

Research Article



CrossMark

Open Access

## 우분과 볏짚의 병합 혐기성 소화를 통한 메탄 생산에 대한 고찰

박소윤<sup>1</sup>, 장정아<sup>1</sup>, 조 흠<sup>2</sup>, 흥진경<sup>3</sup>, 조은혜<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>전남대학교 농업생명과학대학 농생명화학과, <sup>2</sup>서울대학교 공과대학 건설환경공학부, <sup>3</sup>연세대학교 과학기술융합대학 환경에너지공학부

### Effect of Rice Straw on Methane Production Potential of Cow Manure

So Yun Park<sup>1</sup>, Jeong A Jang<sup>1</sup>, Xin Zhao<sup>2</sup>, Jin-Kyung Hong<sup>3</sup> and Eun Hea Jho<sup>1\*</sup> (<sup>1</sup>Department of Agricultural and Biological Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea, <sup>2</sup>Department of Civil and Environmental Engineering, College of Engineering, Seoul National University, Seoul 08826, Korea, <sup>3</sup>Department of Environmental and Energy Engineering, College of Science and Technology, Yonsei University, Wonju 26493, Korea)

Received: 11 May 2022/ Revised: 23 May 2022/ Accepted: 26 May 2022

Copyright © 2022 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

#### ORCID

So Yun Park

<https://orcid.org/0000-0002-2737-3056>

Jeong A Jang

<https://orcid.org/0000-0003-1365-5113>

Xin Zhao

<https://orcid.org/0000-0002-9580-5092>

Jin-Kyung Hong

<https://orcid.org/0000-0003-3195-8759>

Eun Hea Jho

<https://orcid.org/0000-0003-0098-7338>

#### Abstract

**BACKGROUND:** Animal manures are one of the biggest sources of greenhouse gases and improper management of animal wastes contributes to the increasing greenhouse gases in the atmosphere. Converting greenhouse gases generated from animal manures to energy is one way of contributing to the net-zero carbon emissions.

**METHODS AND RESULTS:** The potential for methane production from cow manure (CM) was studied by measuring the methane yield using the biochemical methane potential (BMP) test. In particular, the effect of co-digestion using rice straw (RM) on the methane production was studied. The methane yields from the co-digestion of CM and RS were statistically similar to that from the mono-digestion of CM or RS. But there was a synergy effect at the

CM:RS ratio of 1:2 and 1:1. This can be attributed to the increased C/N ratio. The changed microbial community structure with the addition of substrates (CM, RS) probably led to the increase in the methane production.

**CONCLUSION(S):** The methane production potential of the particular CM used in this study was not improved by the addition of RS as a co-substrate. The addition of substrates to the anaerobic sludge promoted the increase in the microbial species having synergetic relationship with methanogens, and this can partially explain the increase in the methane production with the addition of substrates. Overall, there are needs for further studies to improve the methane yield from CM.

**Key words:** Cattle manure, Co-digestion, Methane production, Rice straw

\* Corresponding author: Eun Hea Jho

Phone: +82-62-530-2134; Fax: +82-62-530-2139;

E-mail: [ejho001@jnu.ac.kr](mailto:ejho001@jnu.ac.kr)

## 서론

전세계적으로 탄소저감은 환경 분야에서 가장 이슈가 되고 있는 분야이다. 세계 여러 국가에서 2050년까지 기후 변화 저감을 위한 노력의 일환으로 다양한 분야에서 탄소중립을 목표로 하고 있다. 탄소중립이란 온실가스 배출 제로를 의미하며, 온실가스 배출을 줄이고 탄소 상쇄 활동을 통해 나머지 온실가스의 배출량도 상쇄하는 것이다[1]. 농업환경에서는 가축 분뇨를 포함한 다양한 유기성 폐기물의 바이오에너지화가 이러한 노력의 일환이라 할 수 있다. 환경부의 가축분뇨 처리 통계에 따르면 가축분뇨 발생량은 2014년에 136,627 m<sup>3</sup>/일에서 2019년 153,220 m<sup>3</sup>/일로 꾸준히 증가하는 추세를 보이고 있다. 2019년 기준으로 총 가축분뇨 발생량 중 가장 많은 부분(약 41%)을 우분이 차지하고 있다. 이와 같이 국내에서 발생하는 가축 분뇨는 대부분 퇴비화 처리되고 있다[2].

가축 분뇨를 혐기성 소화로 처리하면 메탄과 같은 바이오 가스를 얻을 수 있고, 메탄 생성 효율을 향상시키기 위한 다양한 연구가 수행되고 있다[3, 4]. 가축 분뇨의 혐기성 소화를 통한 메탄 생성에 영향을 주는 다양한 영향 인자들에는 반응기 운전방식, 전처리 방법, pH 조건, 탄소-질소(C/N)비 등이 포함된다[5, 6]. 가축 분뇨의 혐기성 소화를 위해 기존 연구에서 사용한 반응기 운전방식은 크게 회분식 반응기와 연속식 반응기로 나뉘볼 수 있다[7-10]. 회분식 반응기는 하나의 반응기에서 지속적인 흐름이나 배출 없이 일정 시간 처리 후 배출시키는 시스템으로 하나의 반응기에서 여러 공정을 진행시킬 수 있는 장점이 있어 소규모 처리에 적합하다. 기존 연구 결과에 따르면 회분식 반응기로 혐기 소화 할 경우 체류 시간은 20일정도면 적합하다[8]. 연속식 반응기는 반응 기질이 지속적으로 유입되고, 처리 공정을 거쳐 연속적으로 소화 액을 방류하는 과정이 동시에 수행되는 시스템이다. 따라서 많은 양의 가축분뇨를 처리할 수 있어 장치를 대형화하여 처리할 수 있다는 점에서 널리 사용되고 있다. 또한 일정한 속도를 통해 연속적인 반응이 진행되기 때문에 온도 유지와 반응 제어를 쉽게 할 수 있다는 이점이 있다. 회분식 또는 연속식 운전 방식에 따라 메탄 수율이 달라질 수 있다. 예를 들어, Ma et al.[6] 연구에서 회분식 반응을 통한 돼지, 가금류, 소 분뇨의 혐기성 소화를 통해 얻은 평균 메탄 수율은 각각 238.1 L/kg-VS, 212.7 L/kg-VS, 147.4 L/kg-VS이었고, 연속식 반응을 통해 얻은 평균 메탄 수율은 각각 211.8 L/kg-VS, 98.8 L/kg-VS, 175.3 L/kg-VS였다.

혐기성 소화의 효율을 향상시키기 위해 다양한 기계적, 열적, 화학적 및 생물학적 전처리 방법을 이용할 수 있다[11]. 국내 축사에서는 순수한 우분보다는 톱밥과 혼합된 상태의 우분이 주로 발생하고, 젖소 분뇨의 고형물 중 13% 내외가 리그닌으로 구성되어 있다고 보고되어 있기 때문에, 리그닌 및 셀룰로오스와 같이 분해가 느린 물질을 목표로 전처리를 진행한다[12]. 예를 들어, 초음파처리를 통해 혐기성 소화처리를 하고자 하는 유기성 폐기물의 입자 분포를 균일하게 하여 메탄 수율을 향상시킬 수 있다[13]. 예를 들어, 전처리로 초음

파 처리(18분)를 하여 대조군과 비교해 메탄 수율을 80% 증가시킬 수 있었다[13]. 또한 기계적 처리나 산성이나 염기성의 화학물질로 전처리하여 메탄 수율을 향상시킬 수 있다[14, 15]. 예를 들어, 황산(4%)으로 전처리하여 분뇨 내 헤미셀룰로오스와 리그닌을 각각 75.7%, 43.7% 제거하였고, 메탄 수율은 190 mL/g-VS에서 203 mL/g-VS로 증가하였다[16]. 또한 기존 연구에서는 우분을 180°C에서 열로 전처리하여 메탄 수율을 58%까지 높이기도 했다[17]. 물리화학적 전처리뿐만 아니라 미생물을 이용한 생물학적 전처리를 통해 헤미셀룰로오스를 분해하고 고형물을 저감시켜 우분의 혐기성 소화를 통한 메탄 수율을 약 30% 증가시킨 사례도 있다[14]. 또한 우분에 효소(예: 펙테이트 분해효소, 셀룰라아제, 프로테아제)를 첨가한 후 50°C에서 3일 동안 혐기소화한 결과 메탄 수율이 4.44% 향상되었다[18]. 한 가지 전처리 방법을 사용하는 것보다 다양한 전처리 방법의 조합이 메탄 수율을 더욱 향상시킬 수 있다. 우분을 열화학적으로 전처리하였을 때 메탄 수율이 31.8% 증가하여 0.29 L/kg-VS였고, 추가로 단백질 분해 효소를 첨가했을 때 메탄 수율이 63.6% 향상되어 0.36 L/kg-VS에 도달했다[19].

기존 연구들은 가축 분뇨를 유기성 폐기물 등과 함께 병합 소화하면 가축 분뇨의 단독소화에 비해 메탄 생산량이 증가한다고 보고하고 있다[20-22]. 병합소화에 주로 사용되는 기질에는 가축 분뇨, 음식물 쓰레기, 하수 슬러지, 농업부산물 등이 있고[20, 22], 공동 기질의 혼합비와 전처리 방법 등에 따라 메탄 수율이 달라진다[23]. 따라서 혐기소화를 통한 메탄 생산을 최적화하기 위해서는 가축 분뇨와 공동 기질의 최적 혼합비를 찾는 것이 중요하다. 농업부산물과 우분의 병합소화에 대한 기존 연구에서는 우분과 밀짚 또는 벼짚의 병합소화에 의한 메탄 생산에 대해 다양한 결과를 보고하고 있다. 예를 들어, 밀짚과 우분의 병합소화는 우분의 단독소화보다 메탄 수율을 29-31% 향상시켰고[24], 분뇨와 벼짚을 병합소화 했을 때 단독소화보다 메탄 수율을 많게는 50-57%까지 향상시켰다[25]. 하지만 다른 연구에서는 우분과 밀짚의 병합소화가 메탄 수율 향상에 미치는 영향이 뚜렷하지 않았다[26, 27].

우분 또는 우분과 유기성 폐기물의 병합소화에서 C/N 비는 메탄 수율에 큰 영향을 미친다. C/N 비가 낮아지면 소화액 내의 제한된 탄소 조건에서 암모니아 농도가 증가하여 메탄 생산량이 낮아질 수 있다[28, 29]. 이와 대조적으로 공동 기질의 높은 C/N 비는 제한된 질소 조건에서 높은 휘발성지방산(VFA; volatile fatty acids)을 초래하여 미생물 자가 단백질 합성을 제한할 뿐만 아니라 메탄 수율 또한 감소시킨다[29]. 혐기성 소화를 위한 최적의 C/N비는 20~30이다[28]. 우분을 단독으로 소화할 때보다 우분을 벼짚이나 옥수수짚과 같은 농업부산물과 병합소화 할 때 C/N 비가 향상되었고[27], 이는 메탄 수율도 향상시켰다[30]. 마찬가지로, 돼지 분뇨도 단독소화 때보다 농업폐기물과 병합소화 했을 때 돼지 분뇨에 비해 사과 폐기물의 C/N비가 높아 병합소화의 C/N 비가 향상되었고, 메탄 수율도 향상되었다[10].

이와 같이 우분, 돈분과 같은 축분의 혐기성 소화를 통한 메탄과 같은 바이오가스 생산을 향상시키기 위해 다양한 기질을 이용한 병합소화 연구가 수행되고 있으나, 아직 더 많은 연구가 필요하다. 따라서 본 연구에서는 농가의 유기성 폐기물인 우분의 메탄 가스 발생량을 확인하고, 볏짚과의 병합소화를 통해 메탄 가스 발생량이 향상되는지 여부를 확인하기 위한 연구를 수행하였다. 또한 메탄 가스 발생량이 소화액 내 미생물 군집과 관련이 있는지 확인하기 위한 미생물 군집 분석도 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 혐기성 소화 기질

본 실험에 사용된 유기성 폐기물은 농업 환경에서 발생할 수 있는 농업부산물 중 볏짚을 사용하였고, J대학 논에서 수집하였다. 수집한 볏짚은 자연 건조 후 믹서기로 갈아서 가루 형태로 준비하였다. 실험에 사용한 우분은 경기도 A시 주변 농가에서 채취하였고, 실험을 위해 100°C에서 건조하여 건조 시료를 준비하였다. 혐기성 소화를 위한 슬러지는 서울특별시 J 하수처리장에 위치한 중온혐기 소화조에서 채취한 후 체를 이용해 이물질 제거 및 고형물의 균질화 작업을 한 후 사용 전까지 35°C에서 일주일 동안 잔존 유기물 분해 후 사용하였다. 채취한 원료로부터의 이론적 메탄발생량 산출을 위해 원소분석(Flahs200, Thermo Fisher Scientific, Germany)을 실시하였다. 우분, 볏짚 및 하수슬러지의 수분함량, 총고형물(total solid; TS), 휘발성고형물(volatile solid; VS) 등은 Standard Method에 따라 분석하였다[31]. 대상 기질의 특성을 분석한 결과는 Table 1에 나타내었다.

### 메탄생성잠재량(Biochemical methane potential; BMP) 실험 방법

BMP 실험은 세럼병(serum bottle)에서 회분식으로 혐기성 소화를 통해 메탄 생성량을 측정하는 실험이다. 본 연구에서는 Angelidaki et al.[32]이 제안한 BMP 실험 방법에 따라 BMP 실험을 수행하였다. 회분식 혐기성 소화를 위해 160 mL 세럼병에 식중 슬러지 10 mL와 90 mL 배지를 주입하였다

(Fig. 1). 배지는  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.27 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.35 g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.53 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.075 g/L,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.10 g/L,  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.02 g/L,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.50 mg/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.056 mg/L,  $\text{ZnCl}_2$  0.05 mg/L,  $\text{CuCl}_2$  0.03 mg/L,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.01 mg/L,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.50 mg/L,  $\text{NiSeO}_3$  0.05 mg/L,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  0.05 mg/L로 준비하였다. 기질 대비 미생물 양이 같도록 기질 대비 식중 슬러지의 VS 중량비(substrate to inoculum ratio, SIR)를 1:2로 기질을 주입하였다. BMP 실험에 사용한 기질은 우분과 볏짚으로 우분의 단독소화와 우분과 볏짚의 병합소화를 비교하였다. 우분(CM)과 볏짚(RS)의 비율에 따른 병합소화의 메탄 수율 차이를 보기 위해 VS 함량 기준 1:1, 1:2, 2:1으로 실험 조건을 달리했다. BMP 실험은 1) 대조군(blank), 2) 우분 단독소화(CM), 3) 볏짚 단독소화(RS), 4) 우분:볏짚(CM/RS) = 1:1(VS 기준), 5) 우분:볏짚 = 2:1, 6) 우분:볏짚 = 1:2의 6가지 조건으로 진행하였다. 메탄 발생량 분석의 바탕값으로는 기질을 주입하지 않은 대조군 조건을 활용하였다. 슬러지, 배지, 기질을 주입한 세럼병을 밀폐하기 전 혐기화를 위해 내부를 질소가스로 퍼징 후 입구를 부틸 고무(butyl rubber)와 알루미늄 캡(aluminum cap)으로 밀봉하였다. 밀폐한 세럼병은 35°C의 항온배양기에서 120 rpm으로 교반하며 가스 발생량을 관찰하였다. 주기적으로 발생가스 부피를 측정하고, 가스 시료를 채취하여, 바이오

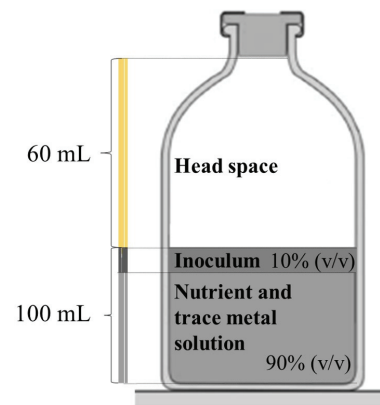


Fig. 1. Biochemical methane potential (BMP) test set-up.

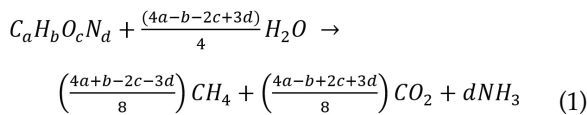
Table 1. Elemental composition of substrates used in this study

	Unit	Inoculum	Rice straw	Cattle manure
Moisture	weight %	77.95±0.20	19.03±1.89	6.55±0.34
Volatile solid	(wet basis)	13.13±0.21	69.69±1.15	16.81±0.56
C		-	31.5	38.81
H		-	5.19	4.67
O	weight %	-	35.96	26.49
N	(dry basis)	-	0.85	2.17
S		-	0.00	0.67
Ash		-	26.48	27.19
C/N	-	-	37.06	17.88

가스 시료 내 메탄 농도를 측정하였다. 누적 메탄 발생량이 전일 대비 5% 이하로 증가할 시 실험을 종료하였다. 모든 실험은 세 반복으로 수행하였고, 실험은 총 42일간 수행되었다.

### 이론적 메탄 가스발생량 산정

본 연구에서 사용한 기질의 이론적 메탄 가스발생량을 산정하기 위해 각 기질 내 탄소(C), 질소(N), 수소(H), 산소(O)를 분석하였다. 이때, 기질이 혐기성 분해를 통해 메탄, 이산화탄소, 암모니아로만 분해됨을 전제로 한 양론식(Eq. 1)에 적용하여 이론적 발생량을 계산했다[33].



여기서, a, b, c, d는 각각 C, H, O, N의 몰 분율 또한 이론적 메탄발생량과 BMP 실험에서 측정된 최대 메탄 발생량을 이용하여 생분해도를 평가하였다(Eq. 2).

$$Biodegradability (\%) = \frac{Cumulative\ Methane\ Yield}{Theoretical\ Methane\ Yield} \times 100 \quad (2)$$

### 메탄 발생 동역학 해석

BMP 실험을 위해 준비한 세럼병 시료로부터 가스 샘플 투입용 주사기(gas tight syringe)로 가스를 채취한 후 채취한 가스 내 메탄가스 농도를 GC-TCD(GC 6890, Agilent)를 사용하여 분석하였다. 누적 메탄 발생량 및 동역학적 특성을 분석하고자 Eq. 3에 제시된 modified Gompertz model을 적용하였다[34].

$$M(t) = M_{max} \times \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{R_{max} \times e}{M_{max}} \times (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (3)$$

여기서,  $M(t)$ : 시간 t일 경우 누적메탄발생량(mL-CH<sub>4</sub>/g-VS),  $M_{max}$ : 잠재메탄발생량(mL-CH<sub>4</sub>/g-VS),  $R_{max}$ : 최대메탄생산속도(mL-CH<sub>4</sub>/(g-VS day)),  $\lambda$ : 지체성장시간(lag growth phase time; day),  $t$ : 혐기배양기간(day)이다.

### 미생물 군집 분석

#### DNA 추출

각 시료를 원심분리(8,000 rpm, 10분)한 후, FastDNA™ Spin kit for soil(MP Biomedicals, USA)을 이용하여 침전물(0.5 g)로부터 메타게놈을 추출하였다. 추출한 메타게놈의 농도는 NanoQuant microplate reader(Spark 10M, Tecan, Switzerland)를 사용하여 측정하였고, -80°C에서 보관하였다.

#### 앰플리콘 시퀀싱

시료 내 세균 군집의 계통학적 구조를 분석하기 위하여,

16S rRNA 유전자 앰플리콘 시퀀싱을 진행하였다. 시료로부터 추출한 메타게놈을 주형으로 어댑터(adapter) 서열이 연결된 518F, 926R 프라이머를 사용하여 세균의 16S rRNA 유전자의 V4-V5 지역을 1차 PCR을 통해 증폭하였으며[35], PCR 증폭 조건은 다음과 같다: 95°C에서 5분 동안 pre-denaturation한 후, 95°C에서 denaturation 30초, 55°C에서 annealing, 72°C에서 extension 1분 과정을 25 cycle 반복하였다. 다음으로, Illumina사의 인덱스(index) 서열과 시퀀싱 프라이머가 결합된 프라이머를 사용하여 2차 PCR을 진행하고 Illumina사의 Miseq 플랫폼(Illumina)을 사용하여 대용량 염기서열 분석을 진행하였다. 인덱스 PCR 이후의 과정은 마크로젠사(MacroGen Inc.)에서 진행하였다.

### 시퀀싱 데이터 분석

서열의 전처리 및 계통학적 분석은 QIIME(Quantitative Insights into Microbial Ecology)의 plugin 프로그램들을 활용하여 진행하였다[36]. 얻어진 서열은 1차적으로 Phred score >10, ambiguous sequence <6의 조건으로 검수하고, Deblur 프로그램을 통해 400 bp의 에러-프리(error-free) 서열을 획득했다[37]. Subsampled open-reference OTU (Operational Taxonomic Unit) clustering법을 이용해 SILVA (release 138) database의 서열과 97% 이상의 유사성을 가지는 서열을 하나의 OTU로 간주하고 대표 서열을 무작위로 선별했다. 얻어진 OTUs 빈도표를 활용하여 Shannon's 다양성 지표를 R 프로그램의 vegan package를 활용하여 계산하고, 샘플 간의 거리를 Bray-Curtis distance법으로 계산하고 average법으로 clustering하였다. 이 과정은 R 프로그램의 'hclust' 패키지를 사용하여 진행했다. SILVA database의 서열을 사용하여 학습된 scikit-learn multinomial naïve Bayesian classifier를 이용하여 대표서열의 계통학적 위치를 계산했다[38]. 우분 및 벗짚을 처리한 경우에 윈슬러지와 비교하여 유의미한 차이를 보이는 지표종을 규명하기 위해 Indicator Species Analysis (ISA)를 수행했으며, 이는 R 프로그램의 'indicspecies' 패키지를 이용하여 계산했다[39, 40]. 본 연구에서 16S rRNA amplicon sequencing을 통해 얻은 short read는 NCBI의 bioproject (accession no. PRJNA 812389)를 통해 접근 가능하다.

## 결과 및 고찰

### 우분 및 벗짚의 성상분석

본 연구에서 사용한 하수슬러지와 기질(벗짚, 우분)의 삼 성분 분석 및 원소분석 결과를 정리하여 Table 1에 나타냈다. 혐기 소화 중 암모니아 축적 등으로 인한 불완전 혐기소화를 방지하기 위해 C/N비는 10-30 사이가 적정하고, 최적 C/N비는 12-16 사이로 보고되고 있다[41]. 원소분석을 통해 얻은 벗짚과 우분의 C/N비는 각각 37.06과 17.88이며 벗짚의 C/N비는 우분보다 2.07배 정도 높았다. Table 2는 기존 연구 중 우분을 벗짚 또는 밀짚과 병합소화한 몇몇 연구에 대한

Table 2. Carbon (C)-to-nitrogen (N) ratios of cow manure and rice straw used in other studies

No.	Substrates	Carbon (%)	Nitrogen (%)	C/N ratio	Methane generation (mL/g-VS)	References
1	Cow manure (CM)	39.5-40.8	1.1.78-2.24	18.2-22.9	-	[51]
	Rice straw (RS)	40.9	0.82	49.6	-	
	CM:RS = 2.7-6:1*	-	-	26-31	140-182	
2	Cow manure	36.81	2.30	16.0	193.23	[27]
	Rice Straw	38.19	0.80	47.5	177.29	
	CM:RS = 1:2	-	-	19.5	181.13	
	CM:RS = 1:1	-	-	22.4	196.03	
	CM:RS = 2:1	-	-	26.6	183.51	
3	Cow manure	-	-	-	165	[24]
	CM:Shredded wheat straw (SS) = 19:1*	-	-	-	214	
	CM:Briquetted wheat straw (BS) = 19:1*	-	-	-	217	

\*The ratio of the substrate mixture is on mass basis. Other ratios are based on the volatile solid (VS).

정보를 보여준다. 우분에 비해 볏짚의 C/N비가 높았고, 우분 단독소화보다 우분과 볏짚의 병합소화를 통해 C/N비를 증가시킬 수 있는 것을 알 수 있다[27, 42].

#### 단일 기질의 메탄 잠재량 및 생분해도

약 42일동안 누적 메탄 발생량을 관찰하여 우분 및 볏짚의 생화학적 메탄 잠재량을 평가하였다. 단일소화 기질인 우분 및 볏짚의 메탄 잠재량은 각각 145.52±9.18, 138.19±13.61 mL-CH<sub>4</sub>/g-VS였다(Table 3). 평균 메탄 잠재량은 우분이 더 컸지만, 우분과 볏짚의 메탄 잠재량은 통계적으로 비슷한 수준이었다(*p*-value>0.05). 기존 연구에서 보고한 우분과 밀짚의 평균 메탄 잠재량의 경우도 우분, 파쇄한 밀짚, 연탄 밀짚이 각각 306.54, 300.02, 303.21 mL-CH<sub>4</sub>/g-VS로 비슷한 수준이었다[24]. 하지만 우분과 밀짚을 병합소화(214-217 mL-CH<sub>4</sub>/g-VS)하여 우분을 단독소화할 때(165 mL-CH<sub>4</sub>/g-VS)보다 메탄 발생량을 증가시킬 수 있음을 보여주었다 [24] (Table 2).

이론 메탄 발생량에 대한 최대 메탄 발생량의 비율로 우분 및 볏짚의 생분해도를 평가하였다. 원소 분석 결과에 근거한 우분 및 볏짚의 이론 메탄 발생량은 각각 387.25, 308.39 mL-CH<sub>4</sub>/g-VS였다. 이에 근거하여 평가한 단일 기질인 우분 및 볏짚의 생분해도는 각각 37.58, 44.81%였다. 이는 볏짚보다 우분의 단일소화시 메탄전환율이 낮음을 의미한다.

#### 병합 혐기성 소화 기질의 메탄 잠재량과 시너지 효과

단일 기질을 포함하여 병합 기질의 생화학적 메탄 잠재량, 이론 메탄 발생량, 생분해도, 시너지 인덱스(synergy index)를 정리하여 Table 3에 제시하였다. 병합 기질의 메탄 잠재량은 볏짚의 병합 비율이 클수록 증가했다.

기존 연구에서는 병합소화 시너지 효과를 평가하고자 실험 및 계산을 통해 얻은 메탄 발생량의 비율을 계산해 시너지 인덱스를 이용하였다[43]. 예를 들어, 하수슬러지와 셉테이지(septage)의 병합 비율에 대한 시너지 효과를 평가하기 위해 메탄 발생량의 실험값과 계산값을 이용한 것이다[43]. 본 연구에서는 메탄 발생량 대신 생분해도를 이용해 시너지 인덱스를 평가한 이유는 메탄 발생량을 원소 조성 기반의 이론 메탄 발생량으로 표준화한 생분해도가 단순히 VS 무게를 기준으로 평가한 메탄 발생량보다 기질의 특성을 반영한 인자라고 판단했기 때문이다. 따라서 실험 생분해도 값과 계산 생분해도를 비교해 시너지 인덱스를 결정하였다. 실험 생분해도는 최대 메탄 발생량과 이론 메탄 발생량의 비율로 계산하였고, 계산 생분해도는 VS 무게 기준의 병합 비율을 고려해 단일소화 기질의 생분해도를 가중 평균하여 계산하였다.

우분 및 볏짚을 2:1로 병합한 경우 시너지 인덱스가 1.00이어서 시너지 효과가 없다고 할 수 있다(Table 3). 이와 비교해 우분 및 볏짚의 비율을 1:2 및 1:1로 병합한 경우 시너지 인덱스는 각각 1.12, 1.03로 나타나, 실험에 사용한 3개 비율 중 1:2 비율이 가장 큰 시너지 효과를 보이는 것으로 확인하였다(Table 3). 반면 기존 연구에서는 우분과 볏짚의 비율이 1:1일 때 메탄 발생량이 1:2 또는 2:1일때보다 높았다[27].

병합 혐기성 소화 시너지 효과가 나타나는 원인은 독성 물질의 희석, 다량영양 또는 미량영양 물질의 균형, 수분 조절 등이 있다[44]. BMP 실험은 미량영양 물질이 포함된 완충용액을 사용하여 낮은 고형물 농도에서 진행되기 때문에, 기질의 병합으로 인한 독성 물질의 희석, 미량영양 물질의 균형, 수분 조절 영향은 관찰된 시너지 효과의 원인에서 배제할

Table 3. Observed and predicted methane potential, biodegradability, estimated kinetic parameters of each case

Parameters (inits)	Blank	CM	RS	CM/RS=1:2	CM/RS=1:1	CM/RS=2:1
Observed CH <sub>4</sub> potential (mL/g-VS)	40.84±3.80	145.52±9.18	138.19±13.61	158.59±27.49	147.84±20.02	143.82±13.50
Theoretical CH <sub>4</sub> potential (mL/g-VS)	-	387.25	308.39	334.68	347.82	360.96
Biodegradability (% <sub>v/v</sub> )	-	37.58	44.81	47.39	42.50	39.84
Synergy index	-	-	-	1.12	1.03	1.00
<i>Modified Gompertz model</i>						
$R_{max}$ (mL/g-VS/day)	2.35	9.41	10.43	9.97	8.92	11.07
$\lambda$ (day)	9.01	10.36	10.97	9.77	10.42	12.65
$M_{max}$ (mL/g-VS)	40.84	145.52	138.19	158.59	147.84	143.82
$R^2$	0.98	0.97	0.97	0.96	0.98	0.97

수 있다. 따라서 기질의 특성인 원소 구성(C, H, O, N, S) 및 탄수화물, 단백질, 지방 조성 균형이 시너지 효과의 원인일 수 있다. 탄수화물, 단백질, 지방은 분석에 필요한 시료량(건조시료 2 kg 필요)이 부족하여 수행하지 못했으나, 원소 분석을 통해 C/N 비율을 확인하였다. 기질의 C/N 비율은 혐기성 미생물이 이용하는 기질의 영향 균형을 나타내는 중요한 척도로 탄소 또는 질소가 제한 요소일 경우, 혐기성 미생물의 대사에 불균형을 초래해 기질 이용성을 낮출 수 있다. 탄소는 미생물의 에너지원 및 biomass로 활용하는 기본 원소이고 최종적으로 메탄으로 전환될 수 있는 양과 직접적인 관련이 있다. 질소는 미생물 대사와 단백질 합성에 필수적인 영양소이다[45-47]. 우분과 볏짚 비가 1:2, 1:1, 2:1일 때 C/N비는 각각 26.26, 23.25, 21.01이었다. 볏짚의 비율이 높아질수록, C/N비가 높아지는 것을 확인하였다. 따라서 병합소화의 시너지 효과는 C/N비율의 증가에 의한 것으로 볼 수 있다.

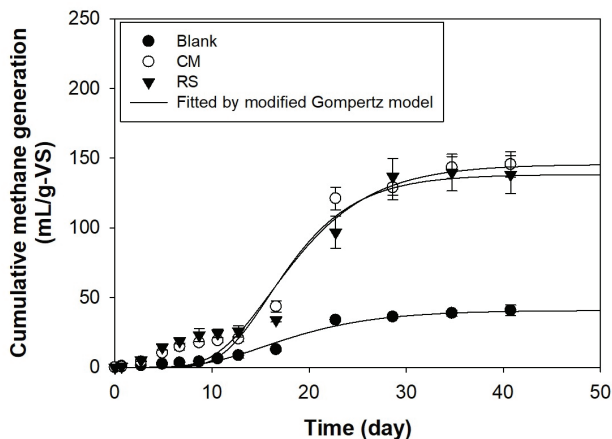


Fig. 2. Cumulative methane production during the biochemical methane potential (BMP) test using single substrate. Blank: control without substrates, CM: cow manure, RS: rice straw.

### 메탄 발생 동역학 분석

수정된 Gompertz 식 (Eq. 3)을 이용해 최대 메탄 발생속도와 초기 지체기를 평가했다(Fig. 2와 Fig. 3). 최대 메탄 잠재량( $M_{max}$ )은 실험에서 얻은 단일 또는 병합 기질의 최대 메탄 발생량으로 고정하여 최대 메탄 발생속도 상수, 초기 지체기를 평가했다. 그 결과는 Table 3에 정리하여 나타냈다. 수정된 Gompertz 모델식은 실험결과를 높은 상관계수( $R^2 = 0.96-0.98$ )로 설명할 수 있었다. 병합소화의 초기 지체기의 경우 우분과 볏짚의 비가 1:2일 때 9.77일로 가장 짧았고, 우분과 볏짚 비가 2:1일 때 가장 길었다(Table 3). 마찬가지로 최대 메탄 잠재량도 우분과 볏짚의 비가 1:2일 때 158.59 mL/g-VS로 가장 높았고, 이는 우분 단일소화보다 약 9% 증가한 양이다(Table 3). 이와 유사하게 야생초를 우분과 병합소화했을 때의 메탄 잠재량도 우분을 단일소화했을 때보다 약 8% 이상 증가한 것으로 보고되었다[22]. 반면 우분과 볏

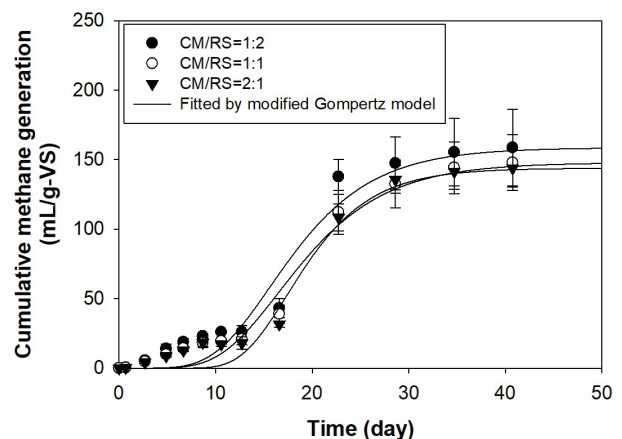


Fig. 3. Cumulative methane production during the biochemical methane potential (BMP) test using mixed substrates at different ratios. CM: cow manure, RS: rice straw.

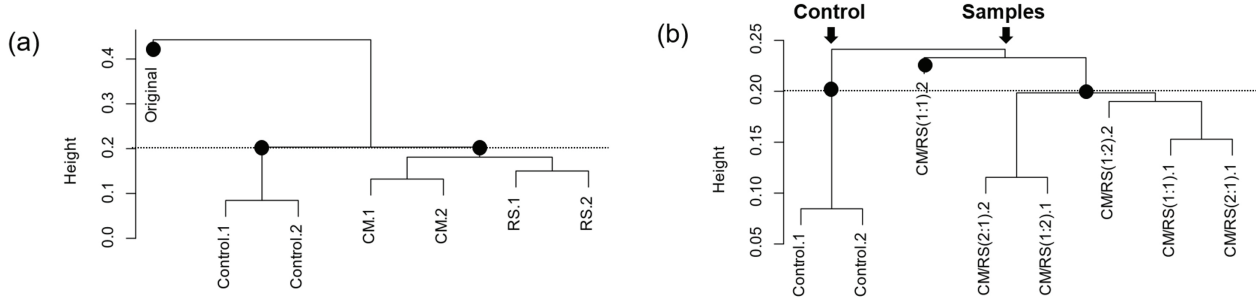


Fig. 4. Hierarchical cluster analysis using OTUs abundance data for (a) original, controls, and samples with single substrate, and (b) controls and samples with co-substrates. Original: wastewater sludge, Control: wastewater sludge in the mineral medium, CM, RS, CM/RS: wastewater sludge in the mineral medium with cow manure (CM), rice straw (RS) or mixture of cow manure and rice straw (CM/RS) as substrates.

짚의 비가 2:1일 때 메탄 잠재량이 가장 낮았다(Table 3).

**미생물 군집과 메탄 발생량의 관계**

Fig. 4는 시료 준비를 위해 사용한 원슬러지(Original), 슬러지와 배지만을 주입한 대조군(Control), 그리고 슬러지, 배지, 기질을 주입한 실험군 시료의 미생물 군집간 유사도를 보여준다. Bray-Curtis 유사도 80%를 기준으로 했을 때, 원슬러지와 대조군 사이에는 유의미한 차이(62.7%)가 있었으나, 우분과 볏짚을 단독 기질로 하여 혐기성 소화를 한 시료의 경우 원슬러지(51.4±2.5%)뿐만 아니라 우분을 처리한 경우(78.4±0.7%)에는 대조군과도 유의미한 차이를 보였으며, 볏짚을 단독으로 처리한 경우(79.2±1.0%)에는 대조군과 유사한 것으로 나타났다(Fig. 4(a)). 또한, 우분과 볏짚을 혼합하여 처리했을 때, 대조군과 비교하여 미생물 군집에서 75.9±2.3%의 차이를 보였다(Fig. 4(b)). 우분과 볏짚을 단독으로 처리한 시료와 병합 처리한 시료 간의 Bray-Curtis 유사도는 80.0±2.7%로 우분과 볏짚의 처리형태에 따른 미생물 군집의 차이는 유의미한 수준은 아닌 것으로 밝혀졌다.

중 수준(97% sequence identity)에서 지정한 OTUs 자료를 이용하여 계산된 각 샘플의 Shannon's 다양성 지표에 따르면, 원슬러지가 3.6으로 계산되었고 대조군과 실험군의 다양성은 각각 4.0±0.01, 4.2±0.1로 증가한 것으로 나타났다. 다양한 무기물이 포함된 배지와 우분 및 볏짚과 같은 비한정(undefined) 복합 기질의 주입 및 외부 기질과 함께 유입된 외부종에 의해 군집 내 다양성이 증가하는 변화가 일어난 것으로 판단되며, 이 때 변화한 미생물 분류군이 메탄생성량의 증가를 유발했음을 시사했다.

Fig. 5는 원슬러지와 실험에 사용한 시료들의 미생물 군집 분석 결과를 보여준다. 원슬러지와 대조군, 그리고 실험군의 세균 군집은 문(phylum) 수준에서 구성원의 조성(composition)은 동일했지만, 각 문의 양적 분포에서는 차이가 관찰되었다. 원슬러지와 비교해 배지를 넣은 대조군의 경우 차이가 관찰되었지만, 볏짚 또는 우분을 기질로 주입한 실험군의 경우 대조군과 비교하여 양적으로 유의미한 차이를 보이는 문 수준의 분류 군은 관찰되지 않았다(Fig. 5). 원슬러지와 대조군,

실험군 모두 *Bacteroidota* (35.2%)와 *Firmicutes* (21.6%)가 가장 높은 우점도를 보이는 것은 동일했지만, 원슬러지에서 우점하는 것으로 보였던 *Cloacimonadota* (18.3%) 문이 대조군과 실험군에서 평균 6.3 (± 1.8)%로 감소한 것으로 관찰되었다(Fig. 5). 반면, 원슬러지에서 3.4, 1.4, 0.9%로 관찰되었던 *Chloroflexi*, *Desulfobacterota*, 그리고 *Acidobacteriota*는 대조군 및 실험군에서 각각 7.3 (±1.0), 6.9 (±0.6), 그리고 3.8 (±0.4)%로 증가했다. 원슬러지와 비교하여 대조군 및 실험군에서 양적으로 증가한 분류군 중 *Acidobacteria*의 *Aminicenantales*와 *Bacteroidota*의 *Blvii28* wastewater-sludge group, *Desulfobacterota*의 *Syntrophobacter*는 모두 수소를 생성하는 syntrophic bacteria로 알려져 있다 (Table 2). 또 상대적으로 양의 변화는 미미했지만 *Spiro-*

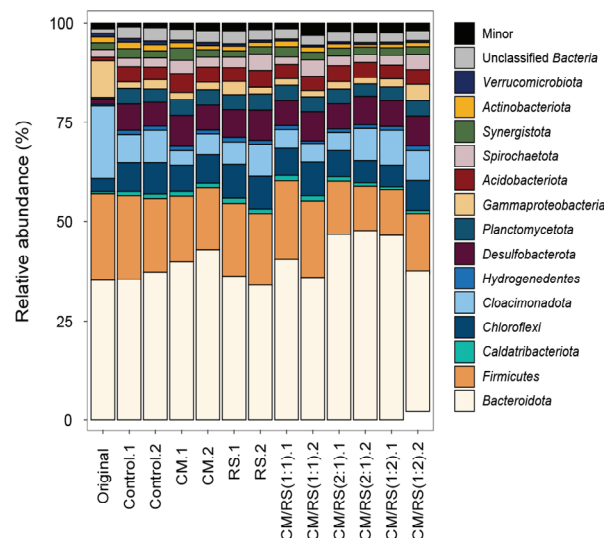


Fig. 5. Phylogenetic structure of bacterial community at the phylum level. The phyla having less than 1% relative abundance were grouped into 'minor'. Original: wastewater sludge, Control: wastewater sludge in the mineral medium, CM, RS, CM/RS: wastewater sludge in the mineral medium with cow manure (CM), rice straw (RS), or mixture of cow manure and rice straw (CM/RS) as substrates.

*chaeta* 또한 발견되었는데(Table 2), *Spirochaeta*는 잘 알려진 homoacetogen으로써 해당 종으로부터 생성되는 아세트산(acetate)과 위의 syntrophic bacteria가 생성하는 수소가 주 기질이 되어 메탄생성균의 메탄생성을 촉진할 수 있다는 연구가 보고된 바 있다[48]. 이와 같은 종의 변화가 대조군 및 실험군이 원슬러지에 비해 더 높은 양의 메탄을 생성할 수 있는 이유가 되었을 것으로 판단된다.

슬러지(대조군)에 의한 메탄생성량은 우분과 볏짚을 처리 하였을 때 큰 폭으로 증가했다(Fig. 2). 때문에 실험군에서의 높은 메탄 생성량의 원인이 될수 있는 실험군의 지표미생물을 Indicator species analysis(ISA)를 통해 분석했다. 총 36개속 수준의 지표 미생물 분류군이 도출되었으며, 그 중에는 *Bacteroidota*의 *Ruminofilibacter* (indicator value=0.99)와 *Bacteroidetes\_vadinHA17* (indicator value=0.86)가 포함되어 있었다. 두 분류군 모두 우분이 주입된 경우에 더 높은 양으로 존재하는 것으로 관찰되었다. 두 종 모두 아미노산을 대사하여 메탄생성균에 기질을 제공하는 것으로 알려져 있으며, 특히 *Bacteroidetes\_vadinHA17*은 최근 메타유전체 분석을 통해 혐기성 소화조에 존재하는 아미노산을 대사하여 메탄생성균이 필요로 하는 포름산(formate)을 생성, 제공하는 것으로 밝혀졌으며, *Candidatus Aminobacteroidaceae*라 새로운 과(family)로 명명되었다[49]. *Ruminofilibacter* 또한 최근 장시간 운전되는 혐기성 소화조에서 후반부의 단백질 대사 및 메탄생성과 밀접한 관련이 있음이 밝혀졌다[50]. 그 외에 지표종으로 도출된 *Chloroflexi*의 *Anaerolineae*, *Desulfobacterota*의 *Syntrophorhabdus*는 모두 syntrophic bacteria로 full-scale 혐기소화조에서 메탄생성에 필요한 수소를 제공함으로써 중요한 역할을 하는 핵심종으로 알려져 있다[51, 52]. 다양한 무기물이 함유된 배지를 기본 매개로 한 우분 및 볏짚의 처리가 메탄생성균의 직접적인 증감에 영향을 주었는지 본 연구에서 관찰한 바는 없으나, 메탄생성균과 상승 관계(synergetic relationship)를 보이는 것으로 잘 알려진 미생물 종의 증가를 촉발한다는 점을 직접 관찰함으로써 우분과 볏짚의 메탄 생성 촉진의 효과와 그 기작을 규명할 수 있었다.

### Note

The authors declare no conflict of interest.

### Acknowledgement

This article was supported by "Regional Innovation Strategy (RIS)" through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (MOE) (2021RIS-002). This article was also supported by NRF-2021R1A2C4001746.

### References

- Cheon Y (2022) Review of global carbon neutral strategies and technologies. *Journal of the Korean Society of Mineral and Energy Resources Engineers*, 59, 99-112. <https://doi.org/10.32390/ksmer.2022.59.1.099>.
- Kim MS, Koo N, Kim, JG (2020) A comparative study on ammonia emission inventory in livestock manure compost application through a foreign case study. *Korean Journal of Environmental Biology*, 38(1), 71-81. <https://doi.org/10.11626/KJEB.2020.38.1.071>.
- Hassan M, Masud SFB, Anwar M, Zhao C, Singh RS, Mehryar E (2022) Methane enhancement by the co-digestion of thermochemical alkali solubilized rice husk and cow manure: Lignocellulosics decomposition perspectives. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02310-w>.
- Wang K, Yun S, Ke T, An J, Abbas Y, Liu X, Zou M, Liu L, Liu J (2022) Use of bag-filter gas dust in anaerobic digestion of cattle manure for boosting the methane yield and digestate utilization. *Bioresource Technology*, 126729. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126729>.
- Kunatsa T, Xia X (2022) A review on anaerobic digestion with focus on the role of biomass co-digestion, modelling and optimisation on biogas production and enhancement. *Bioresource Technology*, 344, 126311. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126311>.
- Ma G, Ndegwa P, Harrison JH, Chen Y (2020) Methane yields during anaerobic co-digestion of animal manure with other feedstocks: A meta-analysis. *Science of the Total Environment*, 728, 138224. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138224>.
- Li Y, Achinas S, Zhao J, Geurkink B, Krooneman J, Euverink GJW (2020) Co-digestion of cow and sheep manure: Performance evaluation and relative microbial activity. *Renewable Energy*, 153, 553-563. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.02.041>.
- Cho J, Kim H, Oh D (2014) Characteristics for co-digestion of food waste and night soil using bmp test. *Journal of the Korean GEO-environmental Society*, 15, 13-18. <https://doi.org/10.14481/jkges.2014.15.9.13>.
- Tsapetos P, Kougiaris P, Alvarado-Morales M, Kovalovszki A, Corbière M, Angelidaki I (2018) Energy recovery from wastewater microalgae through anaerobic digestion process: Methane potential, continuous reactor operation and modelling aspects. *Biochemical Engineering Journal*, 139, 1-7. <https://doi.org>



- /10.1016/j.bej.2018.08.004.
10. Kafle GK, Kim SH (2013) Anaerobic treatment of apple waste with swine manure for biogas production: Batch and continuous operation. *Applied Energy*, 103, 61-72. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.10.018>.
  11. Li Y, Zhao J, Krooneman J, Euverink GJW (2021) Strategies to boost anaerobic digestion performance of cow manure: Laboratory achievements and their full-scale application potential. *Science of the Total Environment*, 755, 142940. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142940>.
  12. Jeong K-H, Kim JK, Lee D-j, Cho W-M, Ravindran B, Kwag J-H (2016) Evaluation of solidified fuel value of dairy cattle manure digested by semi-dry anaerobic digestion method. *Journal of the Korea Organic Resources Recycling Association*, 24, 95-103. <https://doi.org/10.17137/korrae.2016.24.4.95>.
  13. Zeynali R, Khojastehpour M, Ebrahimi-Nik M (2017) Effect of ultrasonic pre-treatment on biogas yield and specific energy in anaerobic digestion of fruit and vegetable wholesale market wastes. *Sustainable Environment Research*, 27, 259-264. <https://doi.org/10.1016/j.serj.2017.07.001>.
  14. Angelidaki I, Ahring BK (2000) Methods for increasing the biogas potential from the recalcitrant organic matter contained in manure. *Water Science and Technology*, 41, 189-194. <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0071>.
  15. Li R, Chen S, Li X, Saifullah Lar J, He Y, Zhu B (2009) Anaerobic codigestion of kitchen waste with cattle manure for biogas production. *Energy & Fuels*, 23, 2225-2228. <https://doi.org/10.1021/ef8008772>.
  16. Yang Q, Wang H, Larson R, Runge TM (2017) Comparative study of chemical pretreatments of dairy manure for enhanced biomethane production. *Bio-Resources*, 12, 7363-7375. <http://doi.org/10.15376/biores.12.4.7363-7375>.
  17. Budde J, Heiermann M, Quiñones TS, Plöchl M (2014) Effects of thermobarical pretreatment of cattle waste as feedstock for anaerobic digestion. *Waste Management*, 34, 522-529. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.10.023>.
  18. Sutaryo S, Ward AJ, Møller HB (2014) The effect of mixed-enzyme addition in anaerobic digestion on methane yield of dairy cattle manure. *Environmental Technology*, 35, 2476-2482. <http://doi.org/10.1080/09593330.2014.911356>.
  19. Yuan Y, Bian A, Zhang L, Chen Z, Zhou F, Ye F, Jin T, Pan M, Chen Tet al. (2019) Thermal-alkali and enzymes for efficient biomethane production from co-digestion of corn straw and cattle manure. *Bio-Resources*, 14, 5422-5437. <http://doi.org/10.15376/biores.14.3.5422-5437>.
  20. Tufaner F, Avşar Y (2016) Effects of co-substrate on biogas production from cattle manure: A review. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13, 2303-2312. <http://doi.org/10.1007/s13762-016-1069-1>.
  21. Vivekanand V, Mulat DG, Eijsink VG, Horn SJ (2018) Synergistic effects of anaerobic co-digestion of whey, manure and fish ensilage. *Bioresource Technology*, 249, 35-41. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.169>.
  22. Moset V, Fontaine D, Møller HB (2017) Co-digestion of cattle manure and grass harvested with different technologies. Effect on methane yield, digestate composition and energy balance. *Energy*, 141, 451-460. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.08.068>.
  23. Kamusoko R, Jingura RM, Parawira W, Sanyika WT (2019) Comparison of pretreatment methods that enhance biomethane production from crop residues-a systematic review. *Biofuel Research Journal*, 6, 1080. <http://doi.org/10.18331/BRJ2019.6.4.4>.
  24. Xavier CA, Moset V, Wahid R, Møller HB (2015) The efficiency of shredded and briquetted wheat straw in anaerobic co-digestion with dairy cattle manure. *Biosystems Engineering*, 139, 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2015.07.008>.
  25. Jugal Sukhesh M, Venkateswara Rao P (2019) Synergistic effect in anaerobic co-digestion of rice straw and dairy manure-a batch kinetic study. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 41, 2145-2156. <https://doi.org/10.1080/15567036.2018.1550536>.
  26. Risberg K, Sun L, Levén L, Horn SJ, Schnürer A (2013) Biogas production from wheat straw and manure-impact of pretreatment and process operating parameters. *Bioresource Technology*, 149, 232-237. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.054>.
  27. Li D, Liu S, Mi L, Li Z, Yuan Y, Yan Z, Liu X (2015) Effects of feedstock ratio and organic loading rate on the anaerobic mesophilic co-digestion of rice straw and cow manure. *Bioresource Technology*, 189, 319-326. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.033>.
  28. Li C, Strömberg S, Liu G, Nges IA, Liu J (2017) Assessment of regional biomass as co-substrate in

- the anaerobic digestion of chicken manure: Impact of co-digestion with chicken processing waste, seagrass and miscanthus. *Biochemical Engineering Journal*, 118, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.11.008>.
29. Shanmugam P, Horan N (2009) Optimising the biogas production from leather fleshing waste by co-digestion with msw. *Bioresource Technology*, 100, 4117-4120. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.052>.
  30. Su L, Sun X, Liu C, Ji R, Zhen G, Chen M, Zhang L (2020) Thermophilic solid-state anaerobic digestion of corn straw, cattle manure, and vegetable waste: Effect of temperature, total solid content, and c/n ratio. *Archaea*, 2020. 8841490. <https://doi.org/10.1155/2020/8841490>.
  31. APHA, Standard methods for the examination of water and wastewater. 1998, American Public Health Association (APHA): Washington DC, USA.
  32. Angelidaki I, Alves M, Bolzonella D, Borzacconi L, Campos J, Guwy A, Kalyuzhnyi S, Jenicek P, Van Lier J (2009) Defining the biomethane potential (bmp) of solid organic wastes and energy crops: A proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology*, 59, 927-934. <http://doi.org/10.2166/wst.2009.040>.
  33. Buswell A, Mueller H (1952) Mechanism of methane fermentation. *Industrial & Engineering Chemistry*, 44, 550-552. <https://doi.org/10.1021/ie50507a033>.
  34. Bah H, Zhang W, Wu S, Qi D, Kizito S, Dong R (2014) Evaluation of batch anaerobic co-digestion of palm pressed fiber and cattle manure under mesophilic conditions. *Waste Management*, 34, 1984-1991. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.07.015>.
  35. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO (2013) Evaluation of general 16s ribosomal rna gene pcr primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41, e1-e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>.
  36. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M et al. (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using qiime 2. *Nature Biotechnology*, 37, 852-857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.
  37. Amir A, McDonald D, Navas-Molina JA, Kopylova E, Morton JT, Zech Xu Z, Kightley EP, Thompson LR, Hyde ER et al. (2017) Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence patterns. *MSystems*, 2, e00191-00116. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00191-16>.
  38. Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, Dillon M, Bolyen E, Knight R, Huttley GA, Caporaso JG (2018) Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with qiime 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6, 1-17. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>.
  39. Cáceres MD, Legendre P (2009) Associations between species and groups of sites: Indices and statistical inference. *Ecology*, 90, 3566-3574. <https://doi.org/10.1890/08-1823.1>.
  40. De Cáceres M, Legendre P, Moretti M (2010) Improving indicator species analysis by combining groups of sites. *Oikos*, 119, 1674-1684. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18334.x>.
  41. Weiland P (2010) Biogas production: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 849-860. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2246-7>.
  42. Muhayodin F, Fritze A, Rotter VS (2021) Mass balance of c, nutrients, and mineralization of nitrogen during anaerobic co-digestion of rice straw with cow manure. *Sustainability*, 13, 11568. <https://doi.org/10.3390/su132111568>.
  43. Lee C, Zhao X, Kim JY (2022) Effect of mixing ratio on sewage sludge and septage co-digestion. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s10163-022-01372-2>.
  44. Mata-Alvarez J, Dosta J, Romero-Güiza M, Fonoll X, Peces M, Astals S (2014) A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 36, 412-427. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.039>.
  45. Gunaseelan VN (1997) Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review. *Biomass and Bioenergy*, 13, 83-114. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(97\)00020-2](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(97)00020-2).
  46. Khalid A, Arshad M, Anjum M, Mahmood T, Dawson L (2011) The anaerobic digestion of solid organic waste. *Waste Management*, 31, 1737-1744. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.021>.
  47. Adekunle KF, Okolie JA (2015) A review of biochemical process of anaerobic digestion. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6, 205. <https://doi.org/10.4236/abb.2015.63020>.
  48. Kambara H, Dinh HT, Matsushita S, Aoi Y, Kindaichi

- T, Ozaki N, Ohashi A (2022) New microbial electrosynthesis system for methane production from carbon dioxide coupled with oxidation of sulfide to sulfate. *Journal of Environmental Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2022.02.029>.
49. Mei R, Nobu MK, Narihiro T, Liu W-T (2020) Metagenomic and metatranscriptomic analyses revealed uncultured bacteroidales populations as the dominant proteolytic amino acid degraders in anaerobic digesters. *Frontiers in Microbiology*, 2763. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.593006>.
50. Tang F, Tian J, Zhu N, Lin Y, Zheng H, Xu Z, Liu W (2022) Dry anaerobic digestion of ammoniated straw: Performance and microbial characteristics. *Bioresource Technology*, 126952. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126952>.
51. Bovio-Winkler P, Cabezas A, Etchebehere C (2021) Database mining to unravel the ecology of the phylum chloroflexi in methanogenic full scale bioreactors. *Frontiers in Microbiology*, 3608. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.603234>.
52. Hao L, Michaelsen TY, Singleton CM, Dottorini G, Kirkegaard RH, Albertsen M, Nielsen PH, Dueholm MS (2020) Novel syntrophic bacteria in full-scale anaerobic digesters revealed by genome-centric metatranscriptomics. *The ISME Journal*, 14, 906-918. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0571-0>.