



<https://eqrcode.co/a/FJ0drz>

ORIGINAL ARTICLE | ARTÍCULO ORIGINAL

Hohenheim Yield Test (HBT) Methodology for the Determination of Methane Potential in Agricultural Substrates

Metodología HBT (Hohenheim Yield Test) para la determinación del potencial de metano en sustratos agrícolas

Dr.C. Carlos M. Martínez-Hernández¹, Dr.Sc. Hans Oechsner¹¹, Dr. Mathieu Brulé¹¹, Ing. Raúl Ernesto Torres-Fuentes¹

¹ Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

¹¹ University of Hohenheim, State Institute of Agriculture Engineering and Bioenergy, Germany.

ABSTRACT. The work presents the HBT methodology, created and used in the University of Hohenheim, Germany for the analysis and valuation of methane potential of agricultural substrates with the objective of using them as raw material in different biogas plants in production in that country. This methodology is simple and can be extrapolated to any investigation or development institution that is in charge of analyzing methane potentiality of different agricultural substrates. For its importance and applicability, the fundamental steps of this methodology are described, which could be introduced in Cuban universities or investigation institutions devoted to this activity, being the objective of this work to make it known in Cuba. By means of this methodology, it is possible to value a great number of trials of investigation saving material, human and financial resources, simultaneously. At the same time, the results reached with this methodology are transferable to productive scale, since they are supported by the existent regulatory schemes in this field.

Keywords: HBT methodology, agricultural substrates, biodigestion, biogas.

RESUMEN: El trabajo presenta la metodología HBT, creada y de amplia utilización en la Universidad de Hohenheim, Alemania para el análisis y valoración del potencial de metano de sustratos agrícolas con el objetivo de ser utilizadas como materia prima en las diferentes plantas de biogás en producción en ese país. Esta metodología es sencilla y puede ser extrapolable a cualquier institución de investigación o desarrollo que se ocupe del análisis de la potencialidad de producción de metano de diferentes sustratos agrícolas. Por su importancia y aplicabilidad se describen los pasos fundamentales de esta metodología, la cual pudiera ser introducida en nuestras Universidades o Instituciones de investigación que se dedique a esta actividad, siendo el objetivo de este trabajo dar a conocer la misma en nuestro país. Mediante esta metodología es posible valorar simultáneamente un gran número de ensayos de investigación ahorrando recursos materiales, humanos y dinero. Al mismo tiempo, los resultados alcanzados con esta metodología son transferibles a escala productiva, ya que están apoyadas en las normativas existentes en este campo.

Palabras clave: HBT metodología, sustratos agrícolas, biodigestión, biogás.

INTRODUCTION

At the present time numerous countries look for solving their energy problems with the use of renewable energy sources. Cuba does not escape to this problem and in the

INTRODUCCIÓN

En la actualidad numerosos países buscan resolver sus problemas energéticos con la utilización de las fuentes renovables de energía. Cuba no escapa a esta problemática y en

¹ Author for correspondence: Carlos M. Martínez-Hernández, e-mail: carlosmh@uclv.edu.cu

Received: 12/02/2020.

Approved: 01/03/2021.

last years the country has carried out an enormous effort to revert its energy matrix, which depends in more than 70% of the electric power production starting from the generation in plants of great size denominated “thermoelectric” and to smaller scale in the calls “power unit”. In both, the electricity generation is supported on the base of the consumption of fossil fuel (gasoil and petroleum).

For such a reason, in the Plan of National Development up to 2030, it is foreseen that the country generates around 30% of electricity it consumes, using renewable sources of energy (solar panels, photovoltaic panels, wind power, mini hydraulic power and biogas). In this context, Cuban Universities, as well as several investigation national centers, are projected to the study and investigation of these renewable sources and their optimization.

Therefore, this work has as **objective** to present the HBT methodology used in Germany to study and value the methane potential of different agricultural substrates in order to transfer the best investigative results obtained toward the production. The HBT methodology presented could be analyzed as a road for its introduction in Cuban biogas laboratories or in biogas laboratories located in the same geographical area.

MATERIALS AND METHODS

Anaerobic Digestion Test. Objectives of the Test

Anaerobic digestion assays were conducted under laboratory conditions using the HBT process (Hohenheim Biogas-yield Test), which is a batch (discontinuous) process. The substrate was digested under mesophilic conditions at constant temperature (37°C) and the retention time was 35 days. Continuous mixing was applied to the digesters.

The aim of developing the HBT was to simplify the assessment of methane potential of a substrate and to run a great number of digesters simultaneously. Further objectives were to reduce the lab tests required as well as the supervision during the tests. The objective of the new procedure was to set it up in such a way that it could be carried out with ordinary commercial laboratory equipment (Shumi, 2008).

Standard Methodology

The BMP-assays were performed according to the German standard VDI 4630 (2006) “Fermentation of organic materials”, developed specifically to assess the methane production during anaerobic digestion. Also International standards currently in force, such as DIN 38424-8 for sewage sludge, ASTM and ISO 14853, were considered. However, the latter standards were developed mainly for the purpose of toxicity tests, not methane yield determination. Moreover, they involve complex methodologies, such as the addition of a wide range of nutrients and micronutrients to sustain anaerobic digestion process, and are not easily practicable (Müller, 2004).

los últimos años el país ha realizado un enorme esfuerzo por revertir su matriz energética, la cual depende en más del 70% de la producción de energía eléctrica a partir de la generación en plantas de gran tamaño denominadas “termoeléctricas” y a menor escala en los llamados “grupos electrógenos”. En ambos, la generación de electricidad se soporta sobre la base del consumo de combustible fósil (gasoil y petróleo).

Por tal motivo, en el plan de desarrollo del país hasta el 2030, se tiene previsto ser capaz de generar alrededor de un 30% de electricidad utilizando fuentes renovables de energía (paneles solares, paneles fotovoltaicos, aerogeneradores, mini hidráulicas y biogás). En este contexto, las Universidades Cubanas; así como varios centros de investigación del país se proyectan al estudio e investigación de estas fuentes renovables y su optimización.

Es por ello, que este trabajo tiene como **objetivo** presentar una metodología utilizada en Alemania para estudiar y valorar el potencial de metano de diferentes sustratos agrícolas con el objeto de transferir hacia la producción los mejores resultados investigativos obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayo de digestión anaeróbico. Objetivo del ensayo

Este ensayo conducido bajo las condiciones de uso del equipo denominado HBT (Hohenheim Biogas Test), tiene como objetivo analizar procesos batch discontinuos. Los sustratos son digeridos bajo condiciones mesofílica a temperatura constante de 37° C y tiempos de retención hidráulico de 35 días. Aquí se prueban diferentes sustratos mezclados en los respectivos digestores.

El objetivo principal del equipo HBT ha sido simplificar el análisis del potencial de metano de diferentes sustratos y correr un gran número de procesos de digestión anaeróbica de forma simultánea. También este equipamiento (HBT) permite reducir las labores en el laboratorio, así como supervisar la cantidad de pruebas a ejecutar en los sustratos objeto de valoración. Este nuevo método tiene también dentro de sus objetivos utilizar equipamiento comercial de laboratorio disponible en la actualidad (Shumi, 2008).

Metodología estándar

El ensayo del potencial de metano del biogás (BMP) ha sido establecido de acuerdo con la norma alemana VDI 4630 (2006), “fermentación de materiales orgánicos” desarrollada específicamente para ensayos de producción de metano durante la digestión anaeróbica. Normas internacionales existentes tales como: DIN38424-8 y ASTM and ISO 14853, para excretas de origen animal. Sin embargo, estas han sido desarrolladas principalmente para determinar pruebas de toxicidad y no rendimiento de metano. Por otra parte, debido al gran número de nutrientes y micronutrientes involucrados en el proceso de digestión anaeróbica estas normas no son fácilmente aplicables (Müller W-R, 2004).

Las más importantes recomendaciones de acuerdo con la norma alemana VDI 4630 (2006), están relacionadas con la relación que debe existir entre el peso de los sólidos volátiles del sustrato a analizar con respecto al peso de los sólidos volátiles del inóculo a utilizar, la cual debe fijarse por debajo

The most important recommendations according to VDI 4630 (VDI 4630, 2006) standard, are that the ratio of weight of substrate VS to weight of inoculum VS has to be set below 0.5 to ensure a stable anaerobic digestion, and the ratio of substrate gas production to the total gas production should be above 0.8.

Necessary equipment

The HBT system allows the investigation of up to 130 single samples at once. The HBT assay is derived from the “Hohenheim Feed value Test” (HFT) developed in Germany (1986) for evaluating the nutritive value of cattle feed with rumen fluid as an inoculum. Its adaptation for biogas applications has been described by Helffrich and Oechsner (Helffrich and Oechsner, 2003) and patented (Helffrich *et al.*, 2005).

Each prepared mixture (substrate + inoculum) is brought into a syringe of 100 mL capacity with a single rubber pipe and a fastening clip upon it as a gas outlet (Figures 1 and 2). The gas that accumulates inside is purged by pressing the plunger of the syringe, once the clip that presses the hose at the top of the syringe has been released. This process is carried out as long as a gas production greater than or equal to 20 mL is achieved in 24 hours. Between the plunger of the syringe and its body, a greasy silicone paste is placed that prevents a gas leak from occurring between these two elements (Barbos, 2006).

The syringes are then placed horizontally into a rotating support, which is itself placed in an incubator (Figures 1 and 2), where mesophilic temperature condition (37°C) is maintained. The continuous rotation of the support ensures the thorough mixing of the substrate (Eyler and Brulé, 2010).

The gas produced remains inside the syringe and pushes the plunger away. The gas volume as well as its methane content should be measured each time it exceeds 20 mL. The gas can be measured until its amount reaches 70 mL. This provides a safety interval because some substrates are producing gas at a faster rate than others and because there are always risks of delaying gas measurements. A laser alarm system warns the research staff when the gas volume exceeds 70 mL (Brulé, 2005).

The electronic methane sensor (Figure 8 C) is equipped with a phosphorus pentoxide filter in order to remove water vapor contained in the gas. This water has a corrosive effect in combination with hydrogen sulphide (H₂S) when it condenses on metallic parts. H₂S gives up sulphuric acid (H₂SO₄), and the acid aqueous phase produces a corroding effect. The phosphorus pentoxide product (SICAPENT®) has a color indicator which changes color when the salt becomes saturated with water (Brulé, 2005).

During the total fermentation period of 35 days, the gas volume produced from crop substrates is usually measured 10 to 20 times. The pre-digested inoculum is measured only twice because of its very low gas production (Brulé, 2005).

Figure 1 presents some particulars of the group of devices and equipment used in the methodology HBT.

de 0,5 para asegurar la estabilidad de la digestión anaeróbica, asegurando que la relación entre la producción de biogás del sustrato con respecto a la producción total de biogás deba estar por encima de 0,8.

Equipamiento necesario

El sistema HBT, permite la investigación con 130 jeringas simultáneamente, este sistema es una mejora del Sistema de alimentación y valoración Hohenheim (HFT), desarrollado por Steingass and Menke (1986) citado por Helffrich & Oechsner (2003), para la evaluación cuantitativa de los fluidos (líquidos) del rumen de vacunos como inóculos. La utilización de este inóculo para aplicaciones en biogás ha sido descrita por Helffrich and Oechsner (Helffrich and Oechsner, 2003) y patentado por (Helffrich *et al.*, 2005).

Cada mezcla preparada (sustrato + inóculo) es colocado en el interior de una jeringa de 100 mL de capacidad, la misma presenta una manguera con una presilla en su extremo que impide la salida del gas que se va acumulando en su interior (Fig.1) y (Fig.2). El gas que se acumula en su interior es purgado oprimiendo el embolo de la jeringa, una vez liberado la presilla que oprime la manguera en la parte superior de la jeringa. Este proceso se efectúa siempre y cuando se alcance una producción de gas mayor o igual a 20 mL en 24 horas. Entre el embolo de la jeringa y su cuerpo, se coloca una pasta grasosa de silicona que impide que entre estos dos elementos ocurra una fuga de gas (Barbos, 2006).

Las jeringas son colocadas horizontalmente en un soporte giratorio el cual es introducido en una incubadora (Fig. 1) y (Fig. 2), donde las condiciones mesofílica son mantenidas (37°C). La continua rotación del soporte garantiza la mezcla de los sustratos en el interior de las jeringas. (Eyler and Brulé, 2010).

El volumen de gas, así como el contenido de metano de este; puede ser medido una vez se iguale o sobrepase la producción de 20 mL por día. Producto de la no homogeneidad de la producción de gas entre diferentes sustratos objeto de valoración, medidas de seguridad han sido tomadas para evitar el derrame del sustrato y su consecuente pérdida de gas. Una alarma laser está colocada en este aparato (HBT) para avisar al equipo de investigación cuando alguna jeringa del set de investigación este alcanzando un volumen de producción igual 70 mL (Brulé, 2005).

Un detector electrónico de metano (Figure 2C), equipado con un filtro de fósforo pentóxido para remover vapor de agua contenido en el biogás. Evita que trazas de vapor de agua se introduzcan en el detecto, provocando un efecto corrosivo en combinación con el sulfuro de hidrogeno (H₂S) presente en el biogás cuando este se condensa en las partes metálicas del detector. El sulfuro de hidrógeno (H₂S) derivado del ácido sulfúrico (H₂SO₄) y the la fase ácida líquida produce un efecto corrosivo. El fósforo pentóxido producido por (SICAPENT®) posee un indicador de color, el cual cambia cuando se satura la sal con agua (Brulé, 2005).

Durante el período de fermentación de los sustratos (35 días), el volumen de gas producido por los diferentes sustratos agrícolas objeto de valoración son medidos entre 10 y 20 veces. El inóculo pre-digerido solamente dos veces debido a su baja producción de biogás (Brulé, 2005).

La Figura 1, presenta algunos detalles del conjunto de dispositivos y equipamiento utilizado en la metodología HBT.

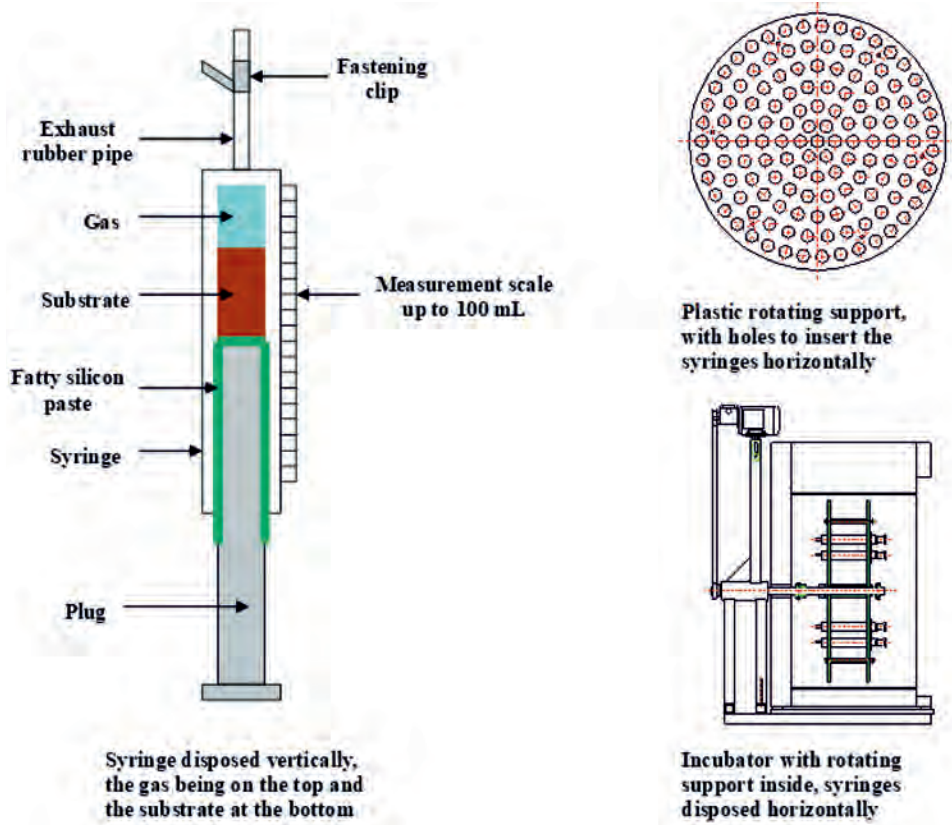


FIGURE 1. Schemas of the syringe, the rotating support and the incubator (Barbos, 2006).
 FIGURA 1. Esquema de la jeringa, el mecanismo de rotación y la incubadora (Barbos, 2006).

Other particulars of the system HBT is shown in Figure 2.

Otros detalles del sistema HBT se muestran en la Figura 2.

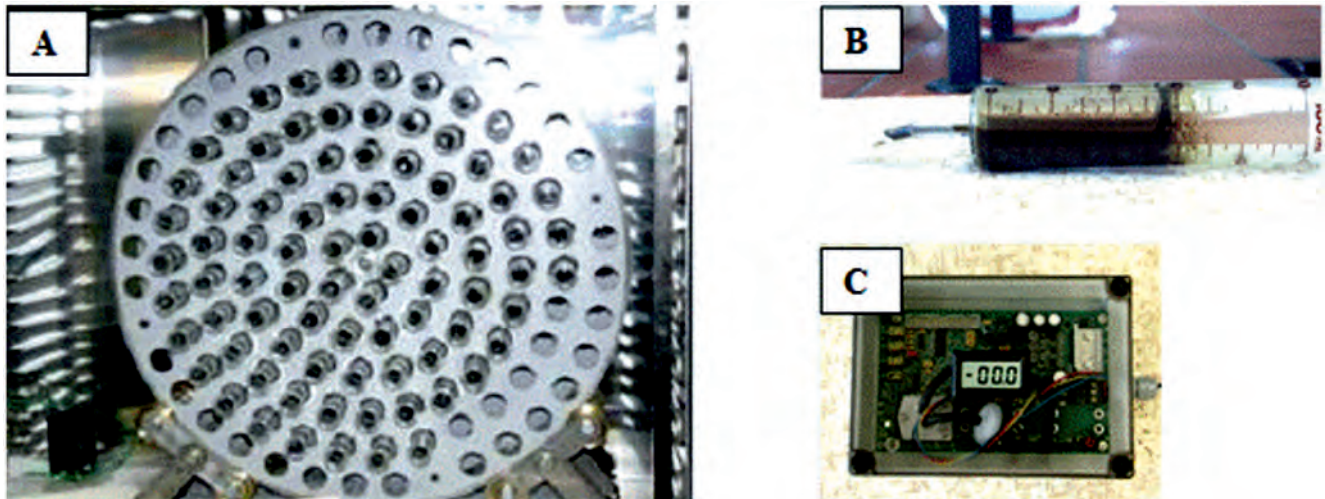


FIGURE 2. A. Incubator with rotating unit bearing syringes. B. Syringe containing biogas and substrate. C. Methane measurement device (Shumi, 2008).
 FIGURA 2. A. Incubadora con su unidad de rotación y las respectivas jeringas colocadas. B. Jeringas con los sustratos y su producción de biogás objeto de valoración. C. Detector electrónico de metano (Shumi, 2008).

Substrate Preparation and Feeding

As recommended by VDI 4630 standard, the particle size of the substrate has to be smaller than 10 mm. The substrates used for the tests were chopped at harvest, and passed through a laboratory mixer prior to the test.

Preparación de los sustratos y alimentación

Como recomendación de la norma VDI 4630, el tamaño de las partículas de los sustratos debe ser inferior a 10 mm. Los sustratos utilizados para estos ensayos deben ser cosechados y triturados en el laboratorio anterior a su utilización.

Four combinations involving each two different energy crops were chosen to be investigated in different mixture ratios using the HBT process (Table 1). In all the cases the duration of the process was 35 days.

Cuatro combinaciones que involucran cada una de estas a dos diferentes sustratos de cultivos energéticos, fueron escogidas para investigar diferentes relaciones utilizadas en la metodología HBT (Tabla 1). En todos los casos la duración del proceso es igual a 35 días.

TABLE 1. Experimental design of anaerobic digestion tests
TABLA 1. Diseño experimental del ensayo de digestión anaeróbica

First crop	Second crop	Mixture ratios
Perennial ryegrass	Cup plant	100/0 – 75/25 – 50/50 – 25/75 – [0/100]
Corn	Amaranth	100/0 – 75/25 – 50/50 – 25/75 – 0/100
Corn	Triticale	100/0 – 75/25 – 50/50 – 25/75 – 0/100
Corn	Perennial ryegrass	100/0 – 75/25 – 50/50 – 25/75 – 0/100

Mixture ratio in parenthesis [] could not be tested.

Table 2. Shows some examples of mixture ratios and the substrate weights used for the anaerobic digestion test.

La Tabla 2 muestra algunos ejemplos de proporciones de la mezcla y los pesos de los sustratos usados para el ensayo de la digestión anaerobia.

TABLE 2. Examples of substrate mixtures and substrate weights used in the tests
TABLA 2. Ejemplos de mezclas del sustrato y pesos de los sustratos utilizados en el ensayo

Substrate	Mixture ratio	Number of replicates	Weight of substrate 1 (g)	Weight of substrate 2 (g)
Perennial ryegrass /Cup plant	75/25	4	2,42	0,45
Corn/Amaranth	50/50	5	0,6	1,48
Corn /Triticale	25/25	5	0,3	0,93

Inoculum Preparation and Feeding

The standard inoculum of the University of Hohenheim was used for the trials. The inoculum was produced at the University in a laboratory reactor. It was fed daily with a mixture of predigested dairy manure, maize silage, cereals, rapeseed oil and soybean extract. Predigested manure was taken from an on-farm biogas plant. The C: N ratio of the feed mixture was 27:1 and the organic loading rate of the reactor was 0.5 kg VS/m³/day. This particular procedure was aimed at developing an adapted bacterial population while ensuring a sufficiently low biogas production from the inoculum. Prior to use in HBT-digesters, the inoculum was passed through a 1 mm sieve and coarse material was removed (Brulé, 2005).

In the experiment, 30 g of inoculum were added into each digester, together with the substrate. The role of the inoculum was to provide bacteria, a liquid medium and a buffer effect from carbonates/bicarbonates and ammonia, all of them being necessary for a balanced process.

Control Variants

Control variants were run as specified in VDI 4630 standard VDI 4630 (2006). Other 3 digesters were fed with inoculum only to measure its methane production (control variant). In other 3 digesters inoculum was brought together with one substrate of defined composition and known methane production (substrate standard), in order to check the repeatability of the assay. Here microcrystalline cellulose (250 mg) was used as a substrate standard (AVICEL, MERCK).

Preparación de inóculo y su alimentación

El inóculo para los ensayos se preparó en la Universidad de Hohenheim. El inóculo se produjo en un reactor del laboratorio de dicha Universidad, este se alimentó periódicamente con una mezcla de estiércol vacuno pre digerido, forraje conservado en silo de maíz, cereales, aceite de semilla de rape y extracto de soya. Se tomó el estiércol vacuno pre digerido de una planta de biogas. La proporción de carbono-nitrógeno (C: N) de la mezcla fue (27:1) y la proporción de carga orgánica del reactor fue 0.5 kg VS/m³/día. Este procedimiento particular tiende a desarrollar una población bacteriana adaptada asegurando una producción de biogás suficientemente baja del inóculo. Anterior a su colocación en el digester-HBT, el inóculo se pasó a través de un tamiz de 1 mm y el material basto fue removido (Brulé, 2005).

En el experimento 30 g de inóculo fue agregado en cada digester, junto con el sustrato. El papel del inóculo fue proporcionar bacterias, un medio líquido y un efecto buffer de los carbonatos/bicarbonatos y amoníaco, todos ellos necesarios para un proceso equilibrado.

Variantes de control

Las variantes de control corrieron según lo especificado en la norma alemana VDI 4630 (2006), en otros tres digestores el inóculo se colocó junto con un sustrato de composición y producción del metano conocida (sustrato estándar) para verificar la reproductibilidad del ensayo. Para eso se utilizó celulosa microcrystalline (250 mg) como un sustrato normal (AVICEL, MERCK).

Each substrate variant was fed in 3 to 5 digesters, which was considered sufficient to obtain accurate data of the specific methane yield.

Gas Measurement

According to VDI 4630 (2006) standard, the pressure of the generated gas has to be as low as possible so as to minimize gas losses. This recommendation for gas measurement goes against the mainstream of using pressure bottles and pressure transducers (Angelidaki and Sanders, 2004) and favors the use of low pressure systems, such as the eudiometer equipment. Pressure transducers may suffer interferences from temperature variations (Rozzi and Remigi, 2004). The HBT process may be considered as a low-pressure system, since the fluid characteristics of the silicone sealing applied allows an equilibrium at room temperature and normal pressure conditions (Brulé, 2010).

In order to perform a gas measurement, the operator first reads the gas volume on the scale of the syringe. Then, the operator places the syringe vertically, the gas being on the top and the substrate remaining on the bottom. After connecting the exhaust rubber pipe of the syringe to an electronic methane sensor, the operator opens the fastening clip of the rubber pipe to let the gas out and pushes the plunger upwards, letting the gas pass into the electronic device. The value of the methane content provided by the device and the remaining volume of the substrate in the digester are noted down. For each gas measurement, the date, time, exact temperature of the incubator and room air pressure are also recorded in order to calculate the gas production under normal conditions (i.e. at 0°C and 1013.25 hPa) (Brulé, 2005).

Duration of the Experiment

The experiments lasted about 35 days. This duration was applied as a final point, but it does not necessarily imply that the maximal biogas yield can be reached to the end of the experiment. According to VDI 4630 (2006) standard, the experiments can be terminated when the daily biogas production drops below 1% of the total cumulated biogas production. In this study, it was determined that applying the standard assay duration of 35 days allowed fulfilling this criterion.

Calculation of Biogas Yield

According to VDI 4630 (2006) standard, the formula to calculate the volume of dry biogas (corrected from the water vapor) to normal conditions (temperature of 0°C, pressure of 1013, 25 hPa) is as follows:

$$V_N = \frac{V_R \cdot (P - P_w) \cdot T_O}{T_R \cdot T_O}$$

Where:

V_N - Volume of the dry gas to normalized conditions (L)

Cada variante del sustrato se colocó en 3 a 5 digestores (jeringas) que fueron considerados suficientes para obtener datos exactos del rendimiento de metano específico.

Medida de gas

Según la norma VDI 4630 (2006), la presión del gas generado tiene que ser tan bajo como posible para minimizar las pérdidas de gas. Esta recomendación para la medida de gas va contra la corriente principal de usar botellas de acero a presión y transductores de presión según Angelidaki & Lijadoras (2004) y favorece el uso de sistemas de presión bajos, como el equipo eudiómetro. Los transductores de presión pueden sufrir las interferencias de las variaciones de temperatura (Rozzi & Remigi, 2004). El proceso de HBT puede ser considerado como un sistema de baja presión, desde las características fluidas de la pasta de silicona que permite sellar y mantener un equilibrio en condiciones de temperatura y presión normal (Brulé, 2010).

Para realizar una medida de gas, el operador lee el volumen de gas primero en la escala de la jeringa. Entonces, el operador pone la jeringa verticalmente, el gas permanece en la cima y el sustrato permanece en el fondo. Posteriormente se conecta la tubería de caucho de descarga de la jeringa a un sensor de metano electrónico, el operador abre la grapa de la atadura de la tubería de caucho para permitir la salida del gas a continuación oprime el embolo de la jeringa, permitiendo que el gas pase al dispositivo de medida electrónico. Se apunta el valor del volumen del metano proporcionado por el dispositivo, y el volumen restante del sustrato en el digester. Para cada medida de gas, la fecha, el tiempo, la temperatura exacta de la incubadora y la presión atmosférica del laboratorio también se graba para calcular la producción de gas bajo las condiciones normales (es decir a los 0°C y 1013.25 hPa) (Brulé, 2005).

Duración del experimento

Los experimentos se planificaron para una duración de 35 días. Esta duración fue aplicada como un punto terminal, pero necesariamente implica que el rendimiento del biogás máximo pueda alcanzarse al final de este período. Según VDI 4630 (2006), los experimentos pueden terminarse cuando la producción del biogás diaria caiga por debajo de 1% de la producción de biogás del acumulado total. Se asume que aplicando la duración del ensayo de 35 días, esto permita cumplir este criterio.

Cálculo del rendimiento del biogás

De acuerdo con la norma VDI 4630 (2006), la ecuación 1 se utiliza para calcular el volumen de biogás seco (corregido del vapor de agua) a las condiciones normales (temperatura de 0°C, presión de 1013, 25 hPa), quedando la expresión 1 como:

$$V_N = \frac{V_R \cdot (P - P_w) \cdot T_O}{T_R \cdot T_O}$$

Donde:

V_N - Volumen seco de gas en condiciones normalizadas (L)

V_R - Valor de lectura del volumen de biogás (L)

P - Presión del gas en el momento de la lectura (hPa)

P_w - Presión de vapor de agua en biogás (hPa)

V_R - Read-off value of the biogas volume (L)
 P - Pressure of the gas at the time of the reading (hPa)
 P_w - Water vapor pressure in biogas (hPa)
 T_0 - Normal temperature (273 K)
 P_0 - Normal pressure (1013, 25 hPa)
 T_R - Temperature of biogas (K)

The water vapor pressure in biogas was estimated to be 58 hPa at 35°C.

Anaerobic Digestion Test

The methane yield of a mixture was calculated according to several input variables, which should be defined for each energy crop: specific methane yield, volatile solids content and dry mass yield per hectare obtained from the field. Then, knowing the weight ratios of each plant in the mixture, the Excel tool can be used to evaluate the methane yield of the chosen mixture.

The values for the specific methane yields given in the literature vary widely depending on the references. For this reason, mixtures and single crops alone were investigated by means of a laboratory test, in order to validate the values for the specific methane yields.

RESULTS AND DISCUSSION

The results reached in a certain experiment performed in the laboratory of Biogas of the University of Hohenheim are presented like an example. These preliminary results are shown in Figure 3. The curves represent specific methane yields for the different ratios of the mixture maize / perennial ryegrass. The methane production increased over the time, but after only 18 days of experiment no conclusion can be drawn about the final yield. Only the final methane yields which were reached after 35 days of experiment could be used as input variables for the model.

Anaerobic digestion assays carried out in the laboratory should provide the best conditions for the biogas process in order to obtain the highest reachable methane yield. Since the conditions for the biological process were optimized, the assay cannot account for synergetic or inhibitory effects which are common in full-scale biogas plants, especially, fiber content and C: N ratios which are output parameters in the model do not play any role in the anaerobic digestion assay. The high amount of inoculum used should buffer against high fibre contents as well as nutrient unbalance.

Therefore, contrary to practice, no synergetic or antagonistic effect is expected: maximal methane yields should be reached in any case, regardless mixture C: N ratio and fiber contents. The investigation of substrate mixtures will serve to confirm this hypothesis. Current results suggest that there is no inhibition associated to a particular mixture: all curves for the mixtures are similar. Surprisingly, the energy crops alone, Corn (Maize) 100% and Perennial ryegrass 100%, show different patterns as compared to the mixtures. These results are very surprising and the experimental protocols should be checked carefully.

T_0 - Temperatura normal (273 K)
 P_0 - Presión normal (1013, 25 hPa)
 T_R - Temperatura del biogás (K)

La presión del vapor de agua en biogás fue estimada en 58 hPa a 35°C.

Ensayo de digestión anaerobia:

El rendimiento del metano de una mezcla fue calculado según algunas variables que deben definirse para cada cosecha de energía: el rendimiento del metano específico, los sólidos volátiles, el rendimiento de masa fresca y seca por hectárea obtenida del campo. Entonces, sabiendo las proporciones de peso de cada planta en la mezcla, la herramienta Excel puede evaluar el rendimiento del metano de la mezcla escogida.

Los valores para los rendimientos de metano específicos dados en la literatura varían ampliamente, dependiendo de las referencias. Por esta razón, en los laboratorios se investigan mezclas y cultivos sin mezclar por medio de un ensayo del laboratorio para validar los valores de los rendimientos del metano específicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A modo de ejemplo se presenta los resultados alcanzados en un determinado experimento efectuado en el laboratorio de Biogás de la Universidad de Hohenheim. Estos resultados preliminares se muestran en la Figura 3. Las curvas representan el rendimiento específico de metano para las diferentes proporciones de mezcla maíz/ryegrass perenne. La producción de metano aumenta durante el tiempo, pero después de sólo 18 días de experimento ninguna conclusión puede tomarse sobre el rendimiento final. Sólo el rendimiento específico final de metano que se alcanza después de 35 días de experimento podría usarse como variable de entrada para el modelo.

Los ensayos de la digestión anaerobia llevados a cabo en el laboratorio deben mantener las condiciones óptimas del proceso del biogás para obtener el rendimiento de metano más alto alcanzable. Desde las condiciones para el proceso biológico se perfecciona, el ensayo no puede responder de sinergias o efectos inhibitorios que son comunes en las plantas del biogás a gran escala. Específicamente contenido de fibra y proporción de C: N no adecuadas, que juegan un papel inadecuado en la obtención del rendimiento específico de metano en el modelo utilizado en el ensayo de la digestión anaerobia. Una gran cantidad de inóculo usado puede actuar como un buffer contra los volúmenes ricos en fibra; así como incidir en un desequilibrio de nutrientes.

Por consiguiente, contrariamente a la práctica, ninguna sinergia o efecto antagónico se espera: deben alcanzarse los rendimientos de metano máximos, en cualquier caso, sin tener en cuenta la proporción de C: N de la mezcla y volúmenes de fibra. La investigación de mezclas del sustrato servirá para confirmar esta hipótesis. Los resultados actuales sugieren que no existe ninguna inhibición asociada a una mezcla particular: todas las curvas para las mezclas son similares. Sorprendentemente, los cultivos energéticos de Maíz 100% y ryegrass Perennes 100% muestran modelos diferentes comparado a las mezclas. Estos resultados son muy sorprendentes y los protocolos experimentales deben verificarse cuidadosamente.

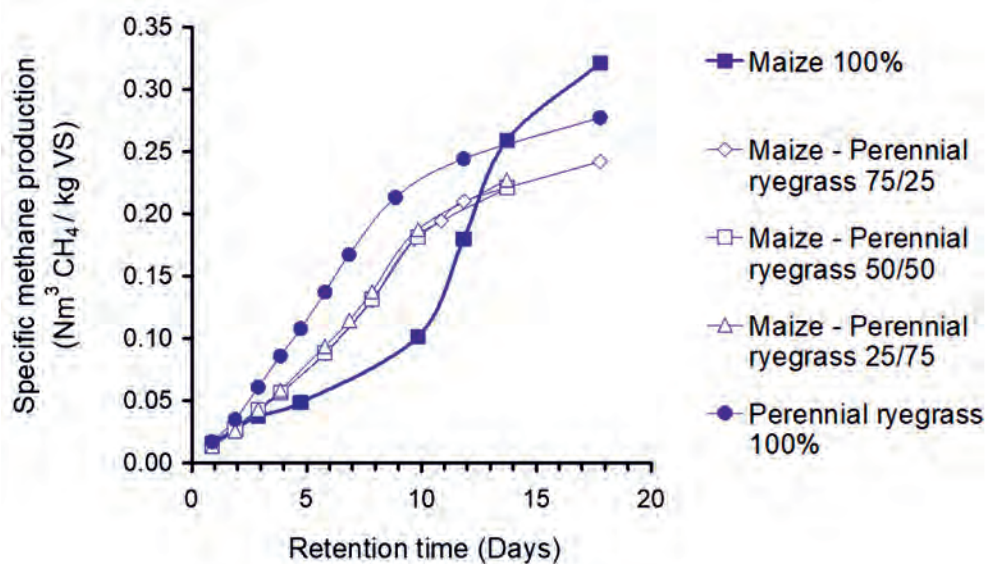


FIGURE 3. Curves of the specific methane yield of maize / perennial ryegrass. Search: Biogas lab. Hohenheim University.

FIGURA 3. Rendimiento específico de metano en mezclas de sustratos evaluados. Fuente: Laboratorio de Biogás. Universidad de Hohenheim.

In the case of Cuba, this methodology is not very well-known and there are references on the use of this type of methodology only in the works reported by Martínez & García (2016); Martínez *et al.* (2017) & Martínez *et al.* (2020), however, it would be profitable to disseminate its use in the country, due to the saving of time, materials and financial resources in the valuation of the methane potential of different agricultural substrates that can be used as raw material for the methane production. On the other hand, the transferability of the results achieved to laboratory scale to real scale has been demonstrated in Germany, where more than 40 laboratories exist and use this methodology) (Oechsner *et al.*, 2020).

CONCLUSIONS

- The work shows a simple and reliable methodology used to laboratory scale with its proven transferability to real scale for the valuation of different agricultural substrates that can be used as raw material for the obtaining the methane potential from substrates of agricultural or animal origin. Its analysis and valuation are suggested for its possible introduction in the Cuban biogas lab.

GRATEFULNESS

Thanks to the University of Hohenheim for supporting the existent collaboration between Universities of reference.

En el caso de Cuba esta metodología es poco conocida y solo se tiene referencias del empleo de este tipo de metodología en los trabajos reportados por Martínez & García (2016); Martínez *et al.* (2017) & Martínez *et al.* (2020), sin embargo, sería provechoso diseminar su utilización en el país, motivado por el ahorro de tiempo, materiales y recursos financieros en la valoración del potencial de metano de diferentes sustratos agrícolas que pueden ser utilizados como materia prima para la obtención de metano.

Por otra parte, la transferibilidad de los resultados logrados a escala de laboratorio a escala real ha sido demostrada en Alemania, donde existen más 40 laboratorios que utilizan esta metodología (Oechsner *et al.*, 2020).

CONCLUSIONES

- El trabajo muestra una metodología sencilla, fiable y utilizada a escala de laboratorio con su probada transferibilidad a escala real para la valoración de diferentes sustratos agrícolas que pueden ser utilizados como materia prima para la obtención del potencial de metano de diferentes sustratos de origen agrícola o animal.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Hohenheim por apoyar la colaboración existente entre nuestras universidades.

REFERENCES

- ANGELIDAKI, S.; LIJADORAS, S.: "Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants", *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 3: 117-129, 2004.
- BARBOS, R.: *Biogas yield potential of different fractions of Sunflower*, Hohenheim University, Master thesis, Stuttgart, Germany, 2006.
- BRULÉ M.: *Evaluation of the methane potential of Maize Silage and Winter Wheat Corn, as single substrates and in mixtures, Training period report*, University of Hohenheim, State institute for Agricultural Machinery and farm structures, Stuttgart, 2005.
- BRULÉ M.: *The effect of enzyme additives on the anaerobic digestion of energy crops*. PhD Thesis. University of Hohenheim, 180 p., Germany, 2014.
- EYLER D., BRULÉ M.: *Batch anaerobic digestion assay for food waste and paper and card as well as their mixtures*, Draft report, EIFER Institute, Karlsruhe, Germany, 2010.
- HELFFRICH D., OECHSNER H.: Hohenheimer Biogasertragstest-Vergleich verschiedener Labverfahren zur Vergärung von Biomasse. *Agrartechnische Forschung* 9:27-3, 2003.
- HELFFRICH D., M. MORAR, A. LEMMER, H. OECHSNER, STEINGASS H.: Patent Nr. DE10227685B4. 30/06/2005. *Laborverfahren zur Bestimmung der Qualität und Quantität des beim anaeroben Abbau organischer Substanzen entstehenden Biogases im Batch-Verfahren*, 2005.
- MARTÍNEZ C; GARCÍA Y.: Utilización de pre-tratamientos básicos y específicos para la producción de biogás. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 25(3): 81-92, 2016. ISSN-1010-2760, e-ISSN: 2071-0054.
- MARTÍNEZ C; OECHSNER H; GARCÍA Y; LÓPEZ L.: Estudio de pre-tratamientos con enzimas en biomásas destinadas a la producción de biogás. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 26(2): 55-64, 2017. ISSN -1010-2760, e-ISSN: 2071-0054,
- MARTÍNEZ C; OECHSNER H; REINHARD A; GARCÍA Y; MARTÍNEZ A.: Estudio del potencial de obtención de metano en tres pastos vacunos pre-tratados con enzimas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 29(1): 73-81), 2020. ISSN-1010-2760, e-ISSN: 2071-0054,
- MÜLLER W-R F.I., JÖRG R.: Standardized methods for anaerobic biodegradability testing. *Environmental Science and Biotechnology* 3:141-158, 2004.
- OECHSNER H; HUELSEMANN B; MARTÍNEZ C.: Transferibilidad de resultados a escala de laboratorio a plantas de biogás a escala real, *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 29(2): 93-103), 2020, ISSN -1010-2760, e-ISSN: 2071-0054.
- ROZZI A., REMIGI E.: Methods of assessing microbial activity and inhibition under anaerobic conditions: a literature review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 3:93-115, 2004.
- SHUMI A.M.: *Inhibiting effects of cleaning agents on the biogas process*, Master thesis, Department Livestock system engineering and farm structures, University of Hohenheim, Stuttgart, 2008.
- VDI 4630. 2006. *Fermentation of organic materials*. VDI-Gesellschaft Energietechnik, Düsseldorf, ICS 13.030.30; 27.190, 2006.

Carlos M. Martínez-Hernández, Prof. Titular. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuani km.5.5. CP: 54830. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. Tel: 53-42-281692. Fax: 53-42-281608. e-mail: carlosmh@uclv.edu.cu ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1853-1195>

Hans Oechsner, Professor, University of Hohenheim. State Institute of Agriculture Engineering and Bioenergy. German, e-mail: hans.oechsner@uni-hohenheim.de ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6718-1358>

Raúl Ernesto Torres-Fuentes, Prof. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuani km.5.5. CP: 54830. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. Tel: 53-42-281692. Fax: 53-42-281608. e-mail: carlosmh@uclv.edu.cu

Mathieu Brulé, Professor, University of Hohenheim. State Institute of Agriculture Engineering and Bioenergy. German, e-mail: Mathieu.Brule@uni-hohenheim.de

The authors of this work declare no conflict of interests.

This item is under license Reconocimiento-NoComercial de Creative Commons 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0).

The mention of trademarks of specific equipment, instruments or materials is for identification purposes, there being no promotional commitment in relation to them, neither by the authors nor by the publisher.