

Wie man aus biothermodynamischen Betrachtungen mikrobielle Lebensweisen verstehen kann

Berichtersteller: Carlo Romano, romano@swissworld.com und Bo Burla, bo.burla@datacomm.ch
 Betreuer: Kurt Hanselmann, hanselma@botinst.unizh.ch

Ziel der Experimente

Mittels des Computerprogramms Thermodyn[®] sollen bakterielle Prozesse in der bovinen Pansenflora bezüglich der Energetik untersucht werden. Es wird der glykolytische Abbau von Glukose durch *Ruminococcus flavefaciens* in Reinkultur und in Mischkultur mit *Methanobrevibacter ruminantium* dargestellt. Dabei soll gezeigt werden, wie sich die Organismen in der syntrophen Gemeinschaft energetisch gegenseitig beeinflussen. Es handelt sich um ein Modellexperiment über Prozesse und Organismen, welche im komplexen Ökosystem des Pansen vorkommen. Die Grundlage dazu bilden die Ergebnisse aus Experiment 1 des Praktikums.

Einleitung

In ersten Simulationsexperiment wird die thermodynamische Energetik des fermentativen Glucoseabbaus von *Ruminococcus flavefaciens* simuliert. Dabei wird **Glucose** zu **Formiat**, **Acetat** und **Succinat** abgebaut, welche im Verhältnis 62:107:93 gebildet werden (Aufgabe 3a, Kursanleitung Exp. 1). Aufgrund dieser Angaben rekonstruierten wir die möglichen biochemischen Prozesse. Diese sehen wie folgt aus (siehe auch Bericht zu Exp.1):

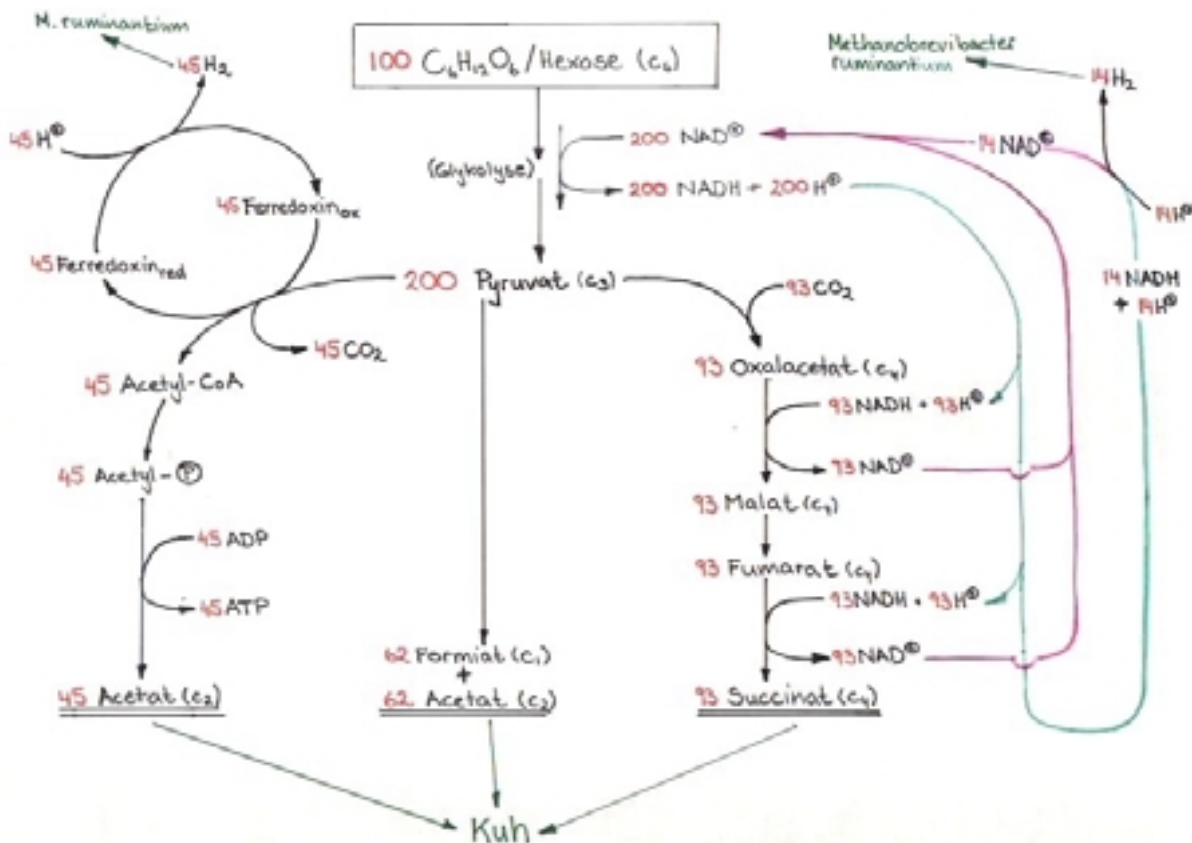


Abbildung 1. Glukose-Abbau durch *Ruminococcus flavefaciens*

Die Glucosefermentation durch *Ruminococcus flavefaciens* kann durch die folgende stöchiometrische Gleichung beschrieben werden:

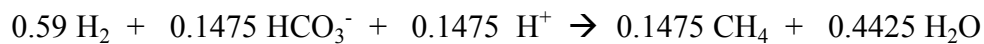


Damit diese Reaktion in der angegebenen Richtung abläuft, muss die Gibb'sche freie Energie $\Delta G_r < 0$ sein. Sie lässt sich wie folgt berechnen:

$\Delta G_r = \Delta G_r^0 + R \cdot T \cdot \ln Q,$	$\text{wobei } Q = \frac{\prod [\text{Produkte}]^f}{\prod [\text{Substrate}]^f} \quad (f: \text{ stöchiometrische Faktoren})$
--	---

Da R ($8.31 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) und T ($298.15 \text{ K} = 25^\circ\text{C}$) für den experimentellen Ansatz als konstant angenommen werden dürfen, muss der Term $\ln Q < 0$ sein, d.h. $Q < 1$ sein. Dies ist erfüllt, solange die Substrate noch im Überschuss vorliegen. Da die Produkte Formiat, Acetat und Succinat von der Kuh ins Blut aufgenommen werden, wird der Glukoseabbau nach obiger Gleichung als exergone Reaktion aufrecht erhalten.

Im Pansen wird das entstandene H_2 z.B. durch *Methanobrevibacter ruminantium*, einem hydrogenotrophen Methanbakterium weiterverwertet, wobei Methan entsteht. Die stöchiometrische Gleichung für die methanogene Reaktion sieht wie folgt aus:



Die stöchiometrischen Koeffizienten beziehen sich auf die 0.59 Moleäquivalente H_2 , die unter physiologischen Bedingungen bei der Umsetzung von 1 Moläquivalent α -D-Glukose von *Ruminococcus flavefaciens* gebildet werden (siehe Abb.1). Das entstehende Methan wird durch die Kuh beim Rülpsen entlassen. Wenn *M. ruminantium* z.B. durch Abtöten inaktiviert wird (Zugabe von Monensin), steigt die H_2 -Konzentration im Pansen, bis sie so hoch ist, dass acetogene Bakterien beginnen, den Wasserstoff zu Acetat umzusetzen. Aus energetischer Sicht ist die Umwandlung in Methan für die Kuh ein Energieverlust, die Umwandlung in Acetat würde der Kuh mehr bringen, da sie dieses in ihren Metabolismus aufnehmen kann. Dies wäre eigentlich wünschenswert, gäbe es da nicht das Problem, dass die grosse Menge an Essigsäure den Pansen übersäuern und dadurch die gesamte Mikrobiota stören könnte.

Durchführung und Auswertung verschiedener Simulationen.

Die Energiebilanzen werden mittels des Programms *Thermodyn*[®] simuliert. Die für diese Simulation angenommenen Bedingung und Stoffkonzentrationen können der Versuchsanleitung (http://www.microeco.unizh.ch/uni/kurs/bio3_02/pdf/18thermod.pdf) entnommen werden.

Beispiel 1: In Abbildung 2 wird die Energiebilanz der Glucosefermentation durch eine Reinkultur von *R. flavefaciens* unter Bedingungen dargestellt, wie sie im Pansensaft herrschen. Als variable Grösse ist die H₂-Konzentration vor und nach der Inkubation in einer Batchkultur gewählt.

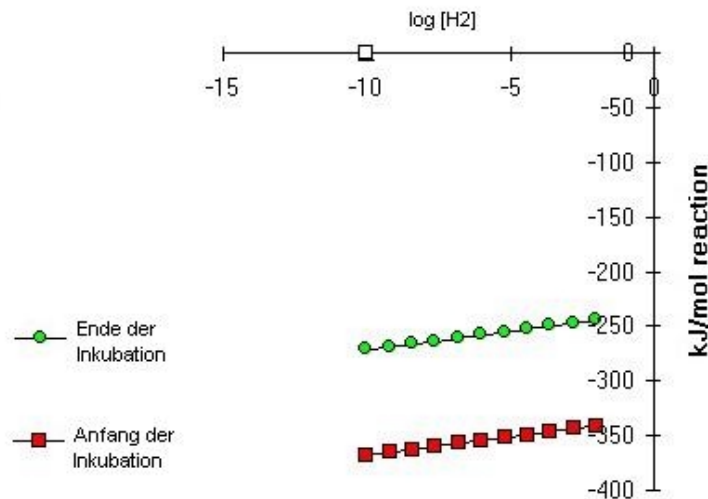


Abbildung 2. Energiebilanz der Glucosefermentation durch eine Reinkultur von *R. flavefaciens* simuliert unter *in vitro* Bedingungen der Batchkultur in Abhängigkeit der Wasserstoff-Konzentration

Beispiel 2: Hier wird dargestellt, wie sich die Entfernung von Formiat und des Wasserstoffs durch *Methanobrevibacter ruminantium* auf die Energetik der Glukosefermentation durch *R. flavefaciens* auswirkt. Die stöchiometrischen Gleichungen sind auf 1 Moleäquivalent Formiat normalisiert.

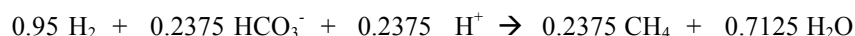
Gleichung 1: Glukoseabbau durch *R. flavefaciens*



Gleichung 2: Formiatotrophe Methanbildung durch *Methanobrevibacter ruminantium*



Gleichung 3: Hydrogenotrophe Methanbildung durch *Methanobrevibacter ruminantium*



Gleichung 4: Glukoseabbau im Pansen (Summe aus Gleichungen 1, 2 und 3)



Die Simulationen wurden mit den in den Versuchsanleitungen angegebenen Randbedingungen ausgeführt.

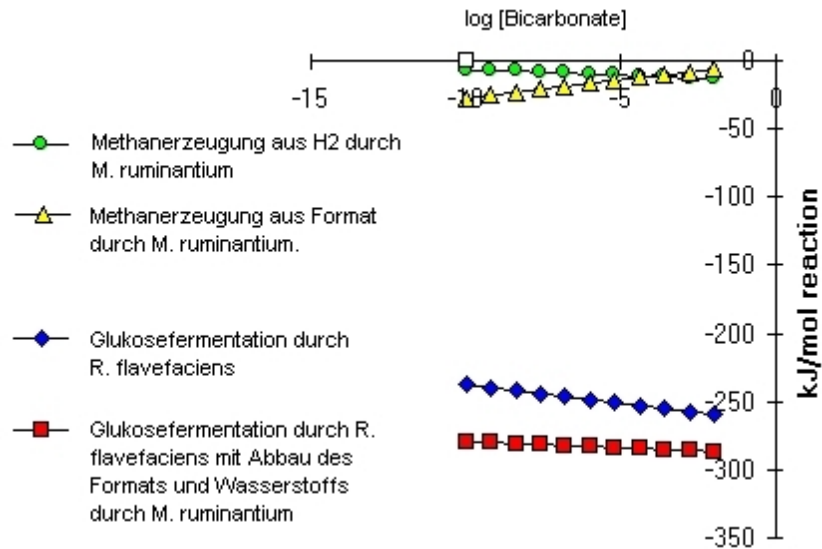


Abbildung 3. Energiebilanz der Methanerzeugung aus Formiat (gelbe Dreiecke) bzw. H_2 (grüne Kreise), durch *M. ruminantium* und der Glucosefermentation durch *R. flavefaciens* jeweils in Reinkultur (blaue Vierecke), sowie der Gesamtreaktion einer Mischkultur von *R. flavefaciens* und *M. ruminantium* (rote Quadrate) simuliert unter *in vitro* Bedingungen der Batchkultur in Abhängigkeit der Bicarbonat-Konzentration

Ergebnisse

Der Energiegewinn wird durch Änderungen der Konzentration der Substrate oder Fermentationsprodukte zwar beeinflusst, die Reaktion bleibt aber immer deutlich exergonisch. Unter der Annahme, dass auch der H_2 durch Mikroorganismen abgebaut wird, erhöht sich der Energiegewinn des Glucoseabbaus durch *R. flavefaciens*, da der Überschuss an Substraten noch signifikanter wird, und somit $\ln Q$ in der Gibb'schen Gleichung (siehe oben) noch negativer wird. Die methanproduzierenden Bakterien begünstigen also die Energetik jener Prozesse, die aus dem Glucoseabbau zu Produkten führen, welche von der Kuh aufgenommen werden können!

Anmerkungen zu den „Further Problems“ (siehe Versuchsanleitung 18 / Seite 6)

- 4 a) Auch wenn die Konzentration einer anderen, in der Reaktion beteiligten Substanz, variiert wird, zB. v Glukose, so ändert sich ΔG_r nur geringfügig, dies auch bei grossen Konzentrationsänderungen. I Reaktion bleibt immer deutlich exergonisch.
- 4 b) Der pH-Wert, also die H^+ -Konzentration, hat nur geringen Einfluss auf ΔG_r , und die Reaktion bleibt immer deutlich exergonisch.
- 5 a) Wie aus Abbildung 3 ersichtlich, ist die formiatotrophe methanogene Reaktion bei geringen Bikarbonatkonzentrationen thermodynamisch günstiger als die hydrogenotrophe.
- 5 c) Auf Grund der Ergebnisse aus diesen Simulationen, kann man erkennen, dass die metabolisch Reaktionen im Pansenökosystem thermodynamisch optimiert sind. In der hochkomplexen Pansenfl kann man zwar viele thermodynamische Prozesse und deren Interaktionen simulieren, es bleibt aber eine besondere Herausforderung, diese auch experimentell nachzuvollziehen.