدودی میکروارگانیسم قرار ندارد و توزیع جمعیت میکروبی نسبتاً متعادل است. شاخص سیمپسون برای ارزیابی غالب‌بودن 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 بیان‌کننده پیچیدگی بالای جامعه میکروبی است. مطالعات مختلف روی هاضم‌های بی‌هوازی نشان داده‌اند این سامانه‌ها معمولاً دارای جوامع میکروبی بسیار متنوع شامل گروه‌های مختلف باکتریایی و آرکیایی هستند که در آن شاخه‌های باکتریایی مانند فرمیکیوتس^{۱۲}، پروتئوباکتیریا^{۱۳}، باکترویدیوتس^{۱۴} و کلروفلکسی^{۱۵} غالب‌اند و آرکی‌های متان‌ساز نقش کلیدی در تولید متان دارند [۱۰].

نتایج حاصل از این پژوهش با گزارش Tahmasebi & Aliasghari Veshareh (2026) در مطالعه هاضم بی‌هوازی پسماند شهری همخوانی دارد که از همین

شاخص‌ها برای ارزیابی تنوع آلفای جامعه میکروبی استفاده کرده‌اند [۱۱]. براساس مجموع شاخص‌های به‌دست‌آمده، می‌توان نتیجه گرفت هاضم بی‌هوازی مطالعه‌شده دارای یک جامعه میکروبی غنی، متنوع و نسبتاً متعادل است که احتمالاً از نظر عملکردی دارای پایداری مناسب و ظرفیت مطلوب برای انجام فرایندهای هیدرولیز، اسیدزایی، استات‌زایی و متان‌زایی است. همچنین چنین ساختاری معمولاً بیان‌کننده وجود افزونگی عملکردی در جامعه میکروبی است که می‌تواند مقاومت سامانه را در برابر تنش‌ها و تغییرات عملیاتی افزایش دهد [۱].

شایان ذکر است 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 [۱۰].

بررسی ترکیب و ساختار جامعه میکروبی در هاضم

بررسی‌شده

جامعه باکتری‌ها

نتایج بررسی جامعه میکروبی در جریان لجن خروجی از هاضم در سطح شاخه (phylum)، در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهند نماینده فیلاها در جریان لجن خروجی شامل پروتئوباکتیریا (۲۲/۰۳ درصد)، فرمیکیوتس (۶۴/۹۳ درصد)، سینرگیستتر^{۱۶} (۳/۲۴ درصد)، باکترویدیوتس (۰/۰۸ درصد)، کوپروتروموباکتروتا^{۱۷} (۰/۰۱ درصد)، و کلروفلکسی (۰/۷۶ درصد) است.

همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، دو فیلای غالب در جریان لجن خروجی، پروتئوباکتیریا و فرمیکیوتس

¹⁶ Synergistetes

¹⁷ Coprothermobacterota

¹² Firmicutes

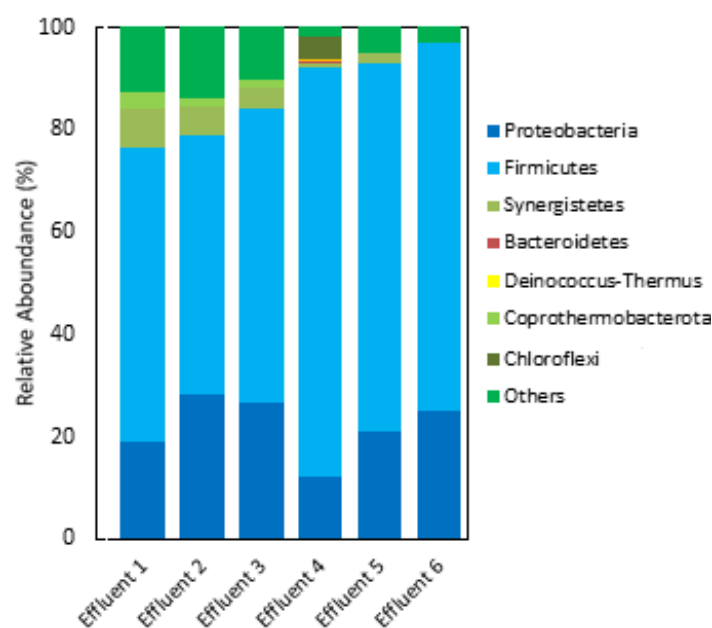
¹³ Proteobacteria

¹⁴ Bacteroidetes

¹⁵ Chloroflexi

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 می‌شوند [۱۲، ۱۳]. بسیاری از پروتئوباکتری‌ها در شراکت‌های سینتروفیک با آرکی‌های متان‌زا شرکت می‌کنند.

هستند. پروتئوباکتیریا، یک شاخه متنوع از باکتری‌های گرم منفی، نقش مهمی در فرایندهای هضم بی‌هوازی دارد. این شاخه به دلیل تنوع متابولیکی‌اش شناخته می‌شود و شامل چندین کلاس است که گاما پروتئوباکتیریا^{۱۸} و دلتا پروتئوباکتیریا^{۱۹} به‌ویژه در محیط‌های بی‌هوازی تأثیرگذار هستند. پروتئوباکتری‌ها در تجزیه مواد آلی پیچیده، ازجمله



شکل ۲- فراوانی نسبی شاخه‌های باکتریایی شناسایی شده براساس داده‌های توالی‌یابی کل ژنوم. فراوانی هر شاخه براساس درصد خوانش‌های طبقه‌بندی شده محاسبه شده است. شاخه‌هایی که در هر نمونه کمتر از ۱ درصد 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 to each phylum. Taxa representing less than 1% relative abundance in each sample were grouped as "Others".

مختلف هضم را بررسی می‌کرد، پروتئوباکتیریا نسبت‌های متفاوتی از میکروبیوم را نمایندگی می‌کردند (تا ۲۳/۹ درصد 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].

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 به‌طور چشمگیری تغییر کند؛ برای مثال، در یک مطالعه که مراحل

¹⁸ Gammaproteobacteria

¹⁹ Deltaproteobacteria

به‌عنوان بی‌هوازی‌های اختیاری، بسیاری از پروتئوباکتری‌ها می‌توانند در شرایط هوازی و بی‌هوازی رشد کنند. این سازگاری به آنها اجازه می‌دهد 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 به‌طور چشمگیری 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 به‌طور مستقیم به تولید بیوگاز کمک می‌کنند که یک عامل حیاتی برای قابلیت اقتصادی سیستم‌های هضم بی‌هوازی است [۱۶]. شاخه فرمیکوتس نقش مهمی در هضم بی‌هوازی لجن فاضلاب دارد و به تجزیه مواد آلی و تولید متان کمک می‌کند. باکتری‌های فرمیکوتس، به‌ویژه اعضای کلاس *کلاستریدیا*^{۲۰}، باکتری‌های هیدرولیتیکی حیاتی هستند که ترکیبات آلی پیچیده را به مولکول‌های ساده‌تر تجزیه می‌کنند. این هیدرولیز یک مرحله اولیه حیاتی در هضم بی‌هوازی است؛ جایی که زیرلایه‌های پیچیده به اسیدهای چرب فرار (VFAs)^{۲۱} 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 *کاندیدا/توس کلو/اکاموناس*^{۲۲} که در شاخه فرمیکوتس شناسایی شده‌اند، به‌عنوان باکتری‌های سینتروفیک تولیدکننده هیدروژن شناخته شده‌اند که با تسهیل این تبادلات متابولیکی، کارایی هضم بی‌هوازی را افزایش می‌دهند [۱۷]. در مطالعاتی که ساختارهای جامعه میکروبی در سیستم‌های هضم بی‌هوازی را تحلیل کرده‌اند، مشخص شده است فرمیکوت‌ها یکی از شاخه‌های غالب هستند و معمولاً بخش قابل توجهی از جامعه باکتریایی را در کنار باکترئیدیتس و پروتئوباکتریا تشکیل می‌دهند [۱۲]. حضور آنها به ثبات و تاب‌آوری جامعه میکروبی کمک می‌کند که برای عملکرد پایدار هاضم ضروری است. تنوع در ترکیب جامعه می‌تواند براساس شرایط عملیاتی مانند تغذیه با سوبستراهای مشترک رخ دهد؛ با این حال، فرمیکوتس به‌طور کلی حضور ثابتی را حفظ می‌کنند که نشان‌دهنده سازگاری و اهمیت آنها در محیط‌های مختلف هضم بی‌هوازی است [۱۶، ۱۸]. در مطالعه حاضر نیز این پدیده مشاهده می‌شود. حضور باکتری‌های فرمیکوتس 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 فرمیکوتس ظرفیت عملکردی هاضم‌های بی‌هوازی را افزایش می‌دهد. گونه‌های مختلف ممکن است به هدف قرار دادن زیرلایه‌های مختلف پردازند و در نتیجه کارایی کلی تجزیه و تولید بیوگاز را بهبود بخشند [۱۷]. غالب بودن این شاخه در هاضم بررسی شده، می‌تواند یکی از

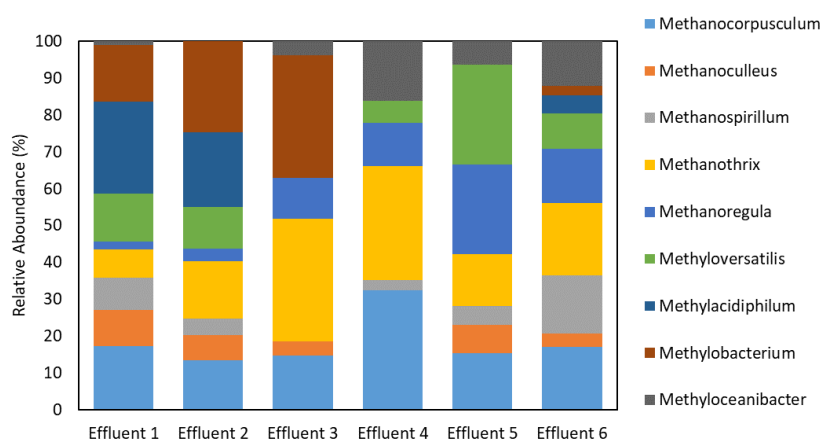
²² *Candidatus Cloacamonas*²⁰ *Clostridia*²¹ Volatile Fatty Acids

دلایل پتانسیل بالای تولید بیوگاز در این هاضم باشد (مطابق جدول ۱).

جامعه آرکی‌ها

متانوژن‌های غالب در هاضم بررسی شده، در شکل ۳ نشان داده شده‌اند. همان‌طور که در شکل نشان داده شده است، متانوژن‌های غالب در هاضم شامل ۱۸/۴۱ درصد

متانوکورپوسکولوم^{۲۳}، ۵/۲۶ درصد متانوکولیوس^{۲۴}، ۶/۱۸ درصد متانواسپیریلیوم^{۲۵}، ۲۰/۱۹ درصد متانوتریکس^{۲۶}، ۱۱/۲۳ درصد متانورگولا^{۲۷}، ۱۱/۱۳ درصد متیلوورساتیلیس^{۲۸}، ۱۶/۶۹ درصد متیل اسیدیفیلوم^{۲۹}، ۱۲/۶۱ درصد متیلوباکتریوم^{۳۰} و ۶/۵۹ درصد متیل اوشنی‌باکتر^{۳۱} هستند.



شکل ۳- متانوژن‌های غالب در هاضم بررسی شده در سطح جنس

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

متان‌زایی متیلوتروفیک: از ترکیبات متیله‌شده مانند متانول یا متیل‌آمین‌ها استفاده می‌کند [۱۹].

این مسیرها به متانوژن‌ها اجازه می‌دهند 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 داشته باشند.

درباره متان‌زایی استوکلاستیک، انتظار می‌رود استات به‌طور مستقیم توسط متانوژن‌های استوکلاستیک به متان تبدیل شود؛ با این حال، بخشی از استات (با توجه به شرایط هاضم)،

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

متان‌زایی هیدروژنوتروفیک: شامل کاهش CO_2 با استفاده از H_2 به عنوان اهداکننده الکترون است؛

متان‌زایی استوکلاستیک: شامل تجزیه استات است؛

²⁸ *Methyloversatilis*

²⁹ *Methylacidiphilum*

³⁰ *Methylobacterium*

³¹ *Methyloceanibacter*

²³ *Methanocorpusculum*

²⁴ *Methanoculleus*

²⁵ *Methanospirillum*

²⁶ *Methanotherix*

²⁷ *Methanoregula*

انواع متانوژن‌های هیدروژنوتروفیک و متیلوتروفیک نشان می‌دهد سایر مسیرهای تولید متان نیز فعال هستند.

بحث و نتیجه‌گیری

به‌عنوان یک فرایند تصفیه زیستی، هم‌کاری و هم‌پایداری فناوری هضم بی‌هوازی به‌طور 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 بررسی شده است. برای این منظور مراحل مختلفی شامل نمونه‌گیری از لجن داخل هاضم در بازه‌های زمانی مختلف (هر ماه)، آنالیز میکروبی نمونه‌ها برای تعیین نوع و فراوانی گونه‌های اصلی و در نهایت تحلیل ساختار جامعه میکروبی هاضم بی‌هوازی انجام شد.

تحلیل جامعه باکتریایی هاضم نشان داد 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 بیان‌کننده وجود یک جامعه میکروبی متنوع و نسبتاً یکنواخت هستند. چنین ساختاری موجب افزایش افزونگی عملکردی می‌شود و توانایی هاضم را برای حفظ عملکرد در برابر نوسانات محیطی افزایش می‌دهد؛ در نتیجه، ظرفیت تولید متان و پایداری فرایند 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، ۲۲].

در این پژوهش، پروتئوباکتیریا و فرمیکیتس به‌عنوان 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 فرمیکیتس

می‌تواند توسط باکتری‌های سینتروفیک اکسیدکننده استات، به گاز هیدروژن و CO_2 اکسید شود؛ به‌جای اینکه به‌طور مستقیم توسط متانوژن‌های 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)^۱ از نظر ترمودینامیکی ممکن است؛ بنابراین، باکتری‌های اکسیدکننده استات به ارگانسم‌های شریک نیاز دارند که آنها را در متانوژن‌های 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 بر لیتر، افزایش نرخ بارگذاری آلی که منجر به انباشت اسیدهای چرب، به‌ویژه اسید استیک می‌شود و افزایش غلظت استات انباشته‌شده تا مقدار ۳۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، دمای هاضم (دماهای ترموفیلیک) و افزایش زمان ماند هیدرولیکی، از عوامل این تغییر مسیر به شمار می‌آیند [۲].

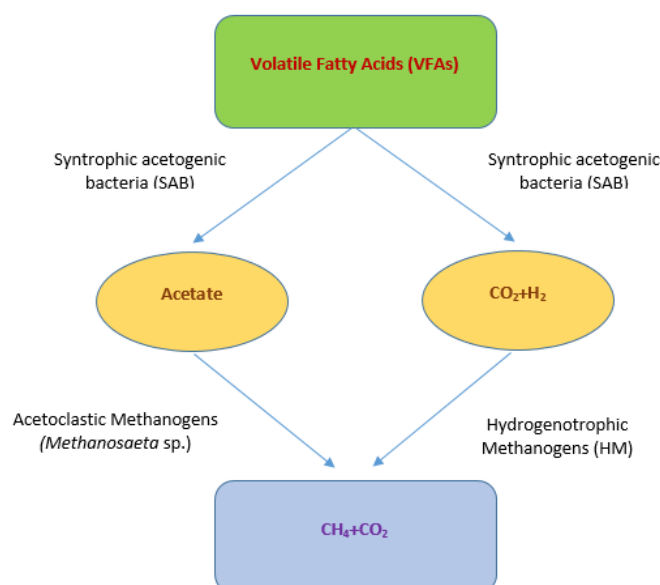
با توجه به شکل ۳، متانوتریکس (که به متانوسائتا^۲ نیز شناخته می‌شود)، بیشترین فراوانی را در هاضم بررسی شده داشت. فراوانی این جنس می‌تواند بیان‌کننده شرایطی باشد که با غلبه مسیر متان‌زایی استوکلاستیک (شکست مستقیم استات) (شکل ۴) و بهره‌برداری پایدار هاضم در تولید ثابت متان سازگار است (مطابق جدول ۱)؛ اگرچه این موضوع به‌تنهایی برای اثبات عدم وجود اختلالات عملیاتی کافی نیست و باید همراه با سایر شواهد ارزیابی شود. از طرف دیگر، حضور

² Methanosaeta

¹ syntrophic acetate oxidation and hydrogenotrophic methanogenesis

نیاز متانوژن‌ها مشارکت می‌کنند. این نتایج با گزارش‌های پیشین مطابقت دارند [۲۳، ۲۴].

نقش مهمی در هیدرولیز پلیمرهای آلی و تولید اسیدهای چرب فرار دارند؛ درحالی‌که بسیاری از اعضای پروتئوباکتیریا در تجزیه ترکیبات آلی محلول و تولید پیش‌سازهای مورد



شکل ۴- مسیرهای احتمالی تولید متان در هاضم مورد بررسی

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

بهره‌برداری، با این یافته همخوانی دارند و از غالب بودن مسیر استوکلاستیک حمایت می‌کنند. در مقابل، حضور متانوژن‌های هیدروژنوتروفیک و متیلوتروفیک نشان می‌دهد علاوه بر مسیر استوکلاستیک، سایر مسیرهای متان‌زایی نیز در هاضم فعال هستند. فعال بودن هم‌زمان چند مسیر متان‌زایی، انعطاف‌پذیری متابولیکی جامعه آرکئایی را افزایش می‌دهد و پایداری فرایند 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

نتایج حاصل از تحلیل جامعه آرکئایی نشان دادند انواع متانوژن‌های استوکلاستیک، هیدروژنوتروفیک و متیلوتروفیک در هاضم حضور دارند؛ اما متیلوتروفیکس (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 در هاضم‌هایی با عملکرد پایدار، زمان ماند مناسب و غلظت پایین آمونیاک آزاد، فراوانی متیلوتروفیکس نسبت به سایر متانوژن‌ها بیشتر است [۲۵، ۲۶]. در پژوهش حاضر نیز شرایط عملیاتی و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی هاضم، از جمله pH، دما و سایر پارامترهای

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 ارائه‌شده توسط تصفیه‌خانه فاضلاب جنوب تهران در راستای تحقق اهداف تحقیق سپاسگزاری می‌کنند.

عملکرد مناسب آن در تولید متان نشان می‌دهد هاضم مطالعه‌شده 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.

References

- [1] Venkiteswaran 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 SM. 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 EM, Kubal M, Paczian T, Rodriguez A, Stevens R, Wilke A, Wilkening J, Edwards RA. 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 KP, Glass EM, 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 NB. 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, Degève 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 JS. 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 HG, Wardah ZH, Sagar PR, Prajapati VS, Mangrola AV, Raol GG. 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] Nelson MC, Morrison M, Yu Z. A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. *Bioresource Technology*, 2011; 102(4), 3730-3739. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.119>
- [11] 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> [In Persian]
- [12] Loughrin JH, Parekh RR, Agga GE, Silva PJ, Sistani KR. 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 MIM, 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 CD, Young W, Mavlean PH, Cookson A, Bermingham EN. 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 IH, Ebner C, Podmirseg SM, Etemadi-Shalamzari M, Hupfauf 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 BJ, 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 PS, Sobczak A, Drewniak L, Dziembowski A, Lipinski L. 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 AJ, Sloan WT, Ijaz UZ. 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 PD, Dennis PG, Hugenholtz P, Rabaey K, Tyson GW. 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 PG, 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 AM, He Y, Fang J, Nielsen PH, 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 HD, 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, Hennebel 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>