

Aus der Professur für Phytomedizin  
der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät

Zusammenfassung der kumulativen Dissertation

## **Survival of Plant Seeds in Anaerobic Digestion and Ensilage**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Agrarwissenschaften (*doctor agriculturae*, Dr.agr.)

an der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Rostock

**vorgelegt von**  
Dipl.-Biol. Juliane Hahn  
aus Hamburg

Verteidigung am 24. Juni 2024

Pflanzliche Biomasse ist ein vielseitiger Rohstoff, der zunehmend in der Energie- und Materialproduktion der kreislaufforientierten, biobasierten Wirtschaft Anwendung findet. Heute ergänzen auch samenbildende Wildpflanzenarten das Biomasseportfolio, zum Beispiel in der Biogasproduktion. Allerdings können Pflanzensamen sehr widerstandsfähig gegenüber zahlreichen Umweltfaktoren sein. Es ist daher möglich, dass Samen die Biogasproduktionskette überleben und unbeabsichtigt mit den Zwischen- oder Endprodukten, wie z. B. dem Gärrest aus Biogasanlagen, ausgebracht werden. Dies könnte zu Unkrautproblemen führen, deren Bekämpfung die Nachhaltigkeit beeinträchtigen und zusätzliche Kosten und Arbeit verursachen würde.

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit Samen von Wildpflanzen Prozesse der Biogasproduktion, nämlich die anaerobe Vergärung (AV) und die Silierung, überleben können. Insgesamt wurden 16 Arten (22 Samenchargen) untersucht, von denen die meisten aus einer im Handel erhältlichen Wildblumenmischung für die Biogaserzeugung ausgewählt wurden. Die Bestimmung der Lebensfähigkeit der Samen durch eine Kombination aus Keimtests und Tetrazoliumfärbung sowie die Modellierung der Samen-Lebensfähigkeit als Funktion der Expositionszeit erwiesen sich als wertvoll, um einen Einblick in die große Vielfalt der Lebensfähigkeitsreaktionen zu erhalten. Diese Reaktionen unterschieden sich zwischen den Arten und den Saatgutpartien. Es konnte bestätigt werden, dass Hartschaligkeit (HS), d. h. physikalische Dormanz, das Überleben begünstigt, wobei Tiefe und Grad der HS eine Rolle spielen könnten. Die Grundlage der Resistenz bei den überlebenden, nicht-hartschaligen (NHS) Arten muss noch ermittelt werden, ebenso wie mögliche Beziehungen zwischen Resistenzpotenzial und taxonomischer Zugehörigkeit.

Es wurde festgestellt, dass die AV die Lebensfähigkeit der Samen reduzierte, wobei das Ausmaß der Reduktion durch ein Zusammenspiel von Sameneigenschaften und Prozessparametern bestimmt wurde. Die Reaktionen der Samen-Lebensfähigkeit reichten von einer vollständigen Inaktivierung innerhalb von 24 Stunden über einen steilen Rückgang nach einer *lag*-Phase bis hin zu einem anfänglichen Anstieg der Lebensfähigkeit (Hormesis). Nach der maximalen Expositionszeit von 36 Tagen in den Labor- oder kommerziellen Biogasreaktoren bei mesophilen Temperaturen zwischen 35 und 42 °C betrug die durchschnittliche Wirksamkeit der Samenabtötung etwa 53 % bzw. 100 % für HS- und NHS-Arten. Die Samen einiger Arten überlebten alle Behandlungen. *Malva sylvestris*, *Melilotus albus* und *Melilotus officinalis* waren besonders AV-resistent und wiesen als einzige Arten biphasische Lebensfähigkeitskurven auf. Bei den meisten Arten führten jedoch eine längere Verweildauer und höhere Temperaturen zu einer stärkeren Inaktivierung der Samen. Im Vergleich zu den Versuchsreaktoren im Labormaßstab tötete der kommerzielle Reaktor die Samen effizienter ab. Der Vergleich von Wasserbädern und Reaktoren zeigte, dass sich die Thermoresistenz von Samen noch nicht als zuverlässiger Indikator für das Überleben in AV eignet, da die Temperatur ein wichtiger, aber nicht der

einzig bestimmende Faktor für die Inaktivierung der Samen war. Die Abschätzung des Samen-Überlebens in der AV wird genauer werden, wenn künftige Studien vollständige Lebensfähigkeitskurven aufzeichnen, d. h. bis zur Inaktivierung sowohl von dormanten als auch nicht-dormanten Samen. Auf dieser Grundlage könnte die Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Labor- auf den Großmaßstab quantifiziert und die Eignung der Thermoresistenz als Überlebensindikator in der AV neu bewertet werden.

Die Silierung im Labormaßstab über einen Zeitraum von bis zu acht Monaten hat keine der getesteten HS-Arten vollständig inaktiviert, wohl aber alle NHS-Arten. Die samenabtötende Wirkung für die HS-Arten lag zwischen 5 und 60 %. Es wurde kein einheitlicher Effekt von Silagetypen, die sich im silierten Ausgangsmaterial, den Silierbedingungen und der daraus resultierenden biochemischen Zusammensetzung der Silagen unterschieden, auf das Überleben der Samen beobachtet. Die Faktoren, die der Abtötung von Samen in Silagen zugrunde liegen, müssen daher noch ermittelt werden.

Schließlich wurde nachgewiesen, dass sich die Biomasse der Wildblumenmischung für die Silierung eignet, vorzugsweise gemischt mit Mais. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass diese Biomasse - und ihre Samen - in die Biogasproduktionskette gelangen. Ob die Verwendung solcher samentragender Wildpflanzenbiomasse als Biogasrohstoff das Risiko birgt, Silage und Gärreste mit lebensfähigen Samen zu verunreinigen, hängt jedoch sowohl vom Risiko des Samen-Überlebens als auch davon ab, ob die Samen in ausreichender Menge und Qualität in die Biogaskette gelangen. Die in dieser Arbeit ermittelten Saatgutabtötungseffizienzen von AD und Silage sowie das samenbürtige Resistenzpotenzial ermöglichen eine Abschätzung dieses Kontaminationsrisikos und können so zu einer nachhaltigen Nutzung von Wildpflanzenbiomasse beitragen.

## Summary

Plant biomass is a promising and increasingly used feedstock for energy and material production in a circular, bio-based economy. Today, seed-bearing wild plant species complement the feedstock portfolio, for example in biogas production. Plant seeds can, however, be very resistant to numerous environmental factors. Therefore, it is possible that seeds survive the biogas production chain and are unintentionally dispersed with the intermediate or end products such as the digestate from biogas plants. This could lead to weed problems, the control of which would compromise sustainability and cause additional costs and labor.

This study investigated the extent to which seeds of wild plants can survive processes in the biogas production chain, namely anaerobic digestion (AD) and ensiling. A total of 16 species (22 seed lots) were examined, most of them selected from a commercially available wildflower mixture designed for biogas production. The determination of seed viability by a combination of germination test and tetrazolium staining and the modeling of seed viability as a function of exposure time proved valuable to gain insight into the wide diversity of viability responses. The responses differed between species and seed lots. Hardseedness (HS), i.e., physical dormancy, was confirmed to favor survival, and depth and degree of dormancy may play a role. The basis of resistance in surviving non-hard-seeded (NHS) species remains to be investigated, as do possible relationships between resistance potential and taxonomic affiliation.

AD was found to reduce seed viability, with the extent of reduction being determined by an interplay of seed characteristics and process parameters. Responses to seed viability ranged from complete inactivation within 24 hours, to a steep decline after a lag phase, to an initial increase in viability (hormesis). After the maximum exposure time of 36 days in the lab- or full-scale biogas reactors at mesophilic temperatures between 35 and 42 °C, the average seed-killing efficacy was about 53% and 100% for HS and NHS species, respectively. Seeds of some species survived all treatments. *Malva sylvestris*, *Melilotus albus* and *Melilotus officinalis* were particularly AD-resistant and were the only species to exhibit biphasic viability curves. However, for most species, prolonged exposure and higher temperatures resulted in greater seed inactivation. Compared to the experimental lab-scale reactors, the full-scale commercial reactor killed seeds more efficiently. The comparison of water-baths and reactors revealed that seed thermoresistance is not yet suitable as a reliable proxy of survival in AD, as temperature was an important but not the only factor determining seed inactivation. Estimates of seed survival in AD will become more accurate if future studies record complete viability curves, i.e. up to inactivation of dormant and non-dormant seeds. On this basis, the transferability of results from lab- to full-scale could be quantified and the suitability of thermoresistance as a survival proxy in AD re-evaluated.

Lab-scale ensiling over a period of up to eight months did not completely inactivate any of the HS species tested, but did inactivate all NHS species. The seed-killing efficacy for the HS species ranged from 5 to 60 %. No consistent effect of silage types differing in the ensiled feedstock, the ensiling conditions and the resulting biochemical composition of the silages on seed survival was observed. The factors underlying the killing of seeds in silages therefore still need to be determined.

Finally, it was proven that the biomass of the wildflower mixture is suitable for ensiling, preferably mixed with maize. This increases the probability of this biomass - and its seeds - entering the biogas production chain. However, whether the use of such seed-bearing wild plant biomass as a biogas feedstock carries the risk of contaminating silage and digestate with viable seeds depends both on the risk of seed survival and on whether seeds enter the biogas chain in sufficient quantity and quality. The seed-killing efficacies of AD and silage and the seed-borne resistance potential determined in this thesis pave the way for estimating this contamination risk and can thus help to ensure the sustainable use of wild plant biomass.