

Vluchtige verbindingen in anaëroob  
bewaarde varkensdrijfmest

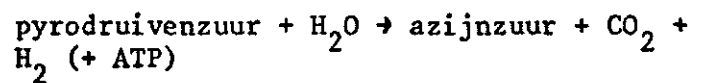
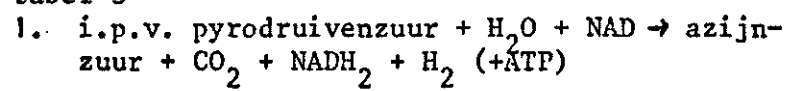
S. F. Spoelstra

Overdruk no.128

Overdruk uit Landbouwkundig tijdschrift/pt

91 (1979) 8: 227-231

Erratum: p. 5 tabel 3





# VLUCHTIGE VERBINDINGEN IN ANAËROOB BEWAARDE VARKENDRIJMEST

Dr. ir. S.F. Spoelstra

Instituut voor Veevoedingsonderzoek  
'Hoorn' in Lelystad

**De microbiologie van de stankproductie in varkensdrijfmest kan worden bestudeerd door van iedere stankcomponent de vormingswijze na te gaan. Een benadering waarbij ook de overall-fermentatie wordt beschouwd, biedt evenwel meer inzicht in de mogelijkheden tot stankbestrijding.**

In de intensieve varkenshouderij worden de varkens gehouden in stallen die voorzien zijn van roostervloeren. De geproduceerde uitwerpselen vallen door de roosters en worden onder de rooster-vloer opgeslagen totdat de mest wordt uitgereden. Het grote voordeel van dit mestverwijderingssysteem is dat het weinig arbeid vraagt. Een belangrijk nadeel is dat zich een grote hoeveelheid stinkende mest in de stal bevindt. De stank kan worden verspreid door middel van de ventilatielucht of tijdens het uitrijden, en kan dan overlast geven aan omwonenden. Klachten over stank veroorzaakt door varkenshouderijen komen dan ook dikwijls voor.

Dit artikel probeert informatie te geven over de vorming van stank in varkensdrijfmest. Stank of geur zijn echter niet 'meetbaar' zonder tussenkomst van de menselijke neus, wat het bestuderen van stankvorming in drijfmest erg moeilijk maakt. Nu hebben alleen vluchtige verbindingen een geur. Het is zelfs zo dat alle vluchtige verbindingen een geur hebben, wanneer ze in voldoende concentratie aanwezig zijn (dit met uitzondering van enkele gassen:  $N_2$ ,  $O_2$ ,  $CH_4$ , Ar,  $CO_2$ ). Op grond hiervan wordt in dit artikel de vorming van vluchtige verbindingen

in drijfmest besproken, waarbij men steeds moet bedenken dat het de vluchtige verbindingen zijn die de stank veroorzaken.

In varkensdrijfmest komt een groot aantal vluchtige verbindingen voor. Door diverse onderzoekers samen zijn ongeveer 150 componenten met een laag moleculair gewicht geïdentificeerd. In dit mengsel zullen sommige componenten op grond van hun concentratie, drempelwaarde of geurkarakter een grotere bijdrage leveren tot de stank dan andere. Sommige onderzoekers hebben geprobeerd de componenten te identificeren die de grootste bijdrage leveren tot de stank. Schaefer et al. (1974) vonden als zodanig: n-boterzuur, skatol, indol, fenol, p-cresol en diacetyl. De vorming van vluchtige verbindingen in drijfmest is het gevolg van de activiteit van bacteriën. In het navolgende worden verschillende aspecten van de bacteriële fermentatie van drijfmest besproken. De samenstelling van drijfmest en de gehalten aan enkele vluchtige verbindingen worden gegeven in tabel 1.

de fermentatie als een verzameling van processen, waarvan elk leidt tot een aantal vluchtige verbindingen

De vorming van vluchtige verbindingen in drijfmest kan worden bestudeerd door na te gaan waaruit de diverse componenten zijn ontstaan en via welke afbraakroutes ze gevormd worden. Hierbij kan onderscheid gemaakt worden tussen processen die in het dier plaatsvinden en processen die

zich afspelen in de drijfmest tijdens de opslag. Beide habitats hebben gemeen dat er geen zuurstof aanwezig is; er vindt dus anaëroobe microbiële fermentatie plaats.

Tijdens de passage door het dier wordt het voer onderworpen aan de activiteit van het spijsverteringssysteem. Primair zijn dit enzymen van dierlijke oorsprong, waarvan de werking gericht is op het opneembaar maken van het voer. Vooral in de dikke darm vinden bacteriële omzettingen plaats. Een deel van deze bacteriële afbraakproducten wordt door het dier geresorbeerd en vaak na ontgiftiging door conjugatie met glucuronzuur of sulfaat, in de urine uitgescheiden. De urine bevat dan ook opgeloste componenten met een betrekkelijk laag moleculair gewicht. Dit in tegenstelling tot de faeces, die behoudens producten van bacterieel katabolisme (zoals vluchtige vetzuren) bestaan uit niet-opgeloste bestanddelen zoals onverteerd voer en bacteriën (varkensfaeces kunnen

tabel 1. Gehalten aan enkele vluchtige verbindingen in varkensdrijfmest

component	gehalte
droge stof	3 - 15 %
as (% droge stof)	24 - 40 %
ammoniak	2,7 - 10,9 g/kg*
azijnzuur	2,0 - 15,7 g/kg
propionzuur	1,2 - 6,6 g/kg
boterzuur	0,4 - 3,1 g/kg
fenol	7 - 55 mg/kg
p-cresol	140 - 350 mg/kg
indol	0 - 11 mg/kg
skatol	9 - 54 mg/kg

\* kg nat materiaal

Voor 1978 was de auteur werkzaam bij de Vakgroep Microbiologie van de Landbouwhogeschool in Wageningen, waar in opdracht van de Commissie Hinderpreventie Veeteeltbedrijven een onderzoek werd uitgevoerd naar stankveroorzakende processen in varkensdrijfmest.

Dit artikel is geschreven naar aanleiding van een voordracht op de megistadagen 1978 te Wageningen gehouden.

tien tot de macht elf =  $10^{11}$  bacteriën/g bevatten, dit komt overeen met 10% van het gewicht van de faeces).

Tijdens de bewaring van het mengsel van faeces en urine in de drijfmestkelder worden vele bestanddelen door bacteriën gemetaboliseerd. Hierbij wordt opgemerkt dat drijfmest een eigen aangepaste microflora heeft en dat de bacteriën van de darmflora, die met de faeces in de drijfmest komen, in de drijfmest niet overleven. Het duidelijkst blijkt dit uit het onvermogen van de meeste bacteriën in drijfmest om te groeien bij  $37^{\circ}\text{C}$  (Spoelstra, 1978a). De omzettingen die plaatsvinden in drijfmest variëren van betrekkelijk eenvoudige hydrolyses van componenten van urinaire oorsprong tot afbraak van ingewikkelde biopolymeren (bijv. delen van plantecelwanden) uit de faeces. In tabel 2 is een beknopt overzicht gegeven van enkele microbiële omzet-

tingen die in drijfmest voorkomen. In deze tabel is onderscheid gemaakt tussen substraten die afkomstig zijn uit de urine en die uit de faeces. Vele verbindingen uit de urine worden in drijfmest door enkele (of zelf één) enzymatische reacties omgezet tot een vluchtige verbinding. Dit zijn omzettingen die snel nadat de urine de drijfmest heeft bereikt, zijn voltooid. Dit in tegenstelling tot de afbraak van de biopolymeren uit de faeces. Lignine en vet worden in drijfmest zelfs helemaal niet afgebroken. Koolhydraten en eiwit worden eerst gehydrolyseerd tot de samenstellende monomeren (resp. suikers en aminozuren), die vervolgens verder worden afgebroken. De suikers worden omgezet tot hoofdzakelijk vluchtige vetzuren. De ongeveer 20 aminozuren, die de bouwstenen vormen van eiwit, kunnen ieder worden afgebroken tot een aantal vluchtige verbindingen. Eén of

meer lagere vetzuren en ammoniak kunnen uit elk aminozuur worden gevormd. Andere afbraakproducten zijn sterk afhankelijk van de chemische bouw van elk aminozuur.

#### afbraak van tyrosine

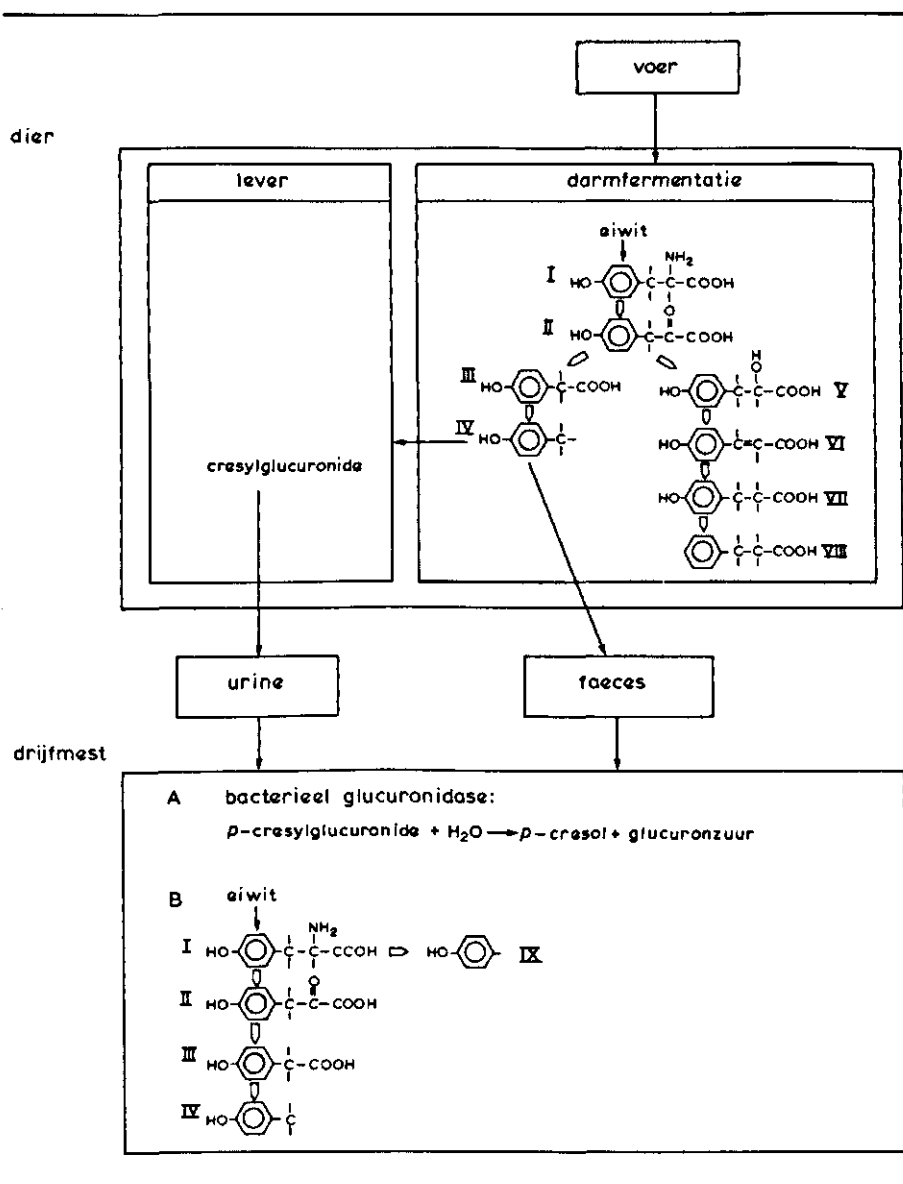
Het zou te ver voeren hier de afbraak van alle aminozuren te bespreken, afgezien nog van het feit dat de afbraakroutes in drijfmest van de meeste aminozuren niet bekend zijn. Bij wijze van voorbeeld zal hier volstaan worden met de beschrijving van het katabolisme van tyrosine tijdens de weg van voer naar drijfmest (zie figuur 1). Bij de afbraak van voereiwit in de darm komt tyrosine vrij. Door bacteriën in het darmkanaal wordt tyrosine afgebroken tot p-cresol en fenylpropionzuur. Deze afbraakproducten worden gedeeltelijk door het dier opgenomen en in de lever geconjugeerd met glucuronzuur. De aldus gevormde glucuronides worden in de urine uitgescheiden. In de drijfmest worden door de werking van het bacteriële enzym glucuronidase de glucuronides gehydrolyseerd en komt p-cresol weer vrij. In drijfmest verloopt de afbraak van tyrosine iets anders dan in de darm. De vorming van fenylpropionzuur speelt in drijfmest een ondergeschikte rol, daarentegen worden ongeveer gelijke hoeveelheden fenol en p-cresol gevormd (Spoelstra, 1978b).

#### vluchtige vetzuren

Het beeld dat uit de bovenstaande beschouwingen ontstaat over de vorming van vluchtige verbindingen in drijfmest is uiterst complex. Deze complexiteit vindt in de eerste plaats zijn oorsprong in de vele componenten die aanwezig zijn in het aangeboden voer. Door achtereenvolgens de processen van spijsvertering, darmfermentatie en fermentatie in drijfmest kunnen de voerbestanddelen worden afgebroken tot verschillende vluchtige verbindingen. Het beeld kan echter aanzienlijk worden vereenvoudigd door niet in de eerste plaats te

tabel 2. Overzicht van producten die gevormd worden door microbiële activiteit in drijfmest van de hoofdbestanddelen van urine en faeces

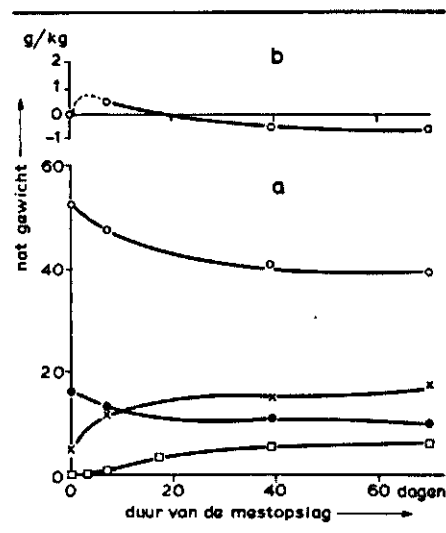
	component	producten in drijfmest
urine	ureum	ammoniak
	glucuronides	niet-koolhydraat + glucuronzuur
	hippuurzuur	glycine + benzoëzuur
	sulfaat	zwavelwaterstof
faeces	eiwit	aminozuren → vluchtige vetzuren
		→ ammoniak
		→ amines
		→ mercaptanen
		bijvoorbeeld:
		asparaginezuur → propionzuur, azijnzuur
		cysteïne → $\text{CS}_2$ , $\text{H}_2\text{S}$ , diethylsulfide,
		methionine → methylmercaptan
		threonine → propionzuur
		tryptofaan → indol, skatol
tyrosine → fenol, cresol, fenylpropionzuur		
valine → iso-boterzuur		
	koolhydraten (vnl. hemicellulose)	azijnzuur, propionzuur, boterzuur, geringere hoeveelheden andere lagere vetzuren, alcoholen, aldehyden, ketonen,
	lignine	wordt in drijfmest niet afgebroken
	vet	kan worden gehydrolyseerd, de gevormde vetzuren worden niet afgebroken.



1. Vorming van p-cresol en fenol door afbraak van tyrosine in het varken en in varkensdrijfmest.

I, Tyrosine; II, (4-hydroxyfenyl)pyrodruivenzuur; III, (4-hydroxyfenyl)azijnzuur; IV, p-cresol; V, (4-hydroxyfenyl)melkzuur; VI, (4-hydroxyfenyl)acrylzuur; VII, 3-(4-hydroxyfenyl)propionzuur; VIII, 3-fenylpropionzuur en IX, fenol.

2. a. Afbraak van vezel (o-o) en eiwit (●-●) en vorming van vluchtige vetzuren (X-X) en gassen (□-□) in een anaëroob geïncubeerd mengsel van faeces en urine. b. Massabalans berekend uit de gegevens in 2a.



letten op het aantal componenten dat ontstaat, maar op de concentraties van de vluchtige verbindingen die gevormd worden. In dat geval blijkt dat slechts een beperkt aantal verbindingen in aanzienlijke hoeveelheden in drijfmest voorkomt. Figuur 2 laat de resultaten zien van een experiment waarin de vorming van drijfmest gesimuleerd werd door een mengsel van de faeces en urine te incuberen. Het blijkt dat de fermentatie kan worden beschreven als afbraak van eiwit en vezelmateriaal (waarschijnlijk de gemakkelijke aantastbare koolhydraten zoals hemicellulose) tot vluchtige vetzuren ( $C_1 - C_5$ ),  $\text{CO}_2$  en enig methaan. Op basis van deze

gegevens kan een redelijk sluitende massabalans worden verkregen (figuur 2b). Met andere woorden: het leeuwendeel van de gevormde vluchtige componenten bestaat uit vluchtige vetzuren gevormd door afbraak van vezel en eiwit, terwijl de andere verbindingen in betrekkelijke geringe tot zeer geringe hoeveelheden worden gevormd.

de microbiële fermentatie gezien als één samenhangend proces

De afbraak is een anaëroob ecosysteem kan worden gezien als een voedselketen waarin biopolymeren via diver-

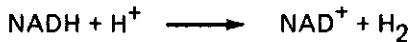
se stappen worden omgezet in producten die in het systeem ophopen en kennelijk niet verder kunnen worden afgebroken. In zo'n voedselketen fungeert het uitgescheiden afbraakproduct van de ene bacterie als substraat voor de anderen. Zo wordt het oorspronkelijke substraat in een aantal opeenvolgende reacties, waarbij diverse bacteriën betrokken kunnen zijn, omgezet in het uiteindelijke product (fig. 3). De aard van het product wordt bepaald door de aard van het oorspronkelijke substraat en door de randvoorwaarden van het ecosysteem. Onder deze randvoorwaarden kunnen we dan verstaan factoren als temperatuur, de kinetiek

van toevoer van substraat en afvoer van produkten en de eventuele toevoer van zuurstof.

Het doel van het fermenteren van substraat door een bacterie is het verkrijgen van energie in de vorm van ATP. Nu hangt de hoeveelheid ATP die een bacterie uit een bepaalde fermentatie verkrijgt, niet alleen af van zijn eigen metabolisme, maar ook van het metabolisme van sommige van zijn uitscheidingsprodukten door andere bacteriën. Recente onderzoeken hebben aangetoond dat vooral de concentratie van  $H_2$  in een ecosysteem een sterk regulerende invloed heeft op de afbraak (Wolin, 1976).

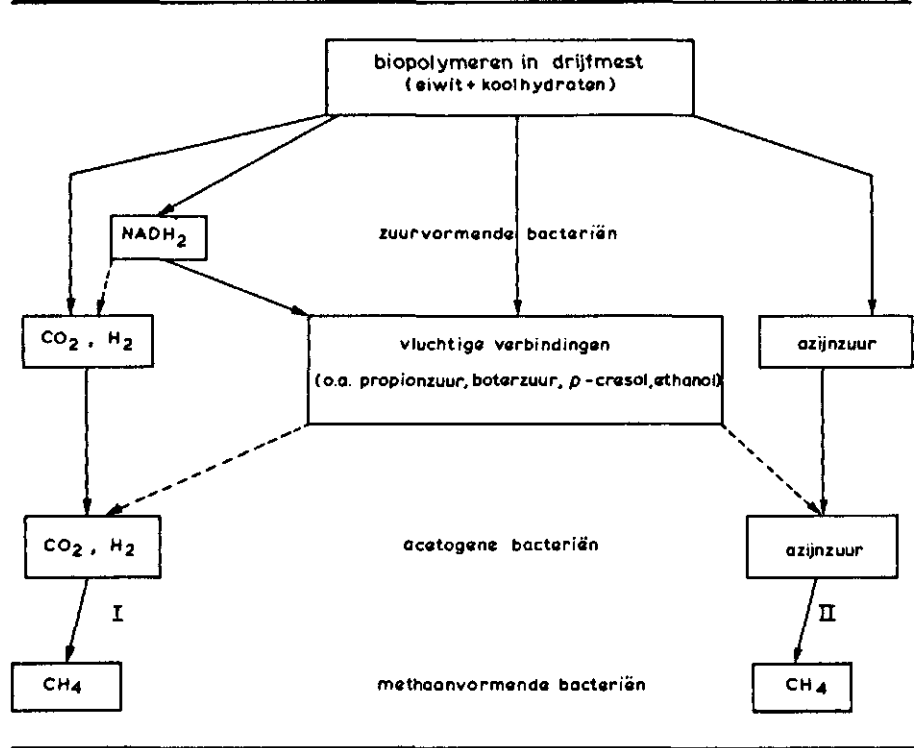
Bij alle fermentatieve ATP-leverende reacties komen reductie-equivalenten vrij in de vorm van  $NADH_2$ . Om verdere metabolische activiteit mogelijk te maken, moet de waterstof worden overgedragen op een waterstofacceptor. Aëroob is hiervoor zuurstof voorhanden; bij afwezigheid van zuurstof echter zal een deel van het potentieel energieleverende substraat hiervoor opgeofferd worden.

Op deze wijze worden produkten als propionzuur, boterzuur, ethanol en melkzuur door deze zogenoemde zuurvormende bacteriën gevormd (tabel 3). In plaats van een organische waterstofacceptor te benutten, kan soms ook waterstof worden gevormd:



Het evenwicht van deze reactie ligt sterk links. Deze reactie is alleen mogelijk wanneer het gevormde waterstof wordt weggenomen door  $H_2$ -benuttende bacteriën. De belangrijkste  $H_2$ -benuttende bacteriën zijn de methaanvormende bacteriën. Deze reduceren  $CO_2$  tot  $CH_4$  volgens  $CO_2 + 4H_2 \longrightarrow CH_4 + 2H_2O$ . Enkele methaanvormende bacteriën kunnen ook azijnzuur omzetten tot  $CO_2$  en  $CH_4$ .

In varkensdrijfmest is echter de methaanvorming geremd. Enige factoren die de methaanvorming in drijfmest ongunstig beïnvloeden kunnen worden genoemd. De optimumtemperatuur voor methaanvormende bacteriën is ongeveer  $35^\circ C$ , in drijfmest echter varieert de temperatuur, afhankelijk van het sei-



3. Schematisch overzicht van processen die een rol kunnen spelen in de fermentatie van varkensdrijfmest.

(-) Reacties in drijfmest. De reacties I en II zijn geremd waardoor waterstofaccumulatie plaatsvindt, terwijl de gestippeld aangegeven reacties (...), die alleen bij een lage waterstofconcentratie ( $< 10^{-3}$  atm.) kunnen verlopen, niet voorkomen.

zoen, van  $10$  tot  $20^\circ C$ . Ook hoge concentraties van ammoniak en zwavelwaterstof kunnen methaanbacteriën remmen.

In drijfmest wordt dus door fermentatie steeds zoveel waterstof gevormd (uit bijvoorbeeld reactie I in tabel 3), dat de methaanbacteriën er niet in slagen de  $H_2$ -concentratie voldoende laag te maken om een continue flow van waterstof van  $NADH_2$  via  $H_2$  naar methaan mogelijk te maken, met als gevolg dat waterstof wordt 'weggewerkt' in propionzuur, boterzuur, ethanol en dergelijke. De accumulatie van dit soort verbindingen zou dus worden voorkomen, wanneer een goede methaangisting in drijfmest zou plaatsvinden. Dit kan kunstmatig worden bereikt door de toevoer van substraat en de afvoer van uitgegist materiaal te reguleren en de temperatuur tussen  $30^\circ$  en  $40^\circ C$  te houden. Onder de con-

ditie van een goede methaangisting worden de zuurvormende bacteriën in staat gesteld om meer ATP te vormen, waardoor de afbraak ook sneller verloopt. Verder gaat dan de groep van intermediaire bacteriën (ook wel acetogene bacteriën genoemd) een rol spelen. Deze organismen worden door de lage  $H_2$ -concentratie in staat gesteld om ATP te verkrijgen uit het omzetten van eindprodukten van de zuurvormende bacteriën in azijnzuur en waterstof, dus in substraten voor methaanbacteriën. In tabel 4 zijn enkele voorbeelden van omzettingen door, of in samenwerking met, acetogene bacteriën gegeven. Opgemerkt moet worden dat over deze groep bacteriën niet veel bekend is. Tot dusverre zijn slechts twee organismen beschreven die dit soort reacties uitvoeren. Opvallend is dat ook aromaten onder deze condities wor-

**tabel 3.** Pyrodruivenzuur als energiebron (I) en als waterstofacceptor (II)

- I. pyrodruivenzuur + H<sub>2</sub>O + NAD → azijnzuur + CO<sub>2</sub> + NADH<sub>2</sub> + H<sub>2</sub> (+ ATP)
- II. a. pyrodruivenzuur + NADH<sub>2</sub> → melkzuur + NAD  
 b. pyrodruivenzuur + 2NADH<sub>2</sub> → propionzuur + H<sub>2</sub>O + 2NAD  
 c. pyrodruivenzuur + 2NADH<sub>2</sub> → ethanol + H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> + 2NAD  
 d. 2. pyrodruivenzuur + 2NADH<sub>2</sub> → boterzuur + 2CO<sub>2</sub> + 2H<sub>2</sub> + 2NAD

**tabel 4.** Reacties uitgevoerd door of in samenwerking met acetogene bacteriën

ethanol + H <sub>2</sub> O	→ azijnzuur + 2H <sub>2</sub>
propionzuur + 2H <sub>2</sub>	→ azijnzuur + 3H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>
boterzuur + 2H <sub>2</sub> O	→ 2 azijnzuur + 2H <sub>2</sub>
benzoëzuur + 6H <sub>2</sub> O	→ 3 azijnzuur + 3H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>

den afgebroken, hetgeen verklaart waarom fenol, cresol en dergelijke in drijfmest onder omstandigheden van een methaangisting worden afgebroken (Van Velsen, 1977).

#### conclusie

Ten gevolge van de condities waarbij drijfmest wordt opgeslagen (anaëroob, groot substraat aanbod, lage temperatuur) bestaat er in de drijfmest geen evenwicht tussen de vorming van producten door zuurvormende bacteriën en het wegnemen van deze verbindingen door methaanbacteriën in samenwerking met acetogene organismen. Deze laatste groep is zelfs geheel inactief in drijfmest. Dit ontbreken van evenwicht is de reden waarom vluchtige verbindingen (en dus stank) ophopen in drijfmest. Mogelijkheden om de stank in drijfmest te bestrijden, moeten gezocht worden in verandering van de bewaarcondities. Een mogelijkheid is het toevoeren van een H-acceptor. In de praktijk gebeurt dit al op betrekkelijk grote schaal in beluchtingsinstallaties; hier is namelijk zuurstof de toegevoerde H-acceptor. Ook een gecontroleerde methaangisting lijkt goede mogelijkheden te bieden om stank te bestrijden.

Het werkelijke effect van stankbestrijding kan alleen sensorisch worden bepaald. Goede aanwijzingen omtrent het stankbestrijdend effect van maatre-

gelen toegepast op drijfmest kan men evenwel verkrijgen door het gebruik van indicatoren. Als indicatorcomponent kan gedacht worden aan één of meer karakteristiek stinkende verbindingen. De vluchtige verbindingen ontstaan evenwel niet onafhankelijk van elkaar, maar tengevolge van dezelfde, 'fermentatiewetmatigheden'. Op grond hiervan lijken verschillende eindproducten van de zure gisting bruikbaar als indicator. Met name vluchtige vetzuren en cresol, als typisch produkt van de eiwitafbraak, lijken een goede keuze.

#### summary

The objectional smell of anaerobically stored piggery wastes originates from a large number of volatile compounds in the wastes. The accumulating volatiles result mainly from the microbial degradation of protein and plant cell wall residues. Partial processes can be identified which lead to malodorous products but such processes do not proceed independently, but are simultaneously with other partial processes leading to volatiles and are unbreakably associated with the overall fermentation. To understand the role of microbial degradation in the formation of malodorous compounds not only the processes leading to individual malodorous products but also the

overall fermentation should be considered. The overall approach reveals that the nature of the accumulating volatiles is mainly governed by the storage conditions of the wastes.

#### samenvatting

De stank van varkensdrijfmest wordt veroorzaakt door een aantal vluchtige verbindingen die ontstaan als gevolg van microbiële fermentatie van de bestanddelen van de drijfmest. De processen die leiden tot stankproductie, kunnen worden bestudeerd door van de stankcomponenten na te gaan waaruit ze worden gevormd en langs welke biochemische afbraakweg dit gebeurt. De verschillende vluchtige verbindingen ontstaan evenwel niet onafhankelijk van elkaar. Om inzicht te krijgen in de stankveroorzakende processen is het daarom zinvol de ophoping van vluchtige verbindingen in drijfmest te beschouwen als het resultaat van een enkel, het geheel omvattend, fermentatieproces. Hierbij wordt de aard van de eindproducten bepaald door de opslagcondities van de drijfmest.

#### literatuur

- Schaefer, J., Bemelmans, J.M.H., Ten Noever de Brauw, M.C. *Landbouwkundig Tijdschrift* 86 (1974): 228-232.
- Spoelstra, S.F. Enumeration and isolation of anaerobic microbiota of piggery wastes. *Appl. Environ. Microbiol.* 35 (1978a): 841-846.
- Spoelstra, S.F. Degradation of tyrosine in anaerobically stored piggery wastes and in pig feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 36 (1978b): 631-638.
- Van Velsen, A.F.M. Anaerobic digestion of piggery waste 1. The influence of detention time and manure concentration. *Neth. J. Agric. Sci.* 25 (1977): 151-169.
- Wolin, M.J. Interactions between H<sub>2</sub>-producing and methane-producing species, in *Microbial production and utilization of gases* (H.G. Schlegel, G. Gottschalk, N. Pfennig eds.) E. Goltze K.G., Göttingen 1976. pp. 141-150.