

Anforderungen an die Messung und Validierung von Batchtests*

Christof Holliger, Hélène Fruteau de Laclos, Sasha D. Hafner,
Konrad Koch, Sören Weinrich, Sergi Astals,
Madalena Alves, Diana Andrade, Irini Angelidaki,
Lise Appels, Samet Azman, Alexandre Bagnoud
Urs Baier, Yadira Bajon Fernandez, Jan Bartacek,
Federico Battista, David Bolzonella, Claire Bougrier,
Camilla Braguglia, Pierre Buffière, Marta Carballa,
Arianna Catenacci, Vasilis Dandikas, Fabian de Wilde,
Sylvanus Ekwe, Elena Ficara, Ioannis Fotidis,
Jean-Claude Frigon, Agata Gallipoli, Jörn Heerenklage,
Pavel Jenicek, Judith Krautwald, Ralph Lindeboom,
Jing Liu, Javier Lizasoain, Rosa Marchetti,
Florian Monlau, Mihaela Nistor, Hans Oechsner,
João Vítor Oliveira, André Pauss, Sébastien Pommier,
Francisco Raposo, Thierry Ribeiro, Christian Schaum,
Els Schuman, Sebastian Schwede, Mariangela Soldano,
Anton Taboada, Michel Torrijos, Miriam van Eekert,
Jules van Lier, Isabella Wierinck

October 7, 2020

*Document 100. Version 1.8 (Deutsche Version). Dieses
Dokument ist Teil der Sammlung der Standard-Batch-Methoden[†].*

*Empfohle Zitierung: Holliger, C.; Fruteau de Laclos, H.; Hafner, S.D.; Koch, K.; Weinrich, S.; Astals, S. et al. Requirements for measurement and validation of biochemical methane potential (BMP). Standard BMP Methods document 100, version 1.8. Online verfügbar unter <https://www.dbfz.de/en/BMP> (abgerufen am TT.MM.JJJJ).

Unter <https://www.dbfz.de/en/BMP> gibt es eine BibTeX-Datei, die in alle gängigen Literaturverwaltungsprogramme importiert werden kann.

[†]Weitere Informationen und andere Dokumente finden Sie unter <https://www.dbfz.de/en/BMP>. Alle Dokumentversionen gibt es unter <https://github.com/sashahafner/BMP-methods>; dort ist es auch möglich, Änderungen vorzuschlagen.

1 Einleitung

Dieses Dokument stellt die Mindestanforderungen für die Bestimmung und Validierung des biochemischen Methanpotenzials (auch Biomethanpotenzial genannt, BMP) in Batchtests vor, wie es gemeinsam von mehr als 40 Biogas-Experten entwickelt wurde. Die Liste der Anforderungen basiert auf dem Leitfaden von [Holliger et al. \[2016\]](#), mit Ausnahme von einigen Anpassungen der Validierungskriterien gemäß der Erkenntnisse aus [Hafner et al. \[2020b\]](#) und zusätzlichen Details zur Standardisierung der Berechnung. Details und weiterführenden Empfehlungen können den entsprechenden Literaturstellen entnommen werden [[Holliger et al., 2016](#), [Hafner et al., 2020b](#)].

2 Anforderungen an die Messung des BMP

2.1 Analyse von Substrat und Inokulum

Die Bestimmung des Gehaltes an organischer Trockensubstanz (oTS) sowohl des Substrates als auch des Inokulums ist wichtig, um die jeweiligen Zugabemengen für ein gewähltes Inokulum-Substrat-Verhältnis (ISV) zu ermitteln. Darüber hinaus wird es für die Berechnung des Biomethanpotentials des Substrates benötigt. Eine detaillierte Beschreibung der Bestimmung von TS und oTS ist u.a. in [Strach \[2016\]](#) und [Baird et al. \[2017\]](#) zu finden, sowie in einem ausführlichen kostenlosen Dokument der US-EPA in Englisch [[EPA, 2001](#)].

1. Trockensubstanz (TS). Dreifach-Bestimmung für das Inokulum und alle Substrate durch Trocknung bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz.
2. Glühverlust (GV). Dreifach-Bestimmung für das Inokulum und alle Substrate durch Veraschung der getrockneten Probe bei 550°C bis zur Gewichtskonstanz.
3. Organische Trockensubstanz (oTS). Der Anteil an oTS ergibt sich aus der Multiplikation von TS und GV.

2.2 Versuchsaufbau und -dauer

1. Proben. Alle Batchversuche müssen neben dem eigentlichen Ansatz mit Inokulum und Substrate zusätzliche folgende Ansätze enthalten: Einen Ansatz mit ausschließlich Inokulum (Negativkontrolle bzw. "Blank") sowie einen Ansatz mit Inokulum und mikrokristalliner Zellulose als sog. Positivkontrolle ¹.

¹Andere Substrate als Positivkontrolle sind theoretisch ebenfalls möglich [[Koch et al., 2020](#)], allerdings wurden nur für Zellulose umfangreiche Tests durchgeführt, die zur Entwicklung der in Abschnitt 4 beschriebenen Validierungskriterien geführt haben [[Hafner et al., 2020b](#)].

2. Replikate. Jeder der oben beschriebenen Versuchsansätze ist mindestens als Dreifachbestimmung anzusetzen². Die Mindestanzahl der in einem Batchtest mit einem Substrat anzusetzenden Flaschen beträgt daher 9 (3 x Blanks, 3 x Zellulose, 3 x Substrat).
3. Dauer. Der BMP-Test darf erst beendet werden, wenn die tägliche CH₄-Produktion aus den einzelnen Ansätzen während 3 aufeinanderfolgender Tagen weniger als 1% des akkumulierten Nettovolumens an Methan aus dem Substrat (Substratansatz minus Durchschnitt der Blanks) beträgt. Bei händischen oder anderen Messmethoden, bei denen die Messungen nicht jeden Tag durchgeführt werden, kann der Abbruch am Ende des ersten Messintervalls von mindestens 3 Tagen erfolgen, an der die Produktionsrate unter das Abbruchkriterium von 1% fällt (oder zwei oder mehr Intervalle, die sich auf mindestens 3 Tage summieren und alle Raten unter 1% aufweisen). Wenn verschiedene Substrate parallel getestet werden, soll der jeweilige Substratansatz erst dann beendet werden, wenn auch das letzte Replikat das Abbruchkriterium erreicht hat. Blanks dürfen erst beendet werden, wenn alle Flaschen des gesamten Ansatzes (Substrat und Positivkontrolle) das Abbruchkriterium unterschreiten. Die Fortsetzung der Tests über dieses 1%-Abbruchkriterium hinaus ist legitim und kann dazu beitragen, sicherzustellen, dass die in Abschnitt 4 aufgeführten Validierungskriterien erfüllt werden (beispielsweise bezüglich des erforderlichen Bereiches des Biomethanpotentials der Cellulose).

3 Berechnungen

1. Prozessierung der Rohdaten. Das genormte CH₄-Volumen (trocken, 0°C, 101,325 kPa) wird aus den Rohdaten nach standardisierten Methoden berechnet³.
2. Einheit. Das Biomethanpotential wird als genormtes CH₄-Volumen (trocken, 0°C, 101,325 kPa; häufig als "Normvolumen" bezeichnet) bezogen auf die Masse an zugegebener organischer Trockensubstanz (oTS) mit der Einheit NmL_{CH₄} g_{oTS}⁻¹ angegeben. Insbesondere bei eher flüssigen Substraten wird mitunter auch der chemische Sauerstoffbedarf (CSB) als Bezugsgröße gewählt (NmL_{CH₄} g_{COD}⁻¹).

²Kommt es während des Versuches zum Verlust einer Flasche, beispielsweise durch Beschädigung, sodass für einen der Ansätze nur noch 2 Flaschen für die Auswertung zur Verfügung stehen, kann der gesamte Versuch nicht validiert werden (vgl. Abschnitt 4). Daher ist es ratsam, besser 4 (oder mehr) Replikate anzusetzen, insbesondere bei den Blanks. Ausreißer können eliminiert werden, wenn ein begründeter Verdacht auf einen Messfehler besteht (z.B. Undichtigkeit), aber die verbleibende Anzahl von Replikaten für die Auswertung muss mindestens 3 betragen.

³Eine detaillierte Beschreibung der Berechnungen sind für die folgenden Messmethoden in der Sammlung der Standard-Batch-Methoden zu finden (<https://www.dbfz.de/en/BMP>): volumetrisch (Document 201) [Hafner et al., 2020e], manometrisch (Document 202) [Hafner et al., 2020a], gravimetrisch (Document 203) [Hafner et al., 2020f], und mittels Gasdichte (Document 204) [Hafner et al., 2020c].

3. Berechnung des Biomethanpotentials. Das Biomethanpotential aller Substrate (inklusive der Positivkontrolle) errechnet sich durch den Abzug der CH_4 -Produktion der Blanks (im Durchschnitt aller Flaschen) von der CH_4 -Produktion der Substrate mit Inokulum und der Normierung auf die zugeführte Menge an oTS. Mögliche Differenzen in den Einwaagen von Substrat oder Inokulum in den einzelnen Ansätzen müssen bei der Berechnung unbedingt berücksichtigt werden. Die Berechnungen solltem einem standardisierten Ansatz folgen⁴.
4. Berechnung der Standardabweichung. Die gemeinsam mit dem ermittelten durchschnittlichen Biomethanpotential anzugebende Standardabweichung ($n \geq 3$) muss die Varianz sowohl innerhalb des Substratansatzes, als auch die der Blanks berücksichtigen. Zudem sollte die Messunsicherheit bei der Bestimmung des oTS und die der Einwaagemengen ebenfalls Berücksichtigung finden⁵.

4 Validierungskriterien

Nur Versuche, in denen *alle* der folgenden Kriterien erfüllt wurden, gelten als "validiert"⁶. Andernfalls kann der gesamte Versuch nicht validiert werden und muss entsprechend wiederholt werden.

1. Alle erforderlichen Kriterien zur Bestimmung des Biomethanpotentials, wie diese in Abschnitt 2 beschrieben sind, wurden eingehalten (inklusive der notwendigen Dauer des Versuches). Alle Berechnungen erfolgten gemäß der Vorgaben in Abschnitt 3.
2. Das durchschnittliche Biomethanpotential für Cellulose liegt zwischen 340 und 395 $\text{NmL}_{\text{CH}_4} \text{ g}_{\text{oTS}}^{-1}$.
3. Die relative Standardabweichung des Biomethanpotentials (absolute Standardabweichung geteilt durch das mittlere Methanpotential) der Cellulose (inklusive der Varianz der Blanks und der Messungenauigkeit bei der oTS-Bestimmung) ist kleiner als 6%.

References

R. B. Baird, A. D. Eaton, and E. W. Rice. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Water Works Association, 2017. ISBN 978-1-62576-240-5.

⁴Die Berechnung des Biomethanpotential ist ausführlich in Dokument 200 der Standard-Batch-Methoden beschrieben (<https://www.dbfz.de/en/BMP>).

⁵Weiterführende Informationen diesbezüglich in Dokument 200.

⁶Die Validierungskriterien sind auch in Dokument 101 zu finden [Hafner et al., 2020d], in dem diese zentralen Kriterien in übersichtlicher Form zusammengefasst sind.

- EPA. Method 1684 Total, Fixed, and Volatile Solids in Water, Solids, and Biosolids. Technical Report EPA-821-R-01-015, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Office of Science and Technology Engineering and Analysis Division (4303), Washington DC, 2001. URL https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/method_1684_draft_2001.pdf.
- S. D. Hafner, S. Astals, P. Buffiere, N. Løjborg, C. Holliger, K. Koch, and S. Weinrich. Calculation of Methane Production from Manometric Measurements. Standard BMP Methods document 202, version 2.6., 2020a. URL <https://www.dbfz.de/en/BMP>.
- S. D. Hafner, H. Fruteau de Laclos, K. Koch, and C. Holliger. Improving Inter-Laboratory Reproducibility in Measurement of Biochemical Methane Potential (BMP). *Water*, 12(6):1752, June 2020b. doi: 10.3390/w12061752. URL <https://www.mdpi.com/2073-4441/12/6/1752>.
- S. D. Hafner, C. Justesen, R. Thorsen, S. Astals, C. Holliger, K. Koch, and S. Weinrich. Calculation of Methane Production from Gas Density-Based Measurements. Standard BMP Methods document 204, version 1.6., 2020c. URL <https://www.dbfz.de/en/BMP>.
- S. D. Hafner, K. Koch, H. Fruteau de Laclos, and C. Holliger. Validation criteria for measurement of biochemical methane potential (BMP). Standard BMP Methods document 101, version 1.0., 2020d. URL <https://www.dbfz.de/en/BMP>.
- S. D. Hafner, N. Løjborg, S. Astals, C. Holliger, K. Koch, and S. Weinrich. Calculation of Methane Production from Volumetric Measurements. Standard BMP Methods document 201, version 1.9., 2020e. URL <https://www.dbfz.de/en/BMP>.
- S. D. Hafner, B. K. Richards, S. Astals, C. Holliger, K. Koch, and S. Weinrich. Calculation of Methane Production from Gravimetric Measurements. Standard BMP Methods document 203, version 1.1., 2020f. URL <https://www.dbfz.de/en/BMP>.
- C. Holliger, M. Alves, D. Andrade, I. Angelidaki, S. Astals, U. Baier, C. Bougrier, P. Buffière, M. Carballa, V. de Wilde, F. Ebertseder, B. Fernández, E. Ficara, I. Fotidis, J.-C. Frigon, H. Fruteau de Laclos, D. S. M. Ghasimi, G. Hack, M. Hartel, J. Heerenklage, I. Sarvari Horvath, P. Jenicek, K. Koch, J. Krautwald, J. Lizasoain, J. Liu, L. Mosberger, M. Nistor, H. Oechsner, J. V. Oliveira, M. Paterson, A. Pauss, S. Pommier, I. Porqueddu, F. Raposo, T. Ribeiro, F. Rüsch Pfund, S. Strömberg, M. Torrijos, M. van Eekert, J. van Lier, H. Wedwitschka, and I. Wierinck. Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Science and Technology*, 74(11):2515–2522, 2016. doi: 10.2166/wst.2016.336.

- K. Koch, S. D. Hafner, S. Astals, and S. Weinrich. Evaluation of Common Supermarket Products as Positive Controls in Biochemical Methane Potential (BMP) Tests. *Water*, 12(5):1223, May 2020. doi: 10.3390/w12051223. URL <https://www.mdpi.com/2073-4441/12/5/1223>.
- K. Strach. Bestimmung der trockensubstanz und der organischen trockensubstanz. In J. Liebetrau, D. Pfeiffer, and D. Thrän, editors, *Messmethodensammlung Biogas*. DBFZ, Leipzig, Germany, 2016. URL <https://www.dbfz.de/projektseiten/chinares/downloads/>.