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

Journal of Microbial Biology
E-ISSN: 3060-7647
15rd Year, Vol. 15, No. 57, 2026 pp. 17-32
Received: 02/11/2025 Accepted: 06/01/2026

(Research Paper)

Study of the Microbial Population in the Anaerobic Digester of Isfahan's Municipal Solid Waste Using Next-Generation Sequencing Technique

Meghdad Tahmasebi
Isfahan Municipality Waste Management Organization, Iran
meghdad_tahmasebi@yahoo.com

Azam Aliasghari Veshareh[1]

Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
Applied Microbiology and Microbial Biotechnology Research Center, Alzahra University, Tehran, Iran
a.aliasghary@alzahra.ac.ir

Abstract

Anaerobic digestion is a microbial process that is widely used for the treatment of organic waste. Anaerobic digesters are considered an efficient method for waste management and renewable energy production. In this study, the communities of bacteria and archaea in the anaerobic digester of the Isfahan municipal solid waste treatment facility were investigated using the 16S rRNA gene next-generation sequencing technique. The main objective of this study was to identify and evaluate the most significant bacteria that play a key role in biogas production. The results of this study demonstrated that the microbial community in the anaerobic digester of the Isfahan region was mainly composed of two phyla: *Bacteroidota* (44.7%) and *Firmicutes* (30.5%), which together accounted for 75.2% of the total microbial population. Furthermore, the phyla *Proteobacteria* (9%), *Cloacimonadota* (5.6%), *Patescibacteria* (5.6%), and *Actinobacteriota* (4.5%) were present in significant proportions. At the genus level, uncharacterized genera, such as DMER64 and LNR_A2-18, were identified as dominant groups. In contrast, the presence of key functional genera, including syntrophic bacteria such as *Syntrophomonas* and *Pelotomaculum*, which play a crucial role in degrading long-chain fatty acids, along with hydrogenotrophic methanogens such as *Methanobrevibacter*, indicated the existence of an efficient metabolic network within this system. By identifying the microbial community and key functional groups, this study provides insights into the metabolic capacity of the digester. These findings can serve as a foundation for future studies investigating the direct relationship between these microbial communities and digester performance indicators, such as the methane production rate, and for proposing practical strategies for process optimization.

Keywords: Anaerobic digester, Municipal solid waste, Metagenomic sequencing, Next-generation sequencing, Bacteria, Biogas.

[1] Corresponding Author

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/).
Tahmasebi, M., Aliasghari Veshareh, A. Study of microbial populations in anaerobic digesters of urban solid waste in Isfahan using next-generation sequencing techniques. *Journal of Microbial Biology*, 2026; 15(57): 17-32. doi: 10.22108/bjm.2026.147268.1658

Introduction

Anaerobic digestion is a vital microbial process for organic waste treatment and renewable energy generation. The effectiveness of this technology depends on the microbial communities responsible for breaking down organic material. Techniques such as 16S rRNA gene amplicon sequencing and shotgun metagenomics offer remarkable opportunities to explore and understand the microbial communities within anaerobic systems. These advanced methods provide crucial insights into the taxonomy and functional potential of these microorganisms. By utilizing these methods, researchers can gain a deeper understanding of these ecosystems in terms of their structure and functions.

Despite global advancements, there is a significant knowledge gap regarding the microbial ecology of operational municipal solid waste (MSW) digesters in Iran. This study addresses this gap by investigating the bacterial and archaeal communities in Iran's first successful pilot-scale anaerobic digester for MSW, located at the Isfahan compost plant. Using 16S rRNA gene NGS, this study aimed to establish the first profile of this unique microbial ecosystem and identify key functional groups, such as syntrophic bacteria and methanogens, essential for the anaerobic degradation process. This foundational research provides critical baseline data for assessing system performance and informing optimization strategies for sustainable biogas production from urban waste under local conditions.

Materials and Methods

A composite sample was collected from the effluent of a pilot-scale plug-flow anaerobic digester treating municipal solid waste in Isfahan during a period of stable operation. Concurrently, key operational parameters, including pH, total solids (TS), volatile solids (VS), volatile fatty acids (VFA), total alkalinity, and biogas volume/composition, were recorded. Genomic DNA was extracted from the sludge sample using a modified phenol-chloroform protocol described previously. The V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene was amplified using barcoded primers 515F and 806R, following a standardized PCR protocol.

The amplicons obtained were purified, and sequencing libraries were prepared using the Illumina TruSeq DNA PCR-Free Kit. High-throughput sequencing was performed using an Illumina NovaSeq platform, generating 250-bp paired-end reads. Bioinformatic processing included merging paired-end reads, quality filtering and chimera removal. High-quality sequences were clustered into operational taxonomic units (OTUs) at a 97% similarity threshold using UPARSE. Taxonomic classification was performed using the SILVA database (v138) and the RDP Classifier. Subsequent analyses, including alpha and beta diversity calculations, were conducted using QIIME and R. The raw sequencing data are publicly available in the NCBI SRA under the BioProject accession number PRJNA1131470.

Discussion of Results and Conclusions

The municipal solid waste that entered the waste processing plant from 1401 to 1403 contained 72.58% organic matter, based on regular periodic analyses. The acidity of the organic fraction of the digester input waste and output sludge was 5.85 and 9.27, respectively. In addition, the total organic carbon (TOC) values were reported to be 39.8 and 28.6%, respectively. The carbon-to-nitrogen (C/N) ratios were 21.86 and 12.22, respectively.

The pH of the system was maintained within the neutral and optimal range of anaerobic digestion (7-9). The output sludge moisture was 78%, and the volatile solids (VS) to total solids (TS) ratio was 65%, indicating effective decomposition of organic matter. The total volatile fatty acid (VFA) concentration was 3500 mg/L and the total alkalinity was 19000 mg/L, indicating a good balance between acidification and methanogenesis processes. The specific methane production in this system was 508 m^3/tonne of input volatile solids, with an average methane concentration in biogas of 55%, indicating good process efficiency under the existing operating conditions.

The results of molecular analysis based on NGS data showed that the taxonomic composition of bacteria in the anaerobic digester was mainly dominated by the two phyla, *Bacteroidota* and *Firmicutes*, which together accounted for 75.2% of the total microbial community. The phylum *Bacteroidota* was the most abundant group, with 44,748 reads (44.7%), followed by *Firmicutes* with 30,453 reads (30.5%). The third group, Proteobacteria, was characterized by 8,968 reads (9%), whereas the other phyla contributed less than 6% of the sample microbial community.

doi: 10.22108/bjm.2026.147268.1658

Cloacimonadota (5583 reads, 5.6%) and *Patescibacteria* (5565 reads, 5.6%) were identified as the most prominent subphyla, followed by *Actinobacteriota* (4520 reads, 4.5%). The less abundant phyla included *Cyanobacteria* (1.6%), *Spirochaetota* (0.8%), *Thermotogota* (0.4%), and *Chloroflexi* (0.3%). The "Other" category, which included 14 additional phyla, comprised 1.4% of the community, with *Synergistota* (2.0%) and *Bdellovibrionota* (2.0%) being the most prominent members.

The results of the metagenomic analysis showed that the microbial community of this anaerobic digester was dominated by two sequences with provisional tags DMER64 and LNR_A2-18, which did not belong to any known genus level in the reference database. The significant presence of unidentified_*Chloroplast* among the top 30 genera is evidence of the plant origin of the substrate used in the digester. In addition, the presence of specialized fermenting genera, such as *Syntrophomonas* and *Lactobacillus*, in this assemblage indicates the high capability of the system to degrade complex organic materials.

The obtained performance data confirmed that the digester was in a stable and efficient operating mode at the time of sampling. The specific methane production of 508 m^3/t VS and the concentration of 55% methane in biogas are desirable indicators for municipal waste digesters. This good performance can be attributed to the healthy and complete microbial structure identified in the present. Maintaining the pH in the range of 7-9 provided a suitable environment for the activity of different microbial groups. The low pH value in the digester can affect and reduce the activity of microbes associated with the digestion process, particularly methanogenic bacteria. These bacteria require a neutral to slightly alkaline pH range for optimal activity, as they are highly sensitive to changes in pH. In this study, the recorded pH was within the range necessary for effective digestion and activation of methanogenic growth and biogas production.

The composition of the microbial community identified in the digester under study provides an indication of the typical characteristics of an anaerobic digester of municipal waste. The predominant presence of fermentative bacteria, such as *Sedimentibacter*, *Proteiniphilum*, and *Lactobacillus*, which are involved in the degradation of proteins and carbohydrates, *together* with specialized centrotrophic bacteria such as, *Syntrophomonas*, indicates the existence of an efficient network for the degradation of complex organic matter in municipal waste. At the end of this metabolic chain, hydrogenotrophic methanogens, such as *Methanobrevibacter*, play a key role in the methane production process by utilizing the end products of centrotrophs, including hydrogen and carbon dioxide. Such microbial organization is considered to guarantee high efficiency of the system in biogas production.

doi: 10.22108/bjm.2026.147268.1658

زیست‌شناسی میکروبی
سال پانزدهم، شماره ۵۷، ۱۴۰۵، صفحه ۱۷-۳۲
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۱۶

مقاله پژوهشی

مطالعه جمعیت میکروبی موجود در هاضم بی‌هوازی زباله‌های جامد شهری اصفهان با استفاده از تکنیک توالی‌یابی نسل جدید

مقداد طهماسبی
سازمان مدیریت پسماند شهرداری اصفهان، ایران
meghdad_tahmasebi@yahoo.com

اعظم علی اصغری وشاره*
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی و بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
*نویسنده مسئول:a.aliasghary@alzahra.ac.ir

چکیده

هضم بی‌هوازی یک فرایند میکروبی است که به‌طور گسترده برای تصفیه زباله‌های آلی کاربرد دارد. هاضم‌های بی‌هوازی به‌عنوان روشی کارآمد در مدیریت پسماند و تولید انرژی تجدیدپذیر مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این پژوهش، جامعه باکتری‌ها و آرکی‌های موجود در هاضم بی‌هوازی زباله‌های جامد شهری اصفهان با استفاده از تکنیک توالی‌یابی نسل جدید ژن 16S rRNA بررسی شده است. هدف اصلی این مطالعه شناخت و ارزیابی مهم‌ترین باکتری‌هایی است که در فرایند تولید بیوگاز نقش کلیدی دارند. نتایج این پژوهش نشان دادند جامعه میکروبی در هاضم بی‌هوازی منطقه اصفهان عمدتاً از دو شاخه *Bacteroidota* با سهم ۴۴/۷ درصد و *Firmicutes* با سهم ۳۰/۵ درصد بوده است که این دو درمجموع ۷۵/۲ درصد از کل جامعه میکروبی را تشکیل می‌دهند. علاوه بر این، شاخه‌های *Proteobacteria* با ۹ درصد، *Cloacimonadota* با ۵/۶ درصد، *Patescibacteria* با ۵/۶ درصد و *Actinobacteriota* با ۴/۵ درصد نیز حضور چشمگیری داشتند. در سطح جنس، جنس‌های ناشناخته‌ای مانند DMER64 و LNR_A2-18 به‌عنوان جنس‌های غالب شناسایی شدند. از سوی دیگر، حضور جنس‌های مهم عملکردی نظیر باکتری‌های سنتروفیک همچون *Syntrophomonas* و *Pelotomaculum* که نقش کلیدی در تجزیه اسیدهای چرب بلندزنجیر دارند، به همراه متانوژن‌های هیدروژنوتروف ازجمله *Methanobrevibacter*، نشان‌دهندهٔ وجود یک شبکه متابولیکی کارآمد در این سیستم بود. این پژوهش با شناسایی جامعه میکروبی و گروه‌های کلیدی عملکردی، اطلاعاتی از ظرفیت متابولیک این هاضم فراهم می‌کند. نتایج حاصل می‌توانند پایه‌ای برای مطالعات آتی باشند که ارتباط مستقیم میان این جوامع میکروبی و شاخص‌های عملکردی هاضم، مانند میزان تولید متان را بررسی می‌کنند و راهکارهای عملی برای بهینه‌سازی پیشنهاد می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: هاضم بی‌هوازی، زباله جامد شهری، توالی‌یابی متاژنومیکس، توالی‌یابی نسل جدید، باکتری‌ها، بیوگاز

* **نویسندهٔ مسئول مکاتبات**

طهماسبی, مقداد, علی اصغری وشاره, اعظم. مطالعه جمعیت میکروبی موجود در هاضم‌های بی‌هوازی زباله‌های جامد شهری اصفهان با استفاده از تکنیک توالی‌یابی نسل جدید .*زیست شناسی میکروبی*، ۱۴۰۵؛ ۱۵(۵۷): ۱۷-۳۲.

doi: 10.22108/bjm.2026.147268.1658

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

زباله‌های جامد شهری (MSW[1]) شامل موادی‌اند که در مناطق شهری دور ریخته می‌شوند؛ مانند زباله‌های خانگی و گاهی زباله‌های تجاری که توسط شهرداری‌ها جمع‌آوری و دفع می‌شوند (۱). دسترسی به انرژی و مدیریت پسماند از چالش‌های بزرگ کشورهای درحال توسعه است. تقاضای انرژی به‌دلیل رشد جمعیت از عرضه پیشی گرفته است؛ در حالی که منابع متداول مانند نفت و گاز درحال کاهش هستند و انتشار گازهای گلخانه‌ای را تشدید می‌کنند. درنتیجه، تمرکز بسیاری از تحقیقات بر یافتن انرژی‌های تجدیدپذیر مانند خورشیدی و بادی به‌عنوان جایگزین‌های سبز افزایش یافته است؛ با این حال، این منابع به‌دلیل وابستگی به شرایط آب‌وهوایی قادر به پاسخگویی کامل به نیاز روزافزون انرژی نیستند (۲).

هضم بی‌هوازی به‌دلیل ظرفیت چشمگیر خود در تولید متان به‌عنوان یک فناوری برجسته شناخته شده است. در این فرایند، متابولیت‌های متعدد و ارزشمندی تولید می‌شوند؛ با این حال، تحقیقات اخیر نشان داده‌اند میکروبیوم‌های فعال در این فرایند دارای مقاومت و انعطاف‌پذیری درخور توجهی هستند. همین ویژگی‌ها چالش‌هایی در جهت دستکاری این میکروبیوم‌ها به‌منظور تمرکز بر تولید یک متابولیت خاص ایجاد کرده‌اند؛ ازاین‌رو، دستیابی به درک عمیق‌تر قابلیت تنظیم و کنترل میکروبیوم‌های بی‌هوازی می‌تواند زمینه‌ای مهم برای پیشرفت صنایع زیست‌محور فراهم کند (۳).

میکروارگانیسم‌ها نقش کلیدی در تجزیه و تبدیل ترکیبات آلی و آلاینده‌ها در بیوراکتورهایی دارند که به‌منظور تصفیه انواع مختلف زباله طراحی شده‌اند. این موجودات در جوامعی بسیار پیچیده سازمان‌دهی شده‌اند و اساس عملکرد تصفیه‌خانه‌های فاضلاب و محل‌های دفن زباله جامد را تشکیل می‌دهند. تحلیل دقیق این جوامع میکروبی و طبقه‌بندی آنها با استفاده از داده‌های فیلوژنتیکی، کاربردهای متعددی در نظارت بر واکنش‌های سیستم به تغییرات پارامترهای عملیاتی، همچنین توسعه و بهینه‌سازی شرایط مطلوب برای بیوراکتورها دارد (۴). شناسایی میکروارگانیسم‌ها در سامانه‌های هضم بی‌هوازی تا پیش از این عمدتاً از طریق ساخت کتابخانه‌های کلون مبتنی بر ژن 16SrRNA و توالی‌یابی سنگر[2] انجام می‌پذیرفت (۵). با وجود این، در روش‌های سنتی تعیین توالی DNA، هر نمونه باید به‌طور جداگانه بررسی شود. این روش برای نمونه‌های محیطی، به‌خصوص برای تحقیقات در مقیاس بزرگ، کارایی لازم را ندارد. نمونه‌های محیطی معمولاً ترکیبی از DNA متعلق به تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها را شامل می‌شوند. استخراج و تحلیل توالی‌های DNA از تعداد زیادی میکروارگانیسم مختلف در یک نمونه محیطی مستلزم توانایی خواندن داده‌های DNA به‌صورت موازی و در سطوح مختلف است. این ویژگی برجسته فناوری‌های تعیین توالی نسل جدید (NGS[3]) محسوب می‌شود (۶).

با ظهور روش‌های پیشرفته توالی‌یابی نسل جدید، تحولی عظیم رخ داده است که به پژوهشگران در حوزه بوم‌شناسی میکروبی امکان می‌دهد حجم بی‌سابقه‌ای از داده‌های فیلوژنتیکی را در زمانی کوتاه و با هزینه‌ای مقرون‌به‌صرفه تولید کنند (۴). متاژنومیکس از ژن 16SrRNA بهره می‌گیرد که به‌طور معمول برای شناسایی و طبقه‌بندی باکتری‌ها به کار می‌رود. این ژن کوچک (حدود ۱۵۰۰ جفت‌باز) به‌طور گسترده در میان موجودات پروکاریوتی نظیر باکتری‌ها و آرکی‌ها یافت می‌شود. در روش‌های متداول توالی‌یابی، DNA با استفاده از آغازگرهایی تکثیر می‌شود که با نواحی حفاظت‌شدهٔ ژن 16SrRNA تطابق دارند. آمپلیکون‌های تولیدشده، دست‌کم یک ناحیه بسیار

[1] - Municipal solid waste (MSW)

[2] - Sanger sequencing
[3] - Next-generation sequencing (NGS)

doi: 10.22108/bjm.2026.147268.1658

متغیر را شامل می‌شوند که می‌توانند برای توالی‌یابی و طبقه‌بندی باکتری‌ها استفاده شوند. این فرایند، امکان طبقه‌بندی خوانش‌ها را در سطوح مختلف نظیر سلسله، شاخه، رده، راسته، خانواده، جنس و در مواردی گونه فراهم می‌آورد. این طبقه‌بندی براساس مقایسه و تطبیق توالی‌های کوتاه به‌دست‌آمده از خوانش‌ها با یک پایگاه داده مرجع 16S صورت می‌گیرد. نتیجه این تجزیه و تحلیل شامل تعداد کل خوشه‌های طبقه‌بندی‌شده برای هر نمونه در سطوح مختلف طبقه‌بندی است (۶).

توالی‌یابی متاژنومیک شاتگان[1] به‌عنوان رویکردی پیشرفته‌تر، امکان توالی‌یابی مستقیم DNA استخراج‌شده را فراهم می‌کند که در نتیجه آن، اطلاعات دقیق‌تری درخصوص هویت میکروبی، عملکردهای متابولیسمی و سایر داده‌های زیستی مرتبط، نظیر ژن‌های نوظهور در دسترس قرار می‌گیرد. افزون بر این ویژگی‌ها، پیشرفت‌هایی نظیر کاهش هزینه‌های اجرایی و افزایش عمق توالی‌یابی منجر به گسترش کاربرد متاژنومیک در مطالعه جوامع پیچیده میکروبی نظیر نمونه‌های محیطی شامل آب دریا، خاک‌ها، روده انسان و منابع آب شیرین شده است؛ این امر به تحلیل با وضوح بالاتر از چنین محیط‌هایی کمک شایانی کرده است (۵).

آرکی‌های متانزا به‌عنوان اصلی‌ترین میکروارگانیسم‌های تولید متان شناخته می‌شوند؛ اما نقش باکتری‌ها در فرایند هضم بی‌هوازی نیز بسیار حیاتی است؛ زیرا آنها مرحله مقدماتی این فرایند را بر عهده دارند. باکتری‌ها وظیفه تجزیه پلیمرهای پیچیده به مونومرها و سپس تبدیل این مونومرها به ترکیباتی نظیر هیدروژن، استات و دی‌اکسید کربن را دارند؛ این ترکیبات به‌عنوان مواد اولیه مورد نیاز برای فعالیت آرکی‌های متانزا محسوب می‌شوند (۷).

طرح ساخت دستگاه هاضم بی‌هوازی برای تولید بیوگاز از زباله‌های جامد شهری در اصفهان، نخستین‌بار در ایران در کارخانه تولید و فرآوری کمپوست این شهر و در مقیاس پایلوت اجرا شد. این دستگاه به شکل یک مکعب مستطیل افقی ۲ متری طراحی شده و دارای چهار همزن عرضی است. حجم کل آن ۰/۷۵ متر مکعب و حجم مفید کاری ۰/۶۵ متر مکعب بود (شکل ۱). به‌صورت روزانه، ۲۰ کیلوگرم بخش آلی زباله‌های جامد شهری به داخل رآکتور تزریق می‌شد. لجن خروجی از این هاضم که دارای رطوبت تقریباً ۸۰ درصد بود، به‌عنوان نمونه‌ای از کمپوست بی‌هوازی بررسی شد.

با وجود پیشرفت‌های قابل‌توجه در شناخت جوامع میکروبی هاضم‌های بی‌هوازی در سطح جهانی، تاکنون مطالعه‌ای انجام نشده است که با استفاده از NGS به بررسی ساختار و عملکرد جامعه میکروبی یک هاضم بی‌هوازی فعال در زمینه پردازش زباله شهری در ایران بپردازد. این خلأ داده‌ای، به‌ویژه دربارهٔ اولین هاضم بی‌هوازی پایلوت موفق کشور که در کارخانه کمپوست اصفهان احداث شده است، یک شکاف علمی مهم به شمار می‌رود. دستیابی به درک دقیق از این جامعه میکروبی منحصربه‌فرد، به‌ویژه شناسایی و تحلیل عملکرد گروه‌های کلیدی مانند باکتری‌های سینتروفیک و آرکی‌های متانوژن، برای فهم بهتر مکانیسم‌های تأثیرگذار بر کارایی این سیستم نوآورانه و همچنین بهینه‌سازی عملکرد آن در شرایط محلی اهمیت ویژه‌ای دارد.

بر این اساس، هدف اصلی این پژوهش استفاده از روش توالی‌یابی نسل جدید ناحیه 16S rRNA برای ایجاد اولین نقشه جامع از ترکیب جامعه باکتریایی و آرکئایی در این هاضم در اصفهان است. علاوه بر این، مطالعه قصد دارد گروه‌های میکروبی عملکردی کلیدی (به‌ویژه سینتروف‌ها و متانوژن‌ها) را شناسایی کند که نقش محوری در زنجیره تجزیه بی‌هوازی و تولید متان دارند. این مطالعه، به‌عنوان

[1] - Shotgun metagenomic

doi: 10.22108/bjm.2026.147268.1658

نخستین گزارش علمی از اکولوژی میکروبی یک هاضم بی‌هوازی عملیاتی در ایران، نه‌تنها این خلأ علمی را پوشش می‌دهد، بلکه با ارائه داده‌های پایه معتبر و متناسب با شرایط بومی، زمینه‌ای مناسب برای ارزیابی سلامت سیستم، مقایسه‌های آینده با فناوری‌ها یا مناطق دیگر و نیز تدوین راهبردهای عملی با هدف بهبود پایدار راندمان تولید بیوگاز از زباله شهری در کشور فراهم می‌آورد.

شکل ۱: پایلوت هاضم بی‌هوازی بخش آلی زباله‌های جامد شهر اصفهان، مستقر در کارخانه پردازش پسماند اصفهان

Figure 1: The pilot anaerobic digester of the organic fraction of solid waste in Isfahan, located at the Isfahan Waste Processing Plant.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری از دستگاه هاضم بی‌هوازی و داده‌های عملکردی

در این مطالعه، یک نمونه مرکب از خروجی راکتور جریان پیستونی (PFR[1]) در مقیاس پایلوت کارخانه مدیریت پسماند شهری در اصفهان جمع‌آوری شد. نمونه‌برداری در یک مقطع زمانی از دوره عملیاتی پایدار راکتور (زمانی که پارامترهای خروجی مانند تولید بیوگاز و pH در حالت ثابت و بدون نوسان شدید بودند) انجام گرفت. هدف از نمونه‌برداری، ثبت تصویری از جامعه میکروبی در یک نقطه مشخص از فرایند پایدار بود. بلافاصله پس از جمع‌آوری، نمونه در ظروف استریل و بدون هوا قرار داده شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه، منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آنالیزهای مولکولی نگهداری شد.

همزمان با انجام نمونه‌برداری میکروبی، داده‌های مربوط به عملکرد هاضم از سیستم پایش عملیاتی کارخانه جمع‌آوری شد. اطلاعات جمع‌آوری‌شده شامل پارامترهای فیزیکوشیمیایی ازجمله pH، کل جامدات (TS)، جامدات فرار (VS[2])، اسیدهای چرب فرار (VFA[3]) و قلیاییت کل بود. همچنین حجم و ترکیب بیوگاز، به‌ویژه درصد متان موجود در آن، به‌عنوان بخشی از فرایند پایش روتین کارخانه و طبق پروتکل‌های استاندارد داخلی اندازه‌گیری شد.

[1] - Plug flow reactor (PFR)

[2] - Volatile Solids

[3] - Volatile Fatty Acids

doi: 10.22108/bjm.2026.147268.1658

استخراج DNA

استخراج DNA ژنومی با به کارگیری یک روش اصلاح‌شده مبتنی بر استخراج فنل-کلروفرم انجام گرفت (۸). ابتدا ۱ گرم از نمونه لجن حاصل از خروجی هاضم بی‌هوازی در ۵ میلی‌لیتر بافر PBS به حالت سوسپانسیون درآمد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای جوش قرار گرفت. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی جدا شد و به آن ۳۰۰ میکرولیتر بافر استخراج همراه با ۲۰ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K افزوده شد. این مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. در ادامه، از محلول فنل:کلروفرم: ایزوآمیل الکل (با نسبت ۲۵:۲۴:۱) به نمونه اضافه شد و مخلوط حاصل تحت سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. پس از جداسازی مایع رویی، ایزوپروپانول ۷۰ درصد به آن افزوده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در سرعت ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل با اتانول ۷۰ درصد شست‌وشو داده شد و پس از خشک‌شدن در دمای محیط، بافر TE به آن اضافه شد. درنهایت، جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. DNA استخراج‌شده برای بررسی نواحی متغیر ژن 16S rRNA (V3-V4) به شرکت Novogene (چین) ارسال شد. تمامی مراحل آماده‌سازی کتابخانه و توالی‌یابی مطابق با پروتکل استاندارد این شرکت انجام پذیرفت. خلاصه‌ای از پروتکل استاندارد اجراشده توسط این شرکت در ادامه آمده است:

تولید آمپلیکون: ناحیه‌های متغیر ژن‌های 16S rRNA برای شناسایی باکتری‌ها و آرکی‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بارکددار 16S V4: 515F-806R تکثیر شدند (جدول ۱). واکنش PCR در یک مخلوط واکنشی شامل ۱۵ میکرولیتر Phusion® High-Fidelity از شرکت New England Biolabs، غلظتی بین ۰٫۲ تا ۲ میکرومولار از هر آغازگر و تقریباً ۱۰ نانوگرم DNA الگو انجام گرفت. در مرحله بعد، محصولات PCR با اندازه مناسب ازطریق الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد، شناسایی و برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند.

جدول ۱: پرایمرهای استفاده‌شده برای تکثیر ناحیه V4 ژن 16S rRNAدر این مطالعه

Table 1: Primers used for amplification of the V4 region of the 16S rRNA gene in this study

Target Gene/Region	Primer Name	Primer Sequence
16S rRNA gene, V4 region (Bacteria and Archaea)	515F	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA
16S rRNA gene, V4 region (Bacteria and Archaea)	806R	GGACTACNVGGGTWTCTAAT

خالص‌سازی و ساخت کتابخانه: خالص‌سازی این محصولات با استفاده از کیت استخراج ژل (Qiagen مدل Qiagen Gel Extraction Kit، ساخت کشور آلمان) انجام شد. در مرحله بعد، کتابخانه‌های تعیین توالی با بهره‌گیری از کیت ساخت کتابخانه PCR TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (شرکت Illumina، ایالات متحده) و مطابق با دستورالعمل سازنده، ساخته و برچسب‌های شاخص به هر نمونه اختصاص داده شدند. کیفیت و اندازه کتابخانه‌های ساخته‌شده با دو دستگاه Qubit® 2.0 Fluorometer (شرکت Thermo Scientific) و Agilent Bioanalyzer 2100 system مورد ارزیابی کمی و کیفی قرار گرفت؛ درنهایت، توالی‌یابی روی پلتفرم Illumina NovaSeq با تولید خوانش‌های جفتی به طول ۲۵۰ جفت‌باز انجام شد.

doi: 10.22108/bjm.2026.147268.1658

توالی‌یابی DNA متاژنومیکس:
ژن‌های 16S rRNA با استفاده از آغازگر اختصاصی GTGCCAGCMGCCGCGGTAA,GGACTACHVG ،16SV4: GGTWTCTAAT CCTAYGGGRBGCASCAG,GGACTACNNGGG و 16SV34: TATCTAAT GTGCCAGCMGCCGCGGTAA,CCGTCAATTC و 16SV45: CTTTGAGTTT AACMGGATTAGATACCCKG,ACGTCATCCC 16Sv57: CACCTTCC تکثیر شدند. برای انجام واکنش‌های PCR، ترکیب شامل ۱۵ میکرولیتر از Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix محصول شرکت (New England Biolabs)، ۰/۲ میکرومولار آغازگرهای فوروارد و ریورس و حدود ۱۰ نانوگرم DNA الگو استفاده شد. مراحل حرارتی به این شکل اجرا شد: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه دناتوراسیون در دمای ۹۸ درجه به مدت ۱۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل‌شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و درنهایت یک مرحله طویل‌شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه.

کمیت و کیفیت محصولات PCR با استفاده از تکنیک خالص‌سازی توسط مهره‌های مغناطیسی بررسی شدند. نمونه‌ها براساس غلظت محصولات PCR و با نسبت‌های چگالی مشابه با یکدیگر ترکیب شدند. پس از پایان مرحله اختلاط، محصولات PCR، شناسایی و باندهای هدف به‌طور دقیق استخراج شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: پردازش اولیه و تحلیل بیوانفورماتیکی اطلاعات خام حاصل از توالی‌یابی، با استفاده از پروتکل استاندارد تدوین‌شده توسط شرکت نواژن انجام گرفته است. این فرایند شامل چندین مرحله اصلی و کلیدی است که به‌طور خلاصه می‌توان آنها را به شرح زیر بیان کرد:

پردازش اولیه و کنترل کیفیت داده‌ها: خوانش‌های جفت‌شده خام ابتدا به کمک بارکدهای یکتا به نمونه‌های مربوطه تخصیص یافتند. سپس اجزای اضافی مانند توالی‌های بارکد، آغازگرها و آداپتورها با استفاده از نرم‌افزار Cutadapt حذف شدند. برای تولید توالی‌های با کیفیت‌تر، خوانش‌های جفت‌شده هر قطعه DNA به کمک نرم‌افزار FLASH، ادغام و تگ‌های خام ایجاد شد.

فیلتراسیون کیفیت و حذف توالی‌های کایمریک: پس از کنترل کیفی دقیق، توالی‌های مبهم، بسیار کوتاه (کمتر از ۲۰۰ جفت‌باز) یا کم‌کیفیت از تگ‌های خام حذف شدند. همچنین، توالی‌های کایمریک حاصل از فرایند PCR با مقایسه تگ‌ها با پایگاه داده مرجع (SILVA نسخه ۱۳۸) و بهره‌گیری از الگوریتم UCHIME شناسایی و حذف شدند. نتیجه این مرحله، مجموعه‌ای از تگ‌های مؤثر و با کیفیت بود.

خوشه‌بندی توالی‌ها و تعریف OTUها: تحلیل تگ‌های مؤثر با استفاده از نرم‌افزار (UPARSE نسخه ۷,۰,۱۰۰۱) انجام شد. توالی‌هایی که دارای شباهت حداقل ۹۷ درصد بودند، در قالب یک واحد طبقه‌بندی عملیاتی (OTU) گروه‌بندی شدند و برای هر OTU یک توالی نماینده انتخاب شد.

شناسایی هویت تاکسونومیک: برای تعیین هویت هر OTU، توالی‌های نماینده با پایگاه داده مرجع (SILVA مرتبط با باکتری‌ها و آرکی‌ها) توسط الگوریتم RDP Classifier مقایسه شدند؛ درنهایت، تخصیص تاکسونومیک تا سطح گونه انجام گرفت.

نرمال‌سازی و تحلیل داده‌ها: ماتریس فراوانی OTUها براساس کوچک‌ترین تعداد توالی نمونه‌ها برای جبران

doi: 10.22108/bjm.2026.147268.1658

اختلاف در عمق توالی‌یابی نرمال‌سازی شد. این ماتریس تبدیل‌شده مبنای محاسبات و تحلیل‌هایی همچون شاخص‌های تنوع آلفا (شامل شانون، شاو۱ و Simpson)، بررسی تنوع بتا (براساس فاصله‌های Weighted/Unweighted Unifrac)، انجام آنالیزهای آماری و تهیه نمودارها قرار گرفت. تمامی تحلیل‌ها با نرم‌افزار (QIIME نسخه ۱,۹,۱) و بسته‌های آماری در R اجرا شدند.

بیانیه دسترسی به داده‌ها: مجموعه داده‌های پشتیبان یافته‌های این مطالعه در Sequence Read Archive (SRA) مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری (NCBI) ذخیره شده‌اند و ازطریق شناسه پروژه (BioProject) شماره PRJNA1131470 قابل دسترسی هستند. شناسه‌های دسترسی سطح نمونه شامل SAMN42286091 (BioSample) و SRX25199245 (SRA Experiment) هستند.

نتایج

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی زباله ورودی و لجن خروجی

زباله‌های جامد شهری که طی سال‌های ۱۴۰۱ تا ۱۴۰۳ به کارخانه پردازش پسماند وارد شده‌اند، براساس آنالیزهای دوره‌ای منظم، شامل ۷۲/۵۸ درصد ماده آلی بوده‌اند. مقدار اسیدیته بخش آلی زباله خوراک ورودی هاضم و لجن خروجی به‌ترتیب برابر با ۵/۸۵ و ۹/۲۷ اندازه‌گیری شده است. همچنین، مقادیر کربن آلی کل (TOC[1]) به‌ترتیب ۳۹/۸ و ۲۸/۶ درصد گزارش شده‌اند. نسبت کربن به نیتروژن (C/N) نیز به‌ترتیب ۲۱/۸۶ و ۱۲/۲۲ به دست آمده است.

عملکرد هاضم بی‌هوازی

pH سیستم در محدوده خنثی و مطلوب هضم بی‌هوازی (۹-۷) حفظ شده بود. رطوبت لجن خروجی ۷۸ درصد و نسبت جامدات فرار (VS) به کل جامدات (TS) معادل ۶۵ درصد بود که نشان‌دهندهٔ تجزیه مؤثر مواد آلی است. غلظت کل اسیدهای چرب فرار 3500 mg/L (VFA) و قلیاییت کل 19000 mg/L اندازه‌گیری شد که نشان‌دهندهٔ تعادل مناسب بین فرایندهای اسیدسازی و متانوژنز است. تولید ویژه متان در این سیستم ۵۰۸ متر مکعب به‌ازای هر تن جامدات فرار ورودی با میانگین غلظت متان در بیوگاز ۵۵ درصد بود که حاکی از کارایی مناسب فرایند در شرایط عملیاتی موجود است.

ساختار و ترکیب جامعه میکروبی هاضم بی‌هوازی

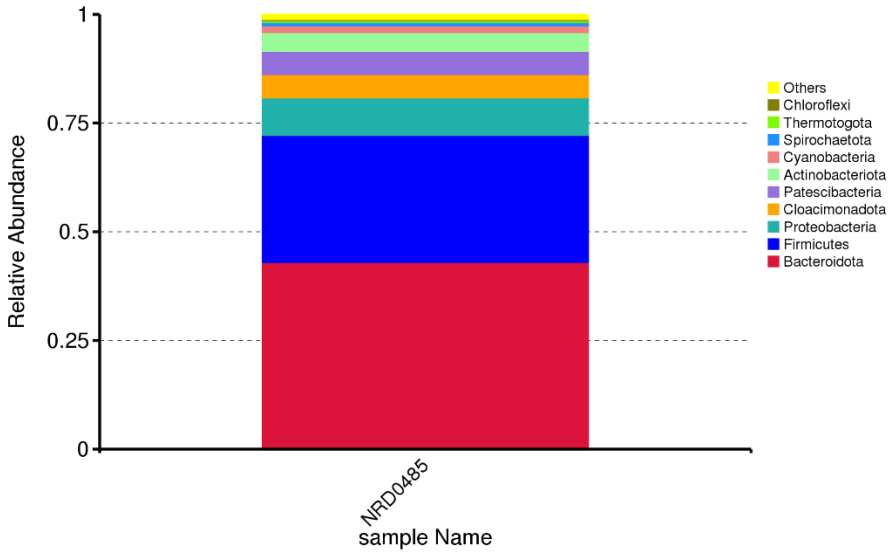
نتایج تحلیل مولکولی مبتنی بر داده‌های NGS نشان دادند ترکیب تاکسونومیکی باکتری‌های موجود در هاضم بی‌هوازی عمدتاً تحت سلطه دو شاخه *Bacteroidota* و *Firmicutes* قرار داشت که درمجموع ۷۵/۲ درصد از کل جامعه میکروبی را شامل می‌شدند (مطابق با شکل ۲). شاخه *Bacteroidota* با ۴۴۷۴۸ خوانش (معادل ۴۴/۷ درصد) فراوان‌ترین گروه بود و پس از آن *Firmicutes* با ۳۰۴۵۳ خوانش (۳۰/۵ درصد) در جایگاه دوم قرار داشت. گروه سوم، پروتئوباکتریا، با ۸۹۶۸ خوانش (۹ درصد) مشخص شد؛ در حالی که سایر شاخه‌ها هرکدام سهمی زیر ۶ درصد از جامعه میکروبی نمونه داشتند.

Cloacimonadota با ۵۵۸۳ خوانش (۵/۶ درصد) و *Patescibacteria* با ۵۵۶۵ مطالعه (۵/۶ درصد) به‌عنوان شاخه‌های فرعی برجسته شناسایی شدند و پس از آن *Actinobacteriota* با ۴۵۲۰ خوانش (۴/۵ درصد) قرار گرفت. شاخه‌های با فراوانی کمتر شامل *Cyanobacteria* با ۱/۶ درصد، *Spirochaetota* با ۰/۸ درصد، *Thermotogota*

[1] - Total Organic Carbon

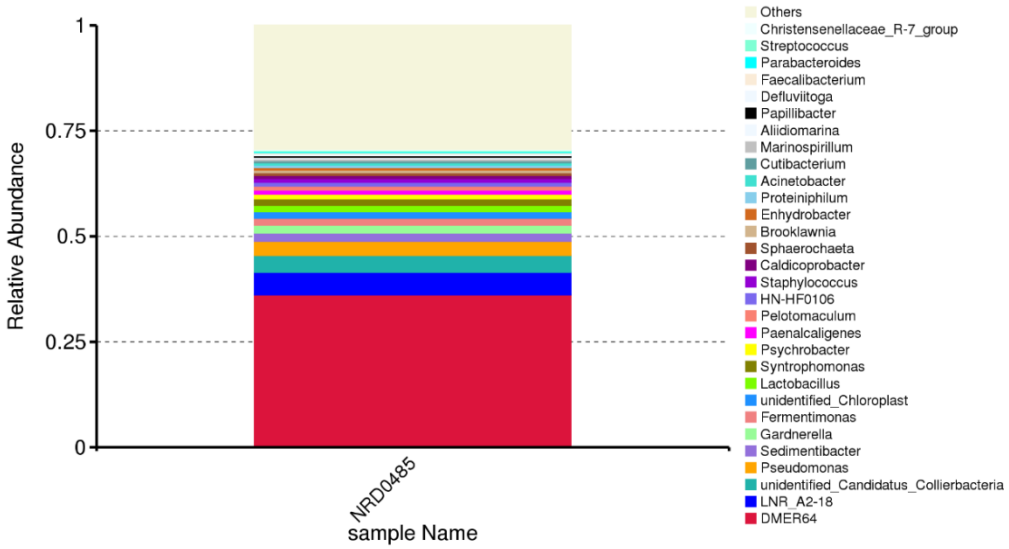
doi: 10.22108/bjm.2026.147268.1658

با ۰/۴ درصد و *Chloroflexi* با ۰/۳ درصد بودند. دسته «سایر» که شامل ۱۴ شاخه اضافی است، ۱/۴ درصد از جامعه را تشکیل می‌داد و *Synergistota* (۰/۲ درصد) و *Bdellovibrionota* (۰/۲ درصد) برجسته‌ترین اعضای این دسته بودند.



شکل ۲: فراوانی شاخه‌های باکتریایی در یک نمونه هاضم بی‌هوازی که توسط توالی‌یابی نسل بعدی شناسایی شده است

Figure 2: Abundance of bacterial phyla in an anaerobic digester sample detected by next-generation sequencing



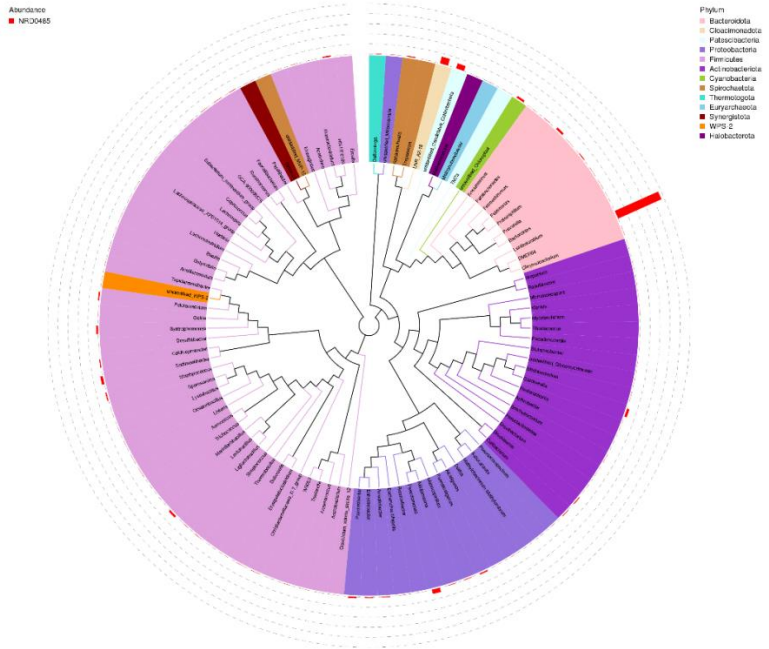
شکل ۳: فراوانی جنس‌های باکتریایی در یک نمونه هاضم بی‌هوازی که توسط توالی‌یابی نسل بعدی شناسایی شده است.

Figure 3: Abundance of bacterial genera in an anaerobic digester sample detected by next-generation sequencing.

doi: 10.22108/bjm.2026.147268.1658

نتایج آنالیز متاژنومیک به وضوح نشان می‌دهند (شکل ۳) جامعه میکروبی این هاضم بی‌هوازی تحت سلطه دو توالی با برچسب‌های موقتی DMER64 و LNR_A2-18 است که در پایگاه داده مرجع به سطح جنس شناخته‌شده‌ای تعلق ندارند. این دو توالی به‌ترتیب بیشترین فراوانی نسبی را در نمودار به خود اختصاص داده‌اند. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود، پس از این دو، جنس‌های شناخته‌شده‌تری مانند *Pseudomonas* و *Sedimentibacter* نیز از باکتری‌های پرجمعیت سیستم محسوب می‌شوند. حضور قابل توجه unidentified_Chloroplast در میان ۳۰ جنس برتر، گواهی بر منشأ گیاهی سوبسترای استفاده‌شده در هاضم است. همچنین، وجود جنس‌های تخمیرکنندهٔ تخصصی مانند *Syntrophomonas* و *Lactobacillus* در این مجموعه، نشان‌دهندهٔ قابلیت بالای سیستم در تجزیه مواد آلی پیچیده است.

برای بررسی روابط تکاملی بین اعضای جامعه میکروبی، یک درخت فیلوژنتیک براساس توالی‌های ژن 16S rRNA ساخته شد (شکل ۴). این درخت که توسط شرکت نوواژن به‌عنوان بخشی از خروجی‌های استاندارد تحلیل ارائه شده است، روابط بین ۱۰۰ جنس با بیشترین فراوانی در مجموعه داده‌ها را نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی شاخه‌ها براساس تعلق جنس‌ها به شاخه‌های مختلف انجام گرفته است. نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه و تحلیل درخت فیلوژنتیک (مطابق با شکل ۴) به‌طور شفاف حضور جنس‌های مختلف متانوژن را در نمونه مطالعه‌شده تأیید کرد؛ ازجمله *Methanobrevibacter* که به‌عنوان یک هیدروژنوتروف شناخته می‌شود و *Methanosarcina* که دارای توانایی‌های هیدروژنوتروف و همچنین استاتوکلاستیک است. این جنس‌ها متعلق به شاخه *Euryarchaeota* هستند و نقش کلیدی در تولید متان طی فرایند تجزیه بی‌هوازی دارند. جنس‌های متانوژن *Methanobrevibacter* از متانوژن‌های متداول در سیستم‌های هضم بی‌هوازی است و عمدتاً ازطریق کاهش کربن دی‌اکسید با هیدروژن متان تولید می‌کند. همچنین *Methanosarcina* قادر به تولید متان از منابع مختلفی مانند استات، ترکیبات متیل و هیدروژن/کربن دی‌اکسید است.



شکل ۴: درخت فیلوژنتیک براساس توالی ژن 16S rRNA درخت تکامل روابط بین جنس‌های مختلف باکتری‌ها و آرکی‌ها را نشان می‌دهد.

Figure 4: Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences. The tree shows the evolutionary relationships between different bacterial and archaeal genera.

doi: 10.22108/bjm.2026.147268.1658

بحث

موفقیت فرایند هضم بی‌هوازی وابسته به انواع گوناگونی از میکروارگانیسم‌ها است که وظایف مختلفی مانند هیدرولیز، اسیدزایی، استئوژنز و متانوژنز را بر عهده دارند. این میکروارگانیسم‌ها به شکل سینتروفیک فعالیت می‌کنند و هرگونه عدم تعادل در عملکرد آنها می‌تواند موجب ناپایداری در بیوراکتور شود (۹).

این مطالعه نشان داد *Bacteroidota* و *Firmicutes* بیشترین فراوانی را داشتند؛ موضوعی که در تحقیقات دیگر نیز مشاهده شده است (۱۰، ۱۱). غلبه *Firmicutes* ممکن است به دسترسی سوبسترا مرتبط باشد که رشد اعضای متعلق به این شاخه را تقویت می‌کند. *Firmicutes* قادر به تولید اندوسپورهایی هستند که مقاومت بالایی در برابر شرایط محیطی سخت دارند و درنتیجه حتی در صورت کمبود مواد مغذی، بقای خود را حفظ می‌کنند. فراوانی *Bacteroidota* احتمالاً به توانایی آنها در مقاومت در برابر فرایندهای تخمیر و تولید اسیدهای آلی به‌عنوان محصولات متابولیک ارتباط دارد؛ ازاین‌رو، حضور *Bacteroidota* در فرایند هضم بی‌هوازی با سطوح بالای تولید اسیدهای چرب فرار مرتبط است (۱۱).

باکتری‌های سنتروفیک، برای شکستن اسیدهای چرب بلندزنجیر (مثل بوتیرات و پروپیونات) به اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیر (استات) و هیدروژن، حتماً باید با متانوژن‌های مصرف‌کنندهٔ هیدروژن[1] همکاری کنند (۱۲). *Syntrophomonas* با ۱۵۷۳ خوانش شاخص‌ترین باکتری سنتروف در این هاضم بی‌هوازی است. این باکتری‌ها در اکسیداسیون اسیدهای چرب بلندزنجیر نقش دارد (۱۳). همچنین *Pelotomaculum* با ۹۸۲ خوانش یکی دیگر از سنتروف‌های بسیار مهم در تجزیه اسیدهای چرب بلندزنجیر و پروپیونات است.

متانوژن‌ها مسئول مرحله نهایی تولید متان هستند. خانواده متانوژنیک *Methanobacteriaceae* (راسته *Methanobacteriales*، رده *Methanobacteria*) شامل چهار جنس است: *Methanobacterium*، *Methanobrevibacter*، *Methanosphaera* و *Methanothermobacter*. آنها انرژی خود را از کاهش CO_2 توسط H_2 به دست می‌آورند (۹). در این مطالعه *Methanobrevibacter* با ۱۴۲ خوانش در نمودار جزء ۳۰ جنس برتر نیست؛ اما در داده‌های حاصل از توالی‌یابی وجود دارد. این جنس، یک متانوژن هیدروژنوتروف کلاسیک و بسیار رایج در هاضم‌ها است که از H_2 و CO_2 متان تولید می‌کند؛ بنابراین، حضور حتی تعداد کم *Methanobrevibacter* (با ۱۴۲ خوانش) می‌تواند به‌طور غیرمستقیم با تسهیل تولید استات، کارایی کلی تولید متان را افزایش دهد. *Methanosarcina* که از جنس‌های متان‌ساز هستند، حاوی گونه‌هایی‌اند که قادر به استفاده از استات (استوکلاستیک) هستند. علاوه بر فعالیت استوکلاستیک، گونه‌های *Methanosarcina* قادر به استفاده از متانول، متیل‌آمین‌ها و گاهی H_2 و CO_2 به‌عنوان بستر رشد هستند (۹). *Methanosarcinales* قادرند از مسیرهای استولاکتیک، هیدروژنوتروفیک و متیلوتروفیک برای تولید متان در شرایط غلظت بالای استات بهره‌برداری کنند. به‌دلیل توانایی آنها در مقاومت در برابر افزایش غلظت عوامل مهارکننده هضم بی‌هوازی همچون آمونیاک، سولفید هیدروژن و اسیدهای چرب فرار، این راسته در مقایسه با دیگر گروه‌ها رقابتی‌تر تلقی می‌شود. این ویژگی‌ها امکان رشد و بقای *Methanosarcinales* را در فرایندهای هضم بی‌هوازی فراهم می‌کند؛ ازاین‌رو، حضور این میکروارگانیسم‌ها می‌تواند به‌عنوان شاخصی برای نظارت بر فرایند استفاده شود؛ زیرا نشان‌دهندهٔ تجمع استات در سیستم است (۱۱، ۱۴). فراوانی نسبی پایین *Methanosarcina* (با ۶۳ خوانش) لزوماً به معنای مشارکت ناچیز آن در تولید

[1] - Hydrogenotrophic methanogens

doi: 10.22108/bjm.2026.147268.1658

متان نیست؛ بنابراین، شناسایی آن در این مطالعه می‌تواند نشان‌دهندهٔ ثبات و انعطاف متابولیک سیستم باشد. این شواهد علمی، هنگامی که در کنار هم قرار گیرند، نشان می‌دهند علی‌رغم اینکه میزان فراوانی متانوژن‌ها در محیط راکتور اندک به نظر می‌رسد، جامعه میکروبی شکل‌گرفته در این سیستم از تمامی اجزای ضروری زنجیره غذایی بی‌هوازی شامل هیدرولیتیک‌ها، اسیدوژن‌ها، سنتروف‌ها و متانوژن‌ها تشکیل شده است. این ترکیب زیستی با ایجاد تعاملی پیچیده و همزیستی هماهنگ میان باکتری‌ها و آرکی‌ها نقشی اساسی ایفا می‌کند که درنهایت منجر به فرایند تولید بیوگاز به‌عنوان یکی از مهم‌ترین خروجی‌های این سیستم می‌شود.

حضور جنس *Pseudomonas* به‌عنوان یکی از جنس‌های با فراوانی نسبی بالا در جامعه میکروبی هاضم بی‌هوازی این مطالعه، ممکن است در نگاه اول تعجب‌برانگیز به نظر رسد؛ زیرا این جنس عمدتاً به‌عنوان یک باکتری هوازی شناخته می‌شود. با این حال، بسیاری از گونه‌های *Pseudomonas* بی‌هوازی اختیاری بوده‌اند و قادر به تطابق متابولیک و زنده‌ماندن در شرایط کم‌اکسیژن یا حتی بی‌هوازی هستند. این یافته با نتایج مطالعات دیگر همسو است؛ برای مثال، در مطالعه‌ای در بررسی سرنوشت *Pseudomonas* در هضم بی‌هوازی کود حیوانی گزارش کردند اگرچه تعداد کلی *Pseudomonas* کاهش می‌یابد، گونه‌های فلورسنت ازجمله *Pseudomonas fluorescens* حتی پس از هضم بی‌هوازی افزایش می‌یابند (۱۵). این موضوع نشان‌دهندهٔ مقاومت و توانایی تطبیقی ذاتی برخی اعضای این جنس با محیط‌های بی‌هوازی است. حضور *Pseudomonas* در سیستم این مطالعه می‌تواند ناشی از چند عامل باشد: (۱) ورود مداوم این باکتری‌ها به همراه ذرات خاک یا بقایای گیاهی در زباله شهری، (۲) توانایی متابولیک متنوع آنها در استفاده از طیف وسیعی از سوبستراهای ساده و پیچیده که در مراحل مختلف هضم تولید می‌شوند و (۳) مقاومت ذاتی برخی گونه‌ها در برابر شرایط استرس‌زای محیطی (مانند نوسانات اسیدیته یا حضور مواد بازدارنده). از جنبه کاربردی، حضور گونه‌های بی‌خطر و مفید *Pseudomonas* مانند *P. fluorescens* در کود حاصل از هضم می‌تواند یک امتیاز اکولوژیک و کشاورزی محسوب شود و ارزش کود تولیدی را افزایش دهد؛ بنابراین، فراوانی نسبی *Pseudomonas* لزوماً نشانه اختلال در فرایند بی‌هوازی نیست؛ بلکه می‌تواند بازتابی از پیچیدگی و تنوع متابولیک جامعه میکروبی و همچنین پتانسیل بیشتر محصول نهایی باشد.

داده‌های عملکردی به‌دست‌آمده تأیید می‌کند هاضم در زمان نمونه‌برداری در حالت کارکرد پایدار و کارآمد قرار داشته است. تولید ویژه متان ۵۰۸ m^3/t VS و غلظت ۵۵ درصد متان در بیوگاز، ازجمله شاخص‌های مطلوب برای هاضم‌های زباله شهری محسوب می‌شوند. این عملکرد خوب را می‌توان به ساختار میکروبی سالم و کامل شناسایی‌شده در این مطالعه نسبت داد. حفظ pH در محدوده ۹-۷ محیط مناسبی برای فعالیت گروه‌های میکروبی مختلف فراهم کرده است. pH یک سوبسترا نقش مهمی در فعالیت‌های میکروبی و فرایند هضم بی‌هوازی دارد. مقدار پایین pH در هاضم می‌تواند بر فعالیت میکروب‌های مرتبط با فرایند هضم، به‌ویژه باکتری‌های متانوژن تأثیر بگذارد و آن را کاهش دهد. این باکتری‌ها برای فعالیت بهینه نیازمند محدوده pH خنثی تا کمی بازی هستند؛ زیرا نسبت به تغییرات pH حساسیت بالایی دارند (۱۱، ۱۶). در این مطالعه، pH ثبت‌شده در بازه‌ای قرار دارد که برای هضم مؤثر و فعال‌سازی رشد متانوژن‌ها و تولید بیوگاز ضروری است.

همچنین حضور قوی باکتری‌های تخمیرکننده و سنتروفیک (*Syntrophomonas*، *Pelotomaculum*) در کنار متانوژن‌های هیدروژنوتروف (*Methanobrevibacter*) و استاتوکلاستیک (*Methanosarcina*)، یک شبکه متابولیک

doi: 10.22108/bjm.2026.147268.1658

یکپارچه را نشان می‌دهد که قادر به تجزیه کارآمد مواد آلی و تبدیل نهایی آنها به متان است؛ بنابراین، ترکیب میکروبی گزارش‌شده توجیه زیستی مناسبی برای عملکرد موفقیت‌آمیز هاضم ارائه می‌دهد.

نتیجه‌گیری

ترکیب جامعه میکروبی شناسایی‌شده در هاضم بررسی‌شده، شاخصی از ویژگی‌های معمول یک هاضم بی‌هوازی زباله شهری را ارائه می‌دهد. حضور غالب باکتری‌های تخمیرکننده نظیر *Sedimentibacter*، *Proteiniphilum* و *Lactobacillus* که در تجزیه پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها نقش دارند، همراه با باکتری‌های سنتروفیک تخصصی همچون *Syntrophomonas*، نشان‌دهندهٔ وجود شبکه‌ای کارآمد برای تجزیه مواد آلی پیچیده زباله شهری است. در انتهای این زنجیره متابولیکی، متانزاهای هیدروژنوتروف مانند *Methanobrevibacter* با استفاده از محصولات نهایی سنتروف‌ها، شامل هیدروژن و کربن دی‌اکسید، نقشی کلیدی در فرایند تولید متان دارند. چنین سازمان‌دهی میکروبی، ضامن بهره‌وری بالای سیستم در تولید بیوگاز تلقی می‌شود.

بررسی نتایج نشان می‌دهد هاضم بی‌هوازی مطالعه‌شده دارای جامعه میکروبی متنوعی است که شامل متانوژن‌های مهمی مانند *Methanobrevibacter* و *Methanosarcina* بوده است و توان بالقوه بالایی برای تولید متان دارد. به‌منظور بهبود عملکرد این سیستم، ضروری است شرایط عملیاتی به شکلی بهینه‌سازی شود که از مهار فعالیت متانوژن‌ها جلوگیری شود. همچنین، پیشنهاد می‌شود در آینده آزمون‌های عملکردی متابولیک انجام شود تا جمعیت متانوژن‌های خاص تقویت شود. این اقدامات درنهایت منجر به افزایش کارایی تولید بیوگاز و پایداری فرایند هضم خواهد شد.

قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی سازمان مدیریت پسماند اصفهان به مرحله اجرا درآمد. از همین رو، نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به این سازمان ابراز نمایند و از مساعدت‌های ارزشمند آن در راستای تحقق اهداف تحقیق سپاسگزاری کنند.

References

[1] Cheng H, Hu Y. Municipal solid waste (MSW) as a renewable source of energy: Current and future practices in China. *Bioresource Technology*. 2010;101(11):3816–24. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.040

[2] Tshemese Z, Deenadayalu N, Linganiso LZ, Chetty M. An overview of biogas production from anaerobic digestion and the possibility of using sugarcane wastewater and municipal solid waste in a South African context. *Applied System Innovation*. 2023;6(1):13. https://doi.org/10.3390/asi6010013

[3] Schwan B, Abendroth C, Latorre-Pérez A, Porcar M, Vilanova C, Dornack C. Chemically stressed bacterial communities in anaerobic digesters exhibit resilience and ecological flexibility. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:867. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00867

[4] Sanz JL, Köchling T. Next-generation sequencing and waste/wastewater treatment: a comprehensive overview. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2019;18(4):635–80. https://doi.org/10.1007/s11157-019-09513-0

[5] Cai M, Wilkins D, Chen J, Ng S-K, Lu H, Jia Y, et al. Metagenomic reconstruction of key anaerobic digestion pathways in municipal sludge and industrial wastewater biogas-producing systems. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:778. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00778

[6] Gryta A, Oszust K, Brzezińska M, Ziemiński K, Bilińska-Wielgus N, Frąc M.

Methanogenic community composition in an organic waste mixture in an anaerobic bioreactor. *International Agrophysics*. 2017;31(3). https://doi.org/10.1515/intag-2016-0057

[7] Robles G, Nair RB, Kleinsteuber S, Nikolausz M, Sárvári Horváth I. Biogas production: microbiological aspects. *Biogas: fundamentals, process, and operation*: Springer; 2018. p. 163-98. https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-77335-3

[8] Köchl S, Niederstätter H, Parson W. DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR. In Forensic DNA typing protocols 2005 Jan 1 (pp. 13-29). Totowa, NJ: Humana Press. https://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-867-6:013

[9] Cam D, Sayin S, Sarman OZ, Iren E, Icgen B. Use of lyophilized and acclimated digestate dominated by Methanobrevibacter as a start-up inoculum in anaerobic digester led to higher methane production in biochemical methane potential assays. *Waste Management Bulletin*. 2024;2(3):36–42. https://doi.org/10.1385/1-59259-867-6:013

[10] 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(1):33. https://doi.org/10.1186/s12934-015-0218-4

[11] Zobeashia SSL-T, Abioye PO, Ijah UJJ, Oyewole OA. Identification and characterization of microbial community of anaerobic digested poultry litter. *Journal of Phytomedicine and Therapeutics*. 2021;20(1):568-80. https://doi.org/10.4314/jopat.v20i1.7

[12] Camacho CG, Ruggeri B. Syntrophic microorganisms interactions in anaerobic digestion (ad): a critical review in the light of increase energy production. *Chemical Engineering Transactions.* 2018;64:391–6. https://doi.org/10.3303/CET1864066

[13] Sakurai R, Takizawa S, Fukuda Y, Tada C. Exploration of microbial communities contributing to effective methane production from scum under anaerobic digestion. *PloS one*. 2021;16(9):e0257651. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257651

[14] Świątczak P, Cydzik-Kwiatkowska A, Rusanowska P. Microbiota of anaerobic digesters in a full-scale wastewater treatment plant. *Archives of Environmental Protection.* 2017. https://doi.org/10.1515/aep-2017-0033

[15] Iwasaki M, Qi G, Endo Y, Pan Z, Yamashiro T, Andriamanohiarisoamanana FJ, et al. Quantity changes in Pseudomonas species in dairy manure during anaerobic digestion at mesophilic and thermophilic temperatures. *Journal of Material Cycles and Waste Management.* 2019;21(3):423-32. https://doi.org/10.1007/s10163-018-0800-z

[16] Aremu M, Agarry S. Enhanced biogas production from poultry droppings using corn-cob and waste paper as co-substrate. *International Journal of Engineering Science and Technology*. 2013;5(2):247-53. https://B2n.ir/pj1021