

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИКИ СООБЩЕСТВ АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2009 В.А. Вавилин

Институт водных проблем РАН, Москва;
e-mail: vavilin@aqua.laser.ru

Показано, что современный анализ поведения сообществ микроорганизмов, разлагающих органические вещества, включает традиционные измерения химических компонентов, молекулярно-биологические методы и математическое моделирование. Предложено уравнение, описывающее аккумуляцию изотопа в микробной клетке.

Ключевые слова: сообщество анаэробных микроорганизмов, аккумуляция изотопа в микробной клетке, имитационная модель.

ВВЕДЕНИЕ

При отсутствии кислорода в разложении органических веществ участвует целое сообщество микроорганизмов. В ходе этих стадий из сложных молекул образуются жирные кислоты и конечные продукты – метан (CH₄) и углекислый газ (CO₂). В начале 90-х годов прошлого столетия мы построили имитационную модель “Метан” [1], позволяющую оценить скорость разложения органического вещества в анаэробных условиях. Это была первая в мировой практике обобщенная математическая модель анаэробного процесса, которой могут пользоваться обычные исследователи и инженеры, а не только программисты-профессионалы (www.methane.da.ru). Высокие концентрации продукта или субстрата могут ингибировать каждую реакцию, и в итоге конечный продукт CH₄ может и не появиться.

Традиционно [2], для калибровки и верификации математических моделей процессов разложения органических веществ учитывается лишь динамика химических компонентов. Недавно, с развитием молекулярных методов стало возможным идентифицировать и измерять концентрации конкретных видов и групп микроорганизмов, осуществляющих процесс разложения органических веществ. Этому способствовали и соответствующие изотопные измерения. В статье приводится пример использования математического моделирования как метода изучения динамики сообщества мезофильных анаэробных микроорганизмов, разлагающих метанол.

СТЕХИОМЕТРИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

Согласно SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) и FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) анализов [3, 4], микроорганизмы, относящиеся к роду *Pseudomonas*, выполняют синтрофное окисление метанола вместе с водородотрофными метаногенами *Methanoculleus* sp., превращающих H₂/CO₂ в CH₄. Одновременно осуществляется превращение H₂/CO₂ в ацетат гомоацетогенными микроорганизмами рода *Clostridia*. Основной группой ацетикластических метаногенов, превращающих ацетат в метан, являются кокки *Methanosarcina* sp., образующие колонии.

1. CH₃OH + 2H₂O → 3H₂ + H₂CO₃ (Метанол-окисляющие бактерии)
2. H₂ + 0.25H₂CO₃ → 0.25CH₄ + 0.75H₂O (*Methanoculleus* sp.)
3. H₂ + 0.5 H₂CO₃ → 0.25CH₃COOH + H₂O (Гомоацетогены)
4. CH₃COOH + H₂O → CH₄ + H₂CO₃ (*Methanosarcina* sp.)

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Четыре группы микроорганизмов представлены в модели (метанол-окисляющие и гомоацетогенные бактерии, ацетикластические метаногены *Methanosarcina* sp. и водородотрофные метаногены *Methanoculleus* sp.). Метанол-окисляющие бактерии рассмотрены как автотрофы, использующие CO₂ для роста биомассы. Соответствующие функции Моно с одним или двумя субстратами применяются для описания процессов утилизации субстрата, образования продукта и роста биомассы:

$$\begin{aligned}
 \frac{d CH_3OH}{dt} &= -\rho_{mbacaut} B_{bacaut} \frac{CH_3OH}{K_{CH_3OHbacaut} + CH_3OH} \\
 \frac{d H_2CO_3}{dt} &= \rho_{mbacaut} B_{bacaut} \frac{CH_3OH}{K_{CH_3OHbacaut} + CH_3OH} \\
 &+ (1 - Y_{sar}) \rho_{msar} B_{sar} \frac{CH_3COOH}{K_{CH_3COOHsar} + CH_3COOH} - 0.5 \rho_{mhom} B_{hom} \frac{H_2}{K_{H_2hom} + H_2} \frac{H_2CO_3}{K_{H_2CO_3hom} + H_2CO_3} \\
 &- 0.25 \rho_{mcul} B_{cul} \frac{H_2}{K_{H_2cul} + H_2} \frac{H_2CO_3}{K_{H_2CO_3cul} + H_2CO_3} \\
 &- 5 \mu_m bacaut B_{bacaut} \frac{H_2CO_3}{K_{H_2CO_3bacaut} + H_2CO_3} \frac{CH_3OH}{K_{CH_3OHbacaut} + CH_3OH} - K (H_2CO_3 - H_2CO_3_{sat}) \\
 \frac{d H_2}{dt} &= 3 \rho_{mbacaut} B_{bacaut} \frac{CH_3OH}{K_{CH_3OHbacaut} + CH_3OH} - \rho_{mcul} B_{cul} \frac{H_2}{K_{H_2cul} + H_2} \frac{H_2CO_3}{K_{H_2CO_3cul} + H_2CO_3} \\
 &- \rho_{mhom} B_{hom} \frac{H_2}{K_{H_2hom} + H_2} \frac{H_2CO_3}{K_{H_2CO_3hom} + H_2CO_3} \\
 \frac{d CH_3COOH}{dt} &= 0.25 \rho_{mhom} B_{hom} \frac{H_2}{K_{H_2hom} + H_2} \frac{H_2CO_3}{K_{H_2CO_3hom} + H_2CO_3} - \rho_{msar} B_{sar} \frac{CH_3COOH}{K_{CH_3COOHsar} + CH_3COOH} \\
 \frac{d CH_{4_{tot}}}{dt} &= Vol * [0.373 ((1 - Y_{sar}) \rho_{msar} B_{sar} \frac{CH_3COOH}{K_{CH_3COOHsar} + CH_3COOH} \\
 &+ 2.8 (1 - Y_{cul}) \rho_{mcul} B_{cul} \frac{H_2}{K_{H_2cul} + H_2} \frac{H_2CO_3}{K_{H_2CO_3cul} + H_2CO_3}] \\
 \frac{d B_{bacaut}}{dt} &= \mu_m bacaut B_{bacaut} \frac{H_2CO_3}{K_{H_2CO_3bacaut} + H_2CO_3} \frac{CH_3OH}{K_{CH_3OHbacaut} + CH_3OH} - k_{dbacaut} B_{bacaut} \\
 \frac{d B_{hom}}{dt} &= Y_{hom} \rho_{mhom} B_{hom} \frac{H_2}{K_{H_2hom} + H_2} \frac{H_2CO_3}{K_{H_2CO_3hom} + H_2CO_3} - k_{d_{hom}} B_{hom} \\
 \frac{d B_{sar}}{dt} &= Y_{sar} \rho_{msar} B_{sar} \frac{CH_3COOH}{K_{CH_3COOHsar} + CH_3COOH} - k_{d_{sar}} B_{sar} \\
 \frac{d B_{cul}}{dt} &= Y_{cul} \rho_{mcul} B_{cul} \frac{H_2}{K_{H_2cul} + H_2} \frac{H_2CO_3}{K_{H_2CO_3cul} + H_2CO_3} - k_{d_{cul}} B_{cul}
 \end{aligned} \tag{1}$$

где CH_3OH , CH_3COOH , H_2CO_3 , H_2 - концентрации метанола, ацетата, карбоновой кислоты и водорода; $H_2CO_3_{sat}$ - насыщающая концентрация карбоновой кислоты; B_{bacaut} , B_{hom} , B_{sar} , B_{cul} - концентрации автотрофных метанол-окисляющих и гомоацетогенных бактерий, ацетикластических метаногенов *Methanosarcina* sp., и водородотрофных метаногенов, соответственно; $CH_{4_{tot}}$ - полный объем продуцируемого метана; $\rho_{mbacaut}$, ρ_{mhom} , ρ_{msar} , ρ_{mcul} - максимальные удельные скорости утилизации метанола, H_2/CO_2 и ацетата соответствующей группой микроорганизмов; $K_{H_2CO_3hom}$, $K_{H_2CO_3cul}$, $K_{H_2CO_3bacaut}$, $K_{CH_3COOHsar}$, K_{H_2hom} , K_{H_2cul} , $K_{CH_3OHbacaut}$ - соответствующие константы полунасыщения; μ_m - максимальная скорость роста биомассы метанол-окисляющих бактерий; $k_{dbacaut}$, $k_{d_{hom}}$, $k_{d_{sar}}$, $k_{d_{cul}}$ - удельные скорости распада биомассы соответствующих микроорганизмов;

Y_{hom} , Y_{syn} , Y_{cul} - соответствующие экономические коэффициенты роста биомассы; K - коэффициент массообмена для CO_2 в жидкой и газовой фазе; Vol - объем жидкой фазы.

При вычислениях учитывалось, что из-за взятия проб жидкости объем ее в реакторе уменьшается. Метан вычислялся в литрах. Для вычисления концентраций в весовых единицах (g/l) учитывались также молекулярные веса соответствующих химических компонентов (62: CH_3OH , 32: H_2CO_3 , 2: H_2 , 60: CH_3COOH , 113: биомасса). Численные расчеты были проведены с использованием пакета МАТЛАБ. Критерием, отражающим точность модели, является:

$$\sigma = \left\{ \frac{1}{LN - K} \sum_i^L \sum_j^N \left[1 - \frac{S_{ij}^c}{S_{ij}^m} \right]^2 \right\}^{1/2}$$

где S_{ij}^m, S_{ij}^c - измеряемые и вычисляемые переменные; i, j - порядковые номера переменных и их величин, измеренных в определенное время; L, N - общее число переменных и их измеренных значений; K - общее число коэффициентов модели. Для ускорения минимизации σ_{\min} осуществ-

лялась визуальная калибровка, когда все переменные и измеренные значения выводились на экран компьютера ($CH_3OH, CH_3COOH, TIC, TOC, CH_4$, и ^{13}C в ацетате, TIC и биомассе). Основные коэффициенты модели представлены в таблице.

Таблица. Параметры микроорганизмов, участвующих в мезофильном разложении метанола

Микроорганизмы	Реакция	$B_0, \text{ г л}^{-1}$	$\mu_m = \rho_m Y, \text{ сут}^{-1}$	$K_S, \text{ г л}^{-1}$	$Y, \text{ г г}^{-1}$	$k_d, \text{ сут}^{-1}$
Метанол-окисляющие	1	0,01	0,09	0,1(H_2CO_3)	-	0,01
Гомоацетогены	2	0,2	1,6	0,000008(H_2)	0,08	0,01
<i>Methanoculleus</i> sp.	3	0,01	1,5	0,000002(H_2)	0,05	0,01
<i>Methanosarcina</i> sp.	4	0,0015	0,2	1(CH_3COOH)	0,08	0,01

В ходе анаэробного процесса субстрат превращается в продукт и частично переходит в биомассу: Субстрат (S) → Продукт (P) + Биомасса (B). Для описания аккумуляции ^{13}C мы предложили следующие уравнение [5]:

$$\frac{df^P}{dt} = \frac{1}{P} \frac{d^{13}CP}{dt} - \frac{^{13}CP}{P^2} \frac{dP}{dt} = \frac{dP/dt}{P} \left\{ \frac{d^{13}CP/dt}{dP/dt} - f^P \right\} \quad (2)$$

$$\frac{df^{Bio}}{dt} = \frac{1}{B} \frac{d^{13}CB}{dt} - \frac{^{13}CB}{B^2} \frac{dB}{dt} = \frac{dB/dt}{B} \left\{ \frac{d^{13}CB/dt}{dB/dt} - f^{Bio} \right\} \quad (3)$$

$$f^P = \frac{^{13}CP}{P} \text{ и } f^{Bio} = \frac{^{13}CB}{B} - \text{доли } ^{13}C \text{ в продуктах}$$

и биомассе, которые, в свою очередь, зависят от

$$\text{доли } ^{13}C \text{ в субстрате } f^S = \frac{^{13}CS}{S}; \frac{dP}{dt} - \text{скорость}$$

аккумуляции продукта (если P одновременно является и субстратом в других реакциях, утилизация P не учитывается);

$$\frac{dB}{dt} - \text{скорость роста биомассы (распад биомас-$$

сы не учитывается). В случае единственного лимитирующего субстрата L, уравнение (3) можно записать в виде

$$\frac{df^{Bio}}{dt} \approx f(L) \{ f^S - f^{Bio} \} \quad (4)$$

$$\text{где } f(L) = \frac{\mu_m L}{K_L + L} - \text{функция Моно, } \mu_m = Y \rho_m$$

- максимальная удельная скорость роста биомассы. Согласно (4), чем выше доля ^{13}C в субстрате, тем выше и аккумуляция ^{13}C в биомассе. Скорость аккумуляции зависит от удельной скорости роста биомассы, которая, в свою очередь,

зависит от максимальной удельной скорости утилизации субстрата ρ_m и экономического коэффициента Y. Чем выше они, тем больше скорость аккумуляции изотопа.

Уровень насыщения содержания изотопа в клетке не превышает этого уровня в субстрате. Измеряя ^{13}C в отдельной микробной клетке (NanoSIMS: Nano Secondary Ion Mass Spectrometry – In Situ Hybridization [3]), можно уточнить механизм процесса. Модель дает возможность получать абсолютные концентрации меченой (тяжелой) и немеченой (легкой) биомассы различных микроорганизмов i:

$$B_{iheavy} = B_i \times \frac{^{13}C}{C} Bio \quad (5)$$

$$B_{ilight} = B_i \times \left(1 - \frac{^{13}C}{C} Bio \right) \quad (6)$$

Общая динамика системы показана на Рис. 1. Молекулярно-биологические анализы SSCP и FISH, также как и NanoSIMS были учтены при моделировании. В модели предполагалось, что часть органического вещества является биологически не разлагаемой (см. значения TOC, показанные на Рис. 1b). В мезофильных условиях наблюдается двух-стадийный процесс продукции метана. Если на первом этапе метан образуется из H_2/H_2CO_3 , то на втором этапе он образуется из ацетата. Скорость лимитирующей реакцией на первом этапе является реакция 1, тогда как реакция 4 лимитирует общую скорость образования метана на втором этапе. Эти реакции осуществлялись медленно растущими метанол-окисляющими бактериями и ацетикластическими метаногенами *Methanosarcina* sp., которым свойственны низкие μ_m , равные $0,09 \text{ сут}^{-1}$ и $0,2 \text{ сут}^{-1}$ соответственно (Табл. 1). С увеличением

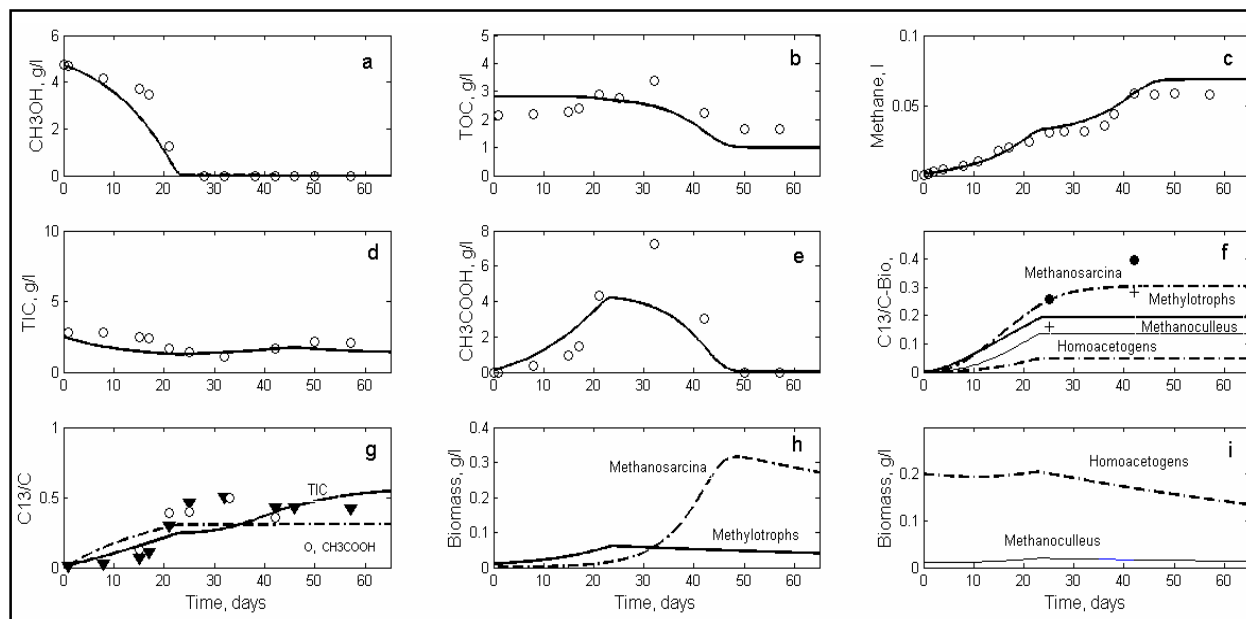


Рис. 1. Символы - эксперимент [3], кривые - динамическая модель. TIC и TOC - общая концентрация неорганического и органического углерода.

концентрации метанол-окисляющих бактерий (Рис. 1h) скорость потребления метанола также увеличивается (Рис. 1a). Согласно реакции 1, в процессе трансформации метанола образуется водород и угольная кислота, которые в дальнейшем превращаются в ацетат (Рис. 1e). Когда весь метанол исчезает (Рис. 1a) концентрации метанол-окисляющих и гомоацетогенных бактерий, также как и концентрация водородотрофных метаногенов начинают уменьшаться вследствие распада биомассы (Рис. 1h и 1i). Это происходит одновременно с исчезновением водорода (не показано на рисунке).

Концентрации водорода и метанола являются “быстрой” и “медленной” переменными, соответственно. Водород образуется из метанола метанол-окисляющими бактериями и его уровень

быстро подстраивается под текущую концентрацию метанола. Водородотрофные метаногены и гомоацетогены являются быстро растущими микроорганизмами. Величина μ_m равна $1,6d^{-1}$ и $1,5d^{-1}$ для *Methanoculleus* sp. и гомоацетогенов, соответственно (Табл. 1). В итоге эти микроорганизмы конкурируют за одинаковые субстраты (в основном водород).

Концентрация ацетата увеличивается до 23-х суток (Рис. 1e). С повышением концентрации ацетокластических метаногенов (Рис. 1h) скорость роста изъятия ацетата увеличивается (Рис. 1e). В этот период происходит и увеличение TIC (Рис. 1d). Процесс распада биомассы ацетокластических метаногенов начинается с 48-х суток (Рис. 1h), когда весь ацетат исчезает (Рис. 1e).

Гистограммы меченой (тяжелой) и немеченой

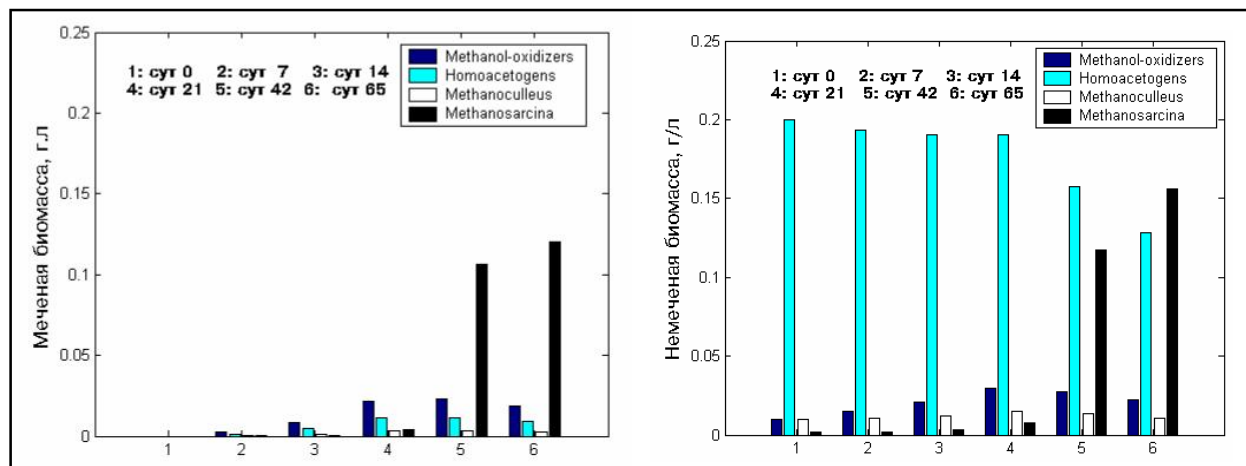


Рис. 2. Гистограммы абсолютных концентраций меченой (тяжелой) и немеченой (легкой) фракций биомассы микроорганизмов, рассмотренных в модели (1).

ной (легкой) фракций биомасс различных групп микроорганизмов, участвующих в процессе (Рис. 2) показали, что биомасса гомоацетогенных бактерий доминировала. Согласно рис. 1, начальная концентрация их равнялась $0,2 \text{ гл}^{-1}$. Поскольку в модели коэффициенты полунасыщения по угольной кислоте ($0,1 \text{ гл}^{-1}$) были существенно меньше, чем текущая концентрация ГИС (1 гл^{-1}), то концентрация H_2CO_3 , в отличие от концентрации H_2 , не лимитировала скорость роста гомоацетогенов и водородотрофных метаногенов. В легкой фракции лишь после 42-х суток биомассы *Methanosarcina* sp. и гомоацетогенных бактерий стали сравнимыми. В тяжелой фракции вклад *Methanosarcina* sp. был более значителен. Эти результаты подтверждаются качественными PCR-SSCP анализами [3]. В соответствии с экспериментом, модель показала, что аккумуляция ^{13}C в биомассе *Methanosarcina* sp. выше чем для метанол-окисляющих бактерий. Модель подтвердила, что метанол-окисляющие бактерии являются автотрофными микроорганизмами, т.е. они растут за счет H_2CO_3 , а не непосредственно за счет CH_3OH .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вавилин В.А., Васильев В.Б., Рытов С.В. Моделирование деструкции органического вещества сообществом микроорганизмов. - М.: Наука, 1993.
2. Batstone D.J., Keller J., Angelidaki I., Kalyuzhnyi S.V., Pavlostathis S.G., Rozzi A., Sanders W.T.M., Siegrist H., Vavilin V.A. Anaerobic Digestion Model No.1. Scientific and Technical Report No.13. 2002. Cornwall, UK: IWA Publishing. 77p.
3. Li T. Groups Microbiens Fonctionnels Impliqués dans la Methanization de la Cellulose et du Methanol: Diversité, Fonction et Influence de la Temperature. These de Doctorat. Université Paris-Sud 11, U.F.R. des Sciences d'Orsay. 2008.
4. Li T., Vavilin V.A., Wu T.-D., Mazeas L., Dabert P., Shu A., Chapeleur O., Grossin-Debatista J., Leblon G., Guerquin-Kern J.-L., Bouchez T. Deciphering functional network of uncultured microbes in complex ecosystems (in preparation).
5. Vavilin V.A., Li T., Qu X., Mazeas L., He P.-J., Bouchez T. Modelling solid waste degradation mechanisms: chemical reactions, microbial ecology and isotope ^{13}C fractionation // Proc.: 3rd International Workshop "Hydro-Physico-Mechanics of Landfills". Braunschweig, Germany, 10-13 March 2009, Session B, 1-10.

DYNAMICS OF ANAEROBIC MICROORGANISMS COMMUNITY: EXPERIENCE IN MATHEMATICAL MODELING

© 2009 V. A. Vavilin

Water Problems Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow;
e-mail: vavilin@aqu.laser.ru

It is shown that a traditional chemical kinetics, the new methods of molecular biology as well as isotopic composition analysis made possible to consider new constraints concerning degradation of organic matter and microbial dynamics. The equation was developed to describe isotope fractionation in microbial cells.

Key words: anaerobic microbial community, isotope fractionation, simulation model.