

## Durch biothermodynamische Modellversuche mikrobielle Lebensweisen verstehen und interpretieren

BerichterstatterInnen: Maria Rasmussen, [maria.rasmussen@bluemail.ch](mailto:maria.rasmussen@bluemail.ch),  
Christin Weisbrod, [christin.weisbrod@gmx.ch](mailto:christin.weisbrod@gmx.ch)  
Nohemy Echeverry, [lamarca@hotmail.com](mailto:lamarca@hotmail.com)

Betreuer: Kurt Hanselmann, [hanselma@botinst.unizh.ch](mailto:hanselma@botinst.unizh.ch)

### Ziel der Experimente

Das Computerprogramm *Thermodyn*® gibt ein Verständnis, wie gut und unter welchen Bedingungen bakterielle Prozesse ablaufen. Ferner gibt es einen übersichtlichen Vergleich zwischen mehreren bakteriellen Prozessen, und man kann einfach und schnell erkennen, welche Konzentrationen einzelner Moleküle lebensnotwendig sind. Wir bearbeiteten ein Modellexperiment über Prozesse und Organismen, welche im Ökosystem des Kuhpansens vorkommen. Die Grundlage dazu bilden die Ergebnisse aus dem Experiment 1 des Praktikums.

### Einleitung

Um die thermodynamische Energetik zu verstehen, wird als Beispiel der fermentative Glucoseabbau von *Ruminococcus flavefaciens* gezeigt (Aufgabe 3a, Kursanleitung Experiment 1). Dabei wird Glucose zu Formiat, Acetat und Succinat im Verhältnis 62:107:93 abgebaut, wobei noch Wasserstoff und Kohlendioxid gemessen wurde. Aufgrund dieser Aufgaben rekonstruieren wir die möglichen biochemischen Prozesse folgendermassen:

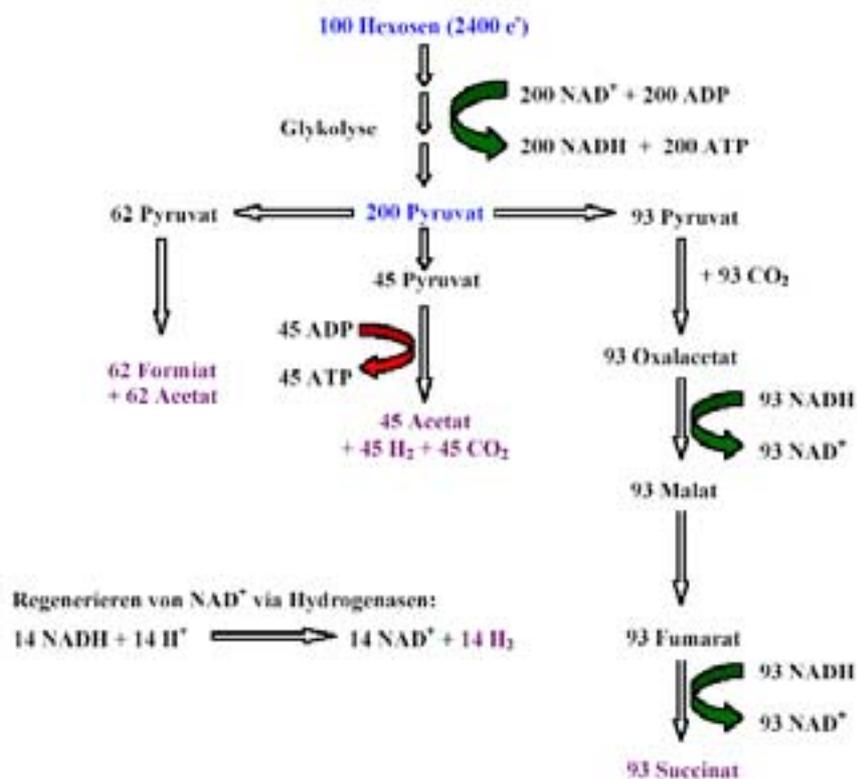
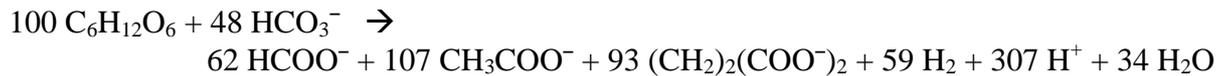


Abbildung 1. Anaerober Glukose-Abbau durch *Ruminococcus flavefaciens* in Einzelkultur (aus Report 2001/02)

Kurze Erläuterung:

Succinat entsteht aus Oxalacetat über den reduktiven Zitronensäurezyklus, wobei NADH durch Malat-Dehydrogenase (Oxalacetat-Malat-Reduktase) und Fumarat-Reduktase zu NAD<sup>+</sup> zurück oxidiert wird. Diese Reaktionen sind Redoxreaktionen, da der Elektronendonator (NADH) oxidiert und gleichzeitig die Elektronenakzeptoren (Oxalacetat und Fumarat) reduziert werden.

Die Glucosefermentation kann mit den angegebenen Substrat- und Produktkonzentrationen durch folgende stöchiometrische Gesamtgleichung dargestellt werden:



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

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

Da R (8.31 J·mol<sup>-1</sup>·K<sup>-1</sup>) und T (298.15 K = 25°C) für den experimentellen Ansatz als konstant angenommen werden dürfen, muss der Term  $\ln Q < 0$ , d.h.  $0 < Q < 1$  sein. Dies ist erfüllt, solange das algebraische Produkt der Substratekonzentrationen grösser ist als das algebraische Produkt der Produktkonzentrationen. 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<sub>2</sub> z.B. durch *Methanobrevibacter ruminantium*, einem hydrogenotrophen Methanbakterium weiter verwertet, 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<sub>2</sub>, die unter physiologischen Bedingungen bei der Umsetzung von 1 Moläquivalent  $\alpha$ -D-Glukose von *Ruminococcus flavefaciens* gebildet werden (siehe Abb.1). Wenn *M. ruminantium* z.B. durch Antibiotika inaktiviert wird (Zugabe von Monensin), steigt die H<sub>2</sub>-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.

## Umgang mit *Thermodyn*©

Mit diesem Programm ist es möglich, verschiedene Situationen für Mikroorganismen zu simulieren. Genauere Angaben und Erklärungen kann man in der Versuchsanleitung nachlesen [http://www.microeco.unizh.ch/uni/kurs/bio3\\_03/pdf/18thermod02.pdf](http://www.microeco.unizh.ch/uni/kurs/bio3_03/pdf/18thermod02.pdf)

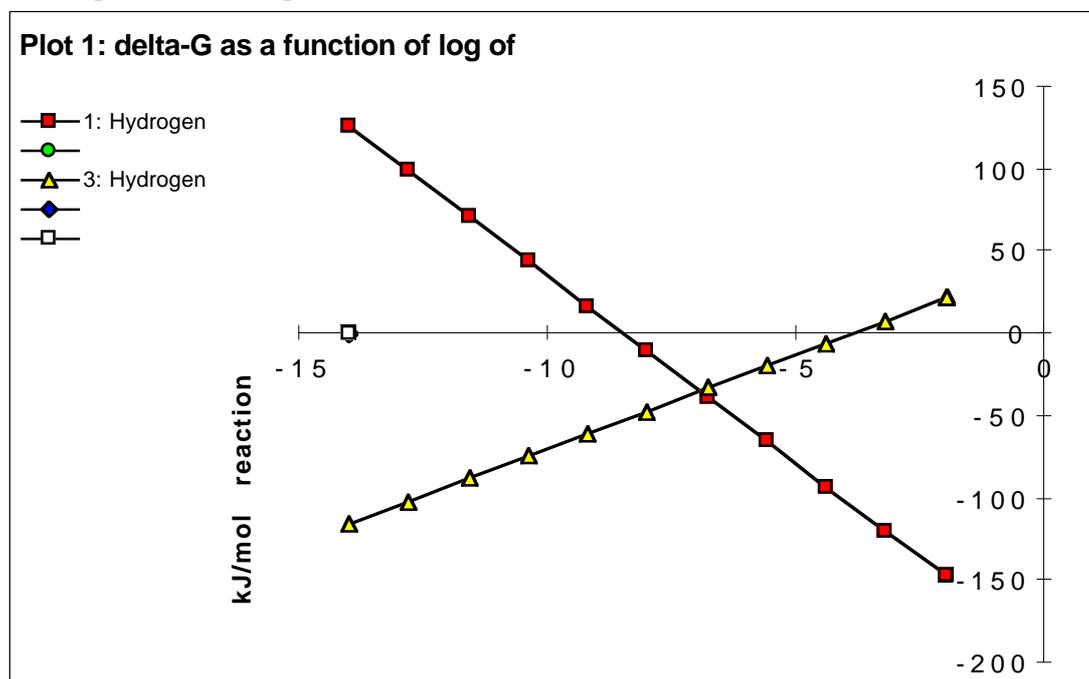
Wir gehen auf zwei verschiedene Probleme ein.

**1. Situation:** Interaktion zweier Mikroorganismen, ein allgemeines Beispiel. Der Graphik kann man entnehmen, dass sie sich gegenseitig ergänzen – eine mikrobiologische Symbiose. Woran erkennt man das?

Hier die Stoff- und Konzentrationsangaben für die Reaktionen 1 und 3 aus *Thermodyn*: Reaktion 3 stellt eine Fermentation der Endstufe dar. Ethanol, ein Produkt aus der primären Fermentation wird weiter zu Acetat oxidiert, wobei Wasserstoff freigesetzt wird.

Reaction No.	(S,P)	Stoich. Coeff.	Enter formula	State	Special remarks	Activity	Variable	Note	Compound	Formula
1	s	4	H2	aq			v		Hydrogen	H2
1	s	1	CO2	aq		1,00E-03			Carbon dioxide	CO2
1	p	1	Methane	aq		1,00E-03			Methane	CH4
1	p	2	H2O	l		1,00E+00			Water	H2O
3	s	1	Ethanol	aq		1,00E-03			Ethanol	C2H5OH
3	s	1	H2O	l		1,00E+00			Water	H2O
3	p	1	acetate	aq		1,00E-03			Acetate	CH3COO-
3	p	1	H+	aq		1,00E-07			Proton	H+
3	p	2	H2	aq			v		Hydrogen	H2

Und hier die entsprechende Graphik:



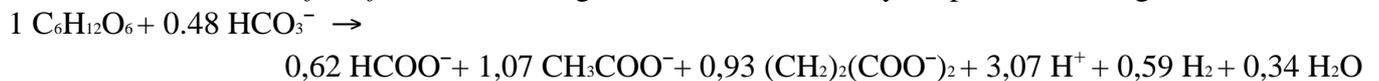
Auf der Abszisse wird die Wasserstoffkonzentration in Mol/l logarithmisch aufgetragen, auf der Ordinate die Gibb'sche freie Energie der Reaktionen 2 und 3 in kJoule/Mol, berechnet für die in der Tabelle aufgeführten Randbedingungen (Aktivitäten der Reaktionspartner) im Steady State.

Organismus 1 wandelt CO<sub>2</sub> in CH<sub>4</sub> um und braucht dazu Wasserstoff. Organismus 3 produziert Wasserstoff aus der Oxidation von Ethanol. Die beiden Organismen ergänzen sich in dem Sinne, dass Organismus 1 ein Produkt (H<sub>2</sub>) aus dem Stoffwechsel von Organismus 3 als Substrat verwertet. Optimaler Zustand für beide ist im Schnittpunkt erreicht.

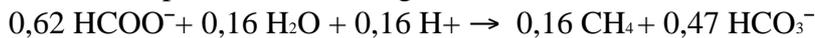
**2. Situation:** (Nach Problem 3 aus Exp. 1) Glukosefermentation von *R. flavefaciens* und Methanbildung aus Formiat (und Wasserstoff) durch *M. ruminantium*. Hier wird dargestellt, welche Auswirkungen Konzentrationsänderungen von Hydrogenkarbonat bei der Verwertung von Formiat und Wasserstoff auf Bildungs- und Verbraucher-Organismen hat.

Gleichungen der verschiedenen beteiligten Reaktionen:

Glukoseabbau durch *R. flavefaciens*., Bildung der Substrate für die syntrophen Methanogenen



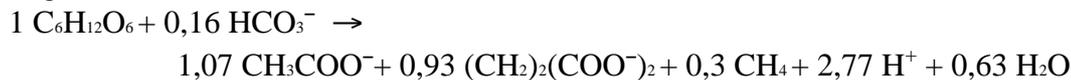
Formiatotrophe Methanbildung durch *Methanobrevibacter ruminantium*:



Hydrogenotrophe Methanbildung durch *Methanobrevibacter ruminantium*:



Glukoseabbau im Pansen (Summe aus den obigen Gleichungen. Syntrophe Interaktion der beiden Organismen):



4 blau: Glukosefermentation durch *R. flavefaciens* in Einzelkultur

3 gelb: Methanerzeugung aus Formiat durch *M. ruminantium*

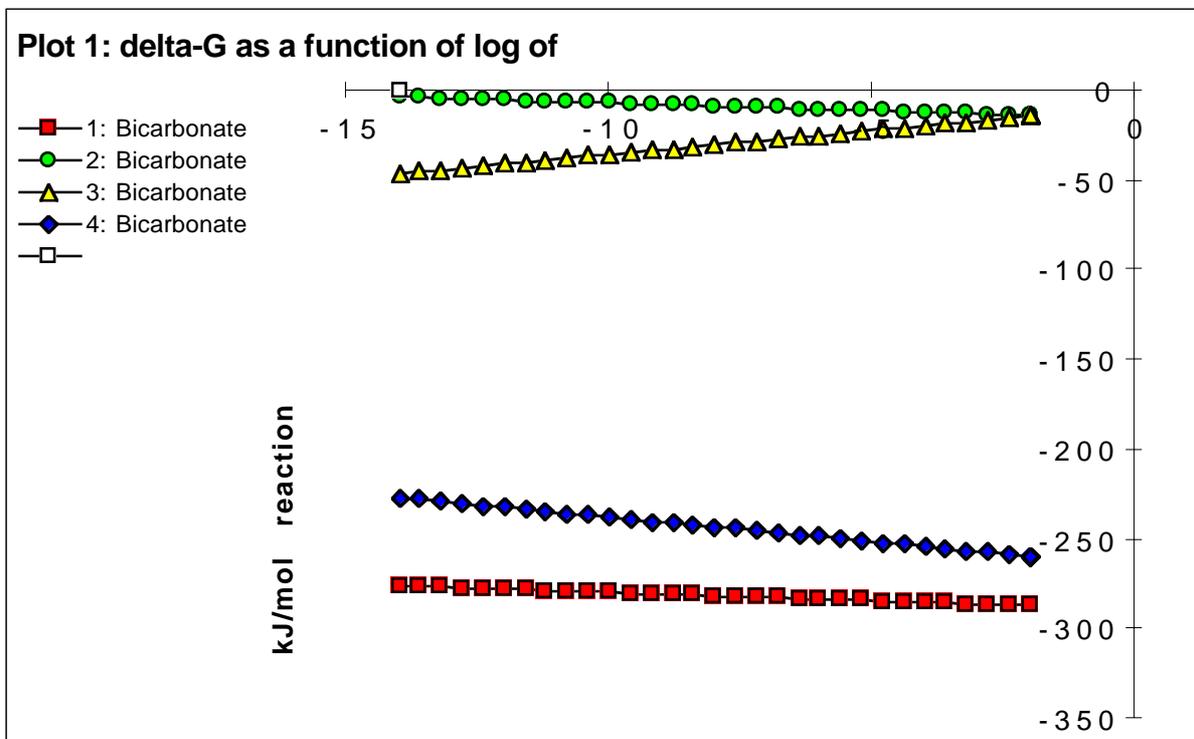
2 grün: Methanerzeugung aus Wasserstoff durch *M. ruminantium*

1 rot: Syntrophie zwischen *Ruminococcus flavefaciens* und *Methanobrevibacter ruminantium*, welcher Formiat und Wasserstoff weiter zu Methan umwandelt.

Die Darstellung der Reaktionen basiert auf den in der Kursanleitung empfohlenen Randbedingungen für Substrate und Produkteaktivitäten und sind in Abhängigkeit von Hydrogenkarbonat semilogarithmisch dargestellt.

Reaction No.	(S,P)	Stoich. Coeff.	Enter formula	State	Special remarks	Activity	Variable	Compound
4	s	1	CH <sub>2</sub> OH(CHOH) <sub>4</sub> CHO	aq		2,00E-04		a-D-Glucose
4	s	0,48	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	aq			√	Bicarbonate
4	p	1,07	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	aq		2,00E-02		Acetate
4	p	0,62	HCOO <sup>-</sup>	aq		2,00E-04		Formate
4	p	0,93	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (COO <sup>-</sup> ) <sub>2</sub>	aq		2,00E-02		Succinate
4	p	0,59	H <sub>2</sub>	aq		1,00E-05		Hydrogen
4	p	3,07	H <sup>+</sup>	aq		5,01E-07		Proton
4	p	0,34	H <sub>2</sub> O	l		1,00E+00		Water

Reaction No.	(S,P)	Stoich. Coeff.	Enter formula	State	Special remarks	Activity	Variable	Compound
3	s	0,62	HCOO-	aq		2,00E-04		Formate
3	s	0,16	H2O	l		1,00E+00		Water
3	s	0,16	H+	aq		5,01E-07		Proton
3	p	0,16	CH4	aq		1,00E-04		Methane
3	p	0,47	HCO3-	aq			v	Bicarbonate
2	s	0,59	H2	aq		1,00E-05		Hydrogen
2	s	0,15	HCO3-	aq			v	Bicarbonate
2	s	0,15	H+	aq		5,01E-07		Proton
2	p	0,15	CH4	aq		1,00E-04		Methane
2	p	0,44	H2O	l		1,00E+00		Water
1	s	1	CH2OH(CHOH)4CHO	aq		2,00E-04		a-D-Glucose
1	s	0,16	HCO3-	aq			v	Bicarbonate
1	p	1,07	CH3COO-	aq		2,00E-02		Acetate
1	p	0,93	(CH2)2(COO-)2	aq		2,00E-02		Succinate
1	p	0,3	CH4	aq		1,00E-04		Methane
1	p	2,77	H+	aq		5,01E-07		Proton
1	p	0,63	H2O	l		1,00E+00		Water



Auch bei Änderung der Hydrogenkarbonat-Konzentrationen bleiben alle Reaktionen im exergonischen Bereich – für alle also günstiges Milieu. Werden  $H_2$  und Formiat durch Mikroorganismen abgebaut, so erhöht sich der Energiegewinn des Glucoseabbaus durch *R. flavefaciens*, da der Überschuss an Substraten noch wichtiger wird, und somit  $\ln Q$  in der Gibb'schen Gleichung (S.1) noch negativer wird. Die methanproduzierenden Archäen begünstigen also die Energetik jener Prozesse, die aus dem Glukoseabbau zu Produkten führen, welche von der Kuh aufgenommen werden können.

**Anmerkungen:** (vergleiche auch Probleme 4 und 5)

Auch wenn die Konzentration einer anderen, in der Reaktion beteiligten Substanz, variiert wird, z.B. von Glukose, so ändert sich  $\Delta Gr$  nur geringfügig, dies auch bei grossen Konzentrationsänderungen. Die Reaktion bleibt immer deutlich exergonisch.

Der pH-Wert, also die  $H^+$  Konzentration, hat nur geringfügigen Einfluss auf  $\Delta Gr$ , und die Reaktion bleibt immer deutlich exergonisch.

Auf Grund der Ergebnisse aus diesen Simulationen, kann man erkennen, dass die metabolischen Reaktionen im Pansenökosystem thermodynamisch optimiert sind.

In der syntrophen Interaktion wird *R. flavefaciens* seine Stoffwechselrouten anpassen und unter günstigen Bedingungen weniger Elektronen via den reduktiven Zitronensäurezyklus in Succinat umwandeln, dafür mehr methanogen verwertbare Produkte produzieren (siehe Aufgabe 3b, Exp. 1).

Mit Thermodyn© können biochemische Prozesse verschiedenster Organismen untersucht werden. Voraussetzung dafür ist lediglich eine stöchiometrisch richtige Gleichung.