

Отношение стабильных изотопов углерода ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) служит важным фактором при оценке глобального баланса метана [Hornibrook et al., 2000]. При этом величина $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в значительной степени зависит от кинетического изотопного эффекта, связанного с метаболизмом микроорганизмов, которые производят и потребляют CH_4 . В статье предлагается динамическая модель процессов образования метана и его анаэробного окисления нитратом метанотрофными денитрифицирующими микроорганизмами (ДАОМ), что позволило оценить коэффициент фракционирования стабильных изотопов углерода. В эксперименте с торфом из минеротрофного болота [Steto, Yavitt, 2007], измерялась динамика количества метана и величины $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$. Предлагаемая нами модель показала, что введение нитрата приводит к медленному снижению парциального давления метана. Поскольку метан в процессе ДАОМ является субстратом, в исследуемой системе происходит обогащение метана более тяжелым углеродом ^{13}C . Это приводит к возрастанию величины $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$. Коэффициент фракционирования изотопов углерода в процессе окисления метана нитратом оказался равным 1.018 и сопоставимым с коэффициентом фракционирования изотопов углерода в процессе ацетокластического метаногенеза (1.01). Модельные расчеты показали, что кажущийся коэффициент фракционирования изотопов углерода α_c при одновременном образовании метана и ДАОМ в ходе инкубации медленно снижается. Отношение изотопов $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в растворенном и газообразном метане практически не отличаются.

Ключевые слова: образование метана, анаэробное окисление метана, микроорганизмы, нитрат, кинетический изотопный эффект

ВВЕДЕНИЕ

Метан является важным парниковым газом, а понимание механизмов, влияющих на образование метана и его окисление, является необходимым элементом для перехода от локальных к глобальным оценкам эмиссии метана в атмосферу [Bridgeham et al., 2013]. Целлюлоза является основным органическим веществом в большинстве природных экосистем [Lynd et al., 2002], трансформирующимся в метан и диоксид углерода. Отношение стабильных изотопов углерода ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) метана служит важным фактором при оценке глобального баланса метана [Hornibrook et al., 2000]. При этом величина $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в значительной степени зависит от кинетического изотопного эффекта, связанного с метаболизмом микроорганизмов, которые производят и потребляют CH_4 .

Кинетический изотопный эффект заключается в изменении скорости химической реакции при замене в молекуле реагирующего вещества какого-либо атома его изотопом [Галимов, 1973, с. 4]. При внесении поправок на кинетический изотопный эффект, взвешенная сумма отношений $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в метане, поступающем из воды различных водных объектов, должна быть равна отношению для атмосферного метана. Однако, в отдельных анаэробных средах часто встречается широкий диапазон значений $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$, что затрудняет оценку средней величины для каждого водного объекта. Одновременное протекание таких процессов как образование и окисление метана существенно сказывается на этой величине. Кроме того необходимо учитывать и кинетику окисления метана в воздухе, также влияющую на отношение $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в атмосферном метане. Понимание природы и причин изменений $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$ лежат в основе использования балансовых оценок изменений CH_4 в атмосфере [Hornibrook et al., 2000].

Поскольку в веществе 'тяжелого' изотопа много меньше, чем 'легкого', отношение изотопов обычно выражается [Craig, 1957] через установленные международные стандарты в промилях (‰):

$$\delta [‰] = 10^3 \left(\frac{R}{R_{std}} - 1 \right), \quad (1)$$

где R и R_{std} соотношения изотопов ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) в образце и стандарте.

Уравнение Релея [Rayleigh, 1898], изначально предложенное для описания фракционирования при диффузии смеси газов, применяется и для вычисления фракционирования стабильных изотопов:

$$R_t/R_0 = (S_t/S_0)^{(1/\alpha-1)}, \quad (2)$$

где R_0 и R_t , S_0 и S_t - отношение изотопов в субстрате и сама концентрация субстратов в начале реакции и в момент t , соответственно; α - коэффициент фракционирования изотопов при превращении субстрата в продукт в закрытой и полностью перемешиваемой системе. Уравнение (2) традиционно выводят, допуская справедливость реакции 1-го порядка по концентрации субстрата с легким и тяжелым изотопом. При этом коэффициент фракционирования изотопов определяется как

$$\alpha = k_{light}/k_{heavy}, \quad (3)$$

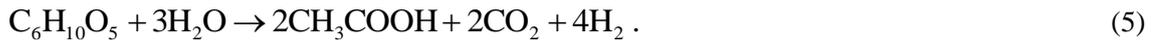
т.е. отношением констант скоростей реакции 1-го порядка для субстрата с легким и тяжелым изотопом. Реакция для субстрата с легким изотопом идет несколько быстрее, чем реакция с тяжелым изотопом. В ходе реакции величина α с хорошей точностью может считаться постоянной, что привело к общепринятому мнению о распространенности реакций 1-го порядка в изотопных превращениях. Однако, уравнение Релея, фактически, не описывает динамику процесса [Vavilin, Rytov, 2015].

Допуская, что концентрация субстрата с легким изотопом ^{12}C много больше концентрации субстрата с более тяжелым изотопом ^{13}C , уравнения фракционирования для субстрата, продуктов и микробной биомассы могут быть записаны как

$$\begin{aligned} \frac{d \ ^{13}\text{C}S}{dt} &\approx - \frac{1}{\alpha} \frac{^{13}\text{C}S}{S} \rho(S, B), \quad \frac{d \ ^{13}\text{C}P}{dt} \approx + \frac{1}{\alpha} \frac{^{13}\text{C}S}{S} (1 - Y) \rho(S, B), \\ \frac{d \ ^{13}\text{C}B}{dt} &\approx + \frac{1}{\alpha} \frac{^{13}\text{C}S}{S} Y \rho(S, B), \quad (4) \end{aligned}$$

где S, P, B - общие концентрации субстрата, продукта с поправкой на рост биомассы, и самой биомассы, содержащие как ^{12}C , так и ^{13}C ; $\rho(S, B)$ - скорость потребления субстрата биомассой, $^{13}\text{C}S, ^{13}\text{C}P, ^{13}\text{C}B$ - концентрация субстрата, продукта и биомассы с углеродом ^{13}C ; α - коэффициент фракционирования субстратов, содержащих изотопы ^{12}C и ^{13}C ; Y - экономический коэффициент, связанный с ростом биомассы и отражающий долю превращения субстрата в биомассу. Таким образом, динамика субстрата, продукта и биомассы с более тяжелым изотопом может быть выражена через динамику общего субстрата без рассмотрения его изотопного состава [Vavilin et al., 2017; Vavilin et al., 2018 (a, b)], а динамика фракционирования стабильных изотопов является следствием динамики химических и биологических процессов. Перераспределение стабильных изотопов позволяет уточнить метаболический путь утилизации субстрата и определить соответствующие кинетические параметры и коэффициенты фракционирования.

В процессе образования метана из целлюлозного материала $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ принимают участие несколько типов микроорганизмов, осуществляя деполимеризацию целлюлозы, ферментативный кислотогенез, ацетогенез и метаногенез. Основным продуктом ферментативного разложения целлюлозы являются моносахариды, которые в дальнейшем трансформируются в водород (H_2), диоксид углерода (CO_2) и летучие жирные кислоты (ЛЖК), такие как ацетат (CH_3COOH):



Основными субстратами для метаногенных микроорганизмов являются ацетат и водород+диоксид углерода, соответственно [Zinder, 1993]:

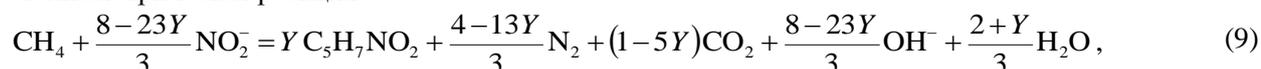


Из уравнений (5) – (7) следует, что вклад ацетокластического метаногенеза составляет 2/3 общей продукции метана [Conrad, 2005]. В работах [Vavilin et al, 2017; Vavilin et al, 2018 (a, b)] показано, что вклад ацетокластического метаногенеза существенно изменяется при значительной роли таких процессов как синтрофное окисление ацетата и гомоацетогенез. Поскольку фракционирование изотопов углерода в результате ацетокластического и водородотрофного метаногенеза резко отличаются, для определения доминирующего пути образования метана часто используется следующее выражение для величины кажущегося коэффициента фракционирования α_c [Whiticar, 1999]:

$$\alpha_c^{\text{app}} = \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} + 1000}{\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4} + 1000} \quad (8)$$

В работах [Vavilin et al., 2017; Vavilin et al., 2018 a] предложено математическое описание динамики превращения целлюлозы в метан и диоксид углерода в донных отложениях тропических озер и торфе бореального болота, включающее перераспределение стабильного изотопа ^{13}C .

Образование и окисление метана прокариотами рассматривается в обзоре [Каллистова и др., 2017]. Анаэробное окисление метана является важным процессом, контролирующим выход метана в атмосферу в морских и пресноводных экосистемах. Этот процесс протекает совместно с такими процессами как сульфат-редукция, денитрификация и восстановление трехвалентного железа [Bridgeham et al., 2013]. Внутриклеточный путь окисления метана и восстановления нитрита метанотрофной денитрифицирующей культурой *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* был открыт Этвиг и др. [Ettwig et al., 2010]. Разиграф и др. [Rasigraf et al., 2012] исследовали эту реакцию (DAOM), измеряя изотопы ^{13}C и ^2H . Вавилин и Рытов [2016] использовали их данные при моделировании процесса. Для математического описания использовалась следующая стехиометрическая реакция:



где Y - экономический коэффициент, отражающий частичный переход субстратов в биомассу. Функция Моно с двумя лимитирующими общую скорость субстратами применялась для описания роста биомассы, потребления субстратов (метан и нитрит) и формирования продуктов (азота и диоксида углерода) в соответствии с реакцией (9). Был учтен процесс массообмена метана и диоксида углерода в жидкой и газовой фазах также как и ингибирование повышенной концентрацией нитрита.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМЫ

Возможность и потенциальный механизм DAOM в некоторых северных омбротрофных и минеротрофных болотах обсуждается в работе Смемо и Явитта [Smemo, Yavitt, 2007]. В более поздней работе [Smemo, Yavitt, 2011] сообщается, что, не учитывая процессы анаэробного окисления метана, можно сильно завысить эмиссию метана в атмосферу. Основной целью нашей работы было развитие динамической модели DAOM в анаэробной системе, в которой одновременно идут процессы образования и окисления метана, опираясь на экспериментальные данные Смемо и Явитта [2007]. Так как микробиологические процессы идут в воде, а величина $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ измеряется обычно в газе (слишком малые величины растворенного метана), в предлагаемой математической модели был учтен массообмен CH_4 и CO_2 между газовой и жидкой фазами. Согласно модели, отношение изотопов $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в растворенном и газообразном метане практически не отличаются. В итоге, модель позволила оценить влияние различных параметров на процесс DAOM и определить коэффициент фракционирования стабильных изотопов углерода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные данные

Детальное описание экспериментов было дано ранее [Smemo, Yavitt, 2007]. Изучалось болото Michigan Hollow (штат Нью-Йорк, США), подпитываемое подземными водами (minerotrophic fen). Преобладающими видами растений были *Carex laucustris* и *Typha latifolia*. В ходе периодических экспериментов (шесть повторностей) при 25°C с 250 мл сосудом и объемом жидкости, содержащей торф с глубины 5-15 см, приблизительно равным 150 мл, измерялась динамика количества метана и величины $\delta^{13}\text{CH}_4$. Чтобы инициировать процесс DAOM, изначально в газовую фазу было введено некоторое количество метана, а в жидкую фазу добавлялся нитрат с начальной концентрацией 10 мМ. Контролем служил эксперимент без добавки нитрата.

Схема процесса образования метана и его окисления нитратом

Общая схема процесса образования метана и его окисления нитратом показана на рисунке 1. В применяемой ниже математической модели не рассматриваются процессы синтрофного окисления ацетата и гомоацетогенеза, представленные на рис. 1. В модели, для упрощения, применяется одна и та же формула микробной биомассы $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$ [Rittmann, McCarty, 2001] для различных микроорганизмов.

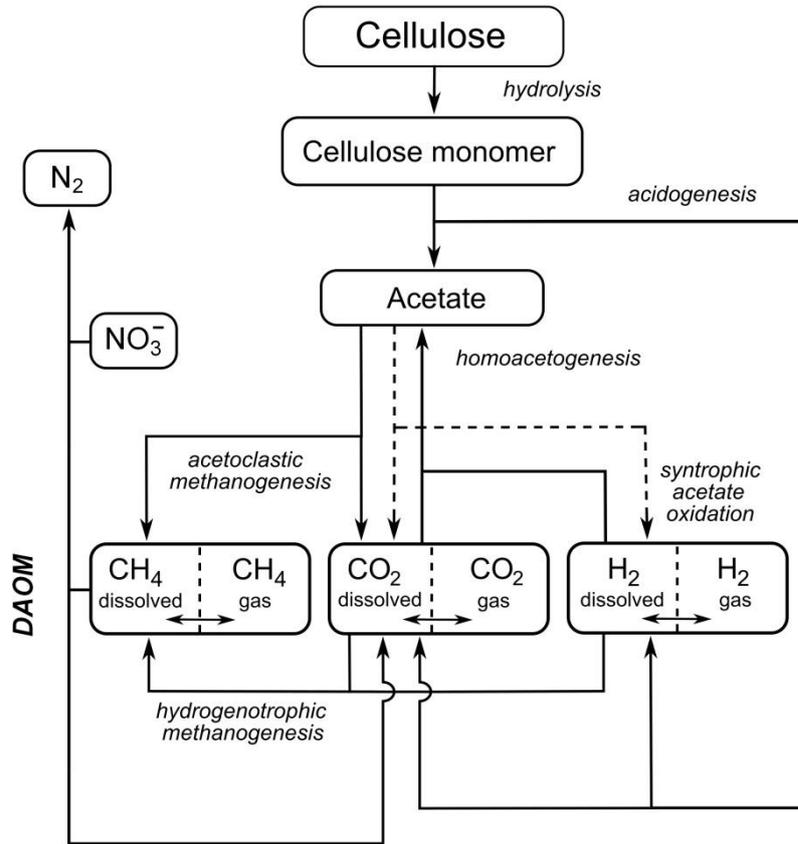


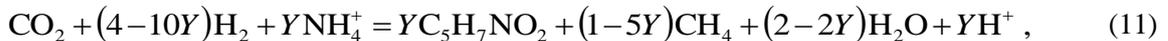
Рис. 1. Схема совместного образования метана из целлюлозы и анаэробного окисления метана нитратом (DAOM). Для исследуемой системы в математической модели процессы синтрофного окисления ацетата и гомоацетогенеза не рассматриваются.

Модель образования метана из целлюлозы

Использовалась динамическая модель, опубликованная ранее [Vavilin et al., 2017; Vavilin et al., 2018 (а, в)]. Чтобы описать процесс образования метана из ацетата, осуществляемого ацетокластическими метаногенами, рассматривалось стехиометрическое уравнение:



где стехиометрический коэффициент $(1 - 2.5Y)$ получается из равенства количества атомов химических элементов С, Н и О в правых и левых частях уравнения (10). Две группы ацетокластических метаногенов *Methanosarcina* и *Methanosaeta* использовались в модели для описания ацетокластического метаногенеза. Чтобы описать образование метана из диоксида углерода и водорода, осуществляемого водородотрофными метаногенами, рассматривалось стехиометрическое уравнение:



где стехиометрические коэффициенты $(4 - 10Y)$, $(1 - 5Y)$ и $(2 - 2Y)$ получаются из равенства количества атомов химических элементов С, Н и О в правых и левых частях уравнения (11).

Допуская, что концентрация аммония не лимитирует скорость ацетокластического метаногенеза, соответствующие функции Моно записываются в виде:

$$\rho_{Sar} = \rho_{mSar} B_{Sar} \frac{Ac}{K_{Sar} + Ac}, \quad (12)$$

$$\rho_{Sae} = \rho_{mSae} B_{Sae} \frac{Ac}{K_{Sae} + Ac}, \quad (13)$$

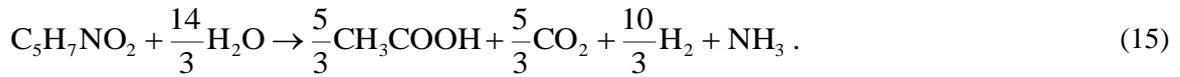
где Ac - концентрации ацетата; B_{Sar}, B_{Sae} - концентрации ацетокластических метаногенов *Methanosarcina* и *Methanosaeta* (известно, что они являются основными группами ацетокластических метаногенов: *Methanosarcina* доминирует при значительных концентрациях ацетата, а *Methanosaeta*

доминирует при небольших концентрациях ацетата); ρ_{mSar}, ρ_{mSae} - максимальные удельные скорости превращения ацетата в метан двумя группами ацетокластических метаногенов, соответственно; K_{Sar}, K_{Sae} - соответствующие константы полу-насыщения по концентрации ацетата. Для водородотрофного метаногенеза имеем

$$\rho_{meth}^{H_2/CO_2} = \rho_{mmeth}^{H_2/CO_2} B_{H_2-meth} \frac{H_2}{K_{H_2} + H_2} \frac{CO_2}{K_{CO_2} + CO_2}, \quad (14)$$

где H_2 и CO_2 - концентрации водорода и диоксида углерода, соответственно; B_{H_2-meth} - концентрация водородотрофных метаногенов; $\rho_{mmeth}^{H_2/CO_2}$ - максимальная удельная скорость превращения $H_2 + CO_2$ в метан водородотрофными метаногенами; K_{CO_2}, K_{H_2} - константы полу-насыщения по концентрации диоксида углерода и водорода.

Чтобы обеспечить общий материальный баланс (по углероду С) при образовании метана из целлюлозы, необходимо учесть процесс разложения неактивной биомассы и дальнейшего превращения ее в результате лизиса обратно в ацетат, диоксид углерода и водород:



В итоге, с учетом стехиометрических уравнений (5), (10), (11), (15), образование метана из целлюлозы, идущие в воде, описывается следующей системой дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{d Cel}{dt} &= -k_h Cel, \\ \frac{d Ac}{dt} &= 2k_h Cel + \frac{5}{3}k_{hB} B_{nv} - \rho_{Sar} - \rho_{Sae}, \\ \frac{d H_2}{dt} &= 4k_h Cel + \frac{10}{3}k_{hB} B_{nv} - (4-10Y_{H_2/CO_2})\rho_{meth}^{H_2/CO_2}, \\ \frac{d CO_2}{dt} &= 2k_h Cel + \frac{5}{3}k_{hB} B_{nv} + (1-2.5Y_{Sar})\rho_{Sar} + (1-2.5Y_{Sae})\rho_{Sae} - \rho_{meth}^{H_2/CO_2}, \\ \frac{d CH_4}{dt} &= (1-2.5Y_{Sar})\rho_{Sar} + (1-2.5Y_{Sae})\rho_{Sae} + (1-5Y_{H_2/CO_2})\rho_{meth}^{H_2/CO_2}, \\ \frac{d B_{Sar}}{dt} &= Y_{Sar}\rho_{Sar} - k_{dSar}B_{Sar}, \\ \frac{d B_{Sae}}{dt} &= Y_{Sae}\rho_{Sae} - k_{dSae}B_{Sae}, \\ \frac{d B_{H_2-meth}}{dt} &= Y_{H_2/CO_2}\rho_{meth}^{H_2/CO_2} - k_{dH_2-meth}B_{H_2-meth}, \\ \frac{d B_{nv}}{dt} &= -k_{hBnv}B_{nv} + k_{dSar}B_{Sar} + k_{dSae}B_{Sae} + k_{dH_2-meth}B_{H_2-meth}, \end{aligned} \quad (16)$$

где Cel, Ac, CH_4, H_2 и CO_2 - концентрации целлюлозы, ацетата, растворенных метана, водорода и диоксида углерода, соответственно; t - время; k_h - кинетическая константа реакции 1-го порядка для гидролиза целлюлозы, B_{nv} - концентрация неактивной биомассы; k_{hBnv} - константа скорости 1-го порядка в процессе лизиса неактивной биомассы; $k_{dSar}, k_{dSae}, k_{dH_2-meth}$ - соответствующие константы распада биомассы; $Y_{Sar}, Y_{Sae}, Y_{H_2/CO_2}$ - соответствующие экономические коэффициенты для ацетокластических метаногенов *Methanosarcina*, *Methanosaeta* и водородотрофных метаногенов. В модели (16) соблюдается баланс по общему углероду.

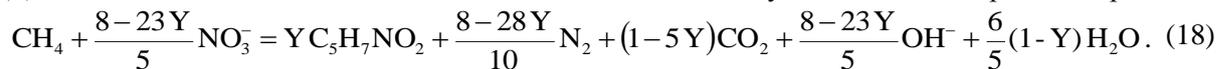
Наряду с традиционными переменными, содержащимися в системе (16), модель дополнительно включала и переменные, содержащие изотоп ^{13}C :

$$\begin{aligned}
\frac{d^{13C}Cel}{dt} &= -\frac{^{13C}Cel}{Cel} \frac{1}{\alpha_{Cel}} k_h Cel, \\
\frac{d^{13C}Ac}{dt} &= -\frac{^{13C}Ac}{Ac} \left(\frac{1}{\alpha_{AcOx}} \rho_{AcOx} + \frac{1}{\alpha_{Sar}} \rho_{Sar} + \frac{1}{\alpha_{Sae}} \rho_{Sae} \right) + \\
&\quad + 2 \frac{^{13C}Cel}{Cel} \frac{1}{\alpha_{Cel}} k_h Cel + \frac{5}{3} \frac{^{13C}B_{nv}}{B_{nv}} \frac{1}{\alpha_{B_{nv}}} k_{hB} B_{nv}, \\
\frac{d^{13CO_2}}{dt} &= 2 \frac{^{13C}Cel}{Cel} \frac{1}{\alpha_{Cel}} k_h Cel + \frac{^{13C}Ac}{Ac} \left(\frac{1}{\alpha_{Sar}} (1-2.5Y_{Sar}) \rho_{Sar} + \frac{1}{\alpha_{Sae}} (1-2.5Y_{Sae}) \rho_{Sae} \right) \\
&\quad + \left((2-5Y_{AcOx}) \frac{1}{\alpha_{AcOx}} \rho_{AcOx} \right) \\
&\quad - \frac{^{13CO_2}}{CO_2} \frac{1}{\alpha_{H_2/CO_2}} \rho_{meth} + \frac{5}{3} \frac{^{13C}B_{nv}}{B_{nv}} \frac{1}{\alpha_{B_{nv}}} k_{hB} B_{nv}, \\
\frac{d^{13CH_4}}{dt} &= \frac{^{13C}Ac}{Ac} \left(\frac{1}{\alpha_{Sar}} (1-2.5Y_{Sar}) \rho_{Sar} + \frac{1}{\alpha_{Sae}} (1-2.5Y_{Sae}) \rho_{Sae} \right) + \frac{^{13CO_2}}{CO_2} \frac{1}{\alpha_{H_2/CO_2}} (1-5Y_{H_2/CO_2}) \rho_{meth}^{H_2/CO_2}, \\
\frac{d^{13C}B_{Sar}}{dt} &= \frac{^{13C}Ac}{Ac} \frac{1}{\alpha_{Sar}} Y_{Sar} \rho_{Sar} - k_{dSar} ^{13C}B_{Sar}, \\
\frac{d^{13C}B_{Sae}}{dt} &= \frac{^{13C}Ac}{Ac} \frac{1}{\alpha_{Sae}} Y_{Sae} \rho_{Sae} - k_{dSae} ^{13C}B_{Sae}, \\
\frac{d^{13C}B_{AcOx}}{dt} &= \frac{^{13C}Ac}{Ac} \frac{1}{\alpha_{AcOx}} Y_{AcOx} \rho_{AcOx} - k_{dAcOx} ^{13C}B_{AcOx}, \\
\frac{d^{13C}B_{H_2/CO_2}}{dt} &= \frac{^{13CO_2}}{CO_2} \frac{1}{\alpha_{H_2/CO_2}} Y_{H_2/CO_2} \rho_{meth}^{H_2/CO_2} - k_{dH_2/CO_2} ^{13C}B_{H_2/CO_2}, \\
\frac{d^{13C}B_{nv}}{dt} &= -\frac{^{13C}B_{nv}}{B_{nv}} \frac{1}{\alpha_{B_{nv}}} k_{hB} B_{nv} + k_{dSar} ^{13C}B_{Sar} + k_{dSae} ^{13C}B_{Sae} + k_{dAcOx} ^{13C}B_{AcOx} + k_{dH_2/CO_2} ^{13C}B_{H_2/CO_2},
\end{aligned} \tag{17}$$

где $^{13C}B_{Sar}$, $^{13C}B_{Sae}$, $^{13C}B_{H_2-meth}$ и $^{13C}B_{nv}$ - концентрации 'более тяжелой' биомассы ацетатокластических метаногенов *Methanosarcina*, *Methanosaeta*, водородотрофных метаногенов и неактивной биомассы, содержащих 13C , соответственно; α_{Cel} , α_{Sar} , α_{Sae} , α_{AcOx} , α_{H_2/CO_2} , $\alpha_{B_{nv}}$ - коэффициенты изотопного фракционирования по углероду в процессе гидролиза и кислотогенеза, ацетокластического метаногенеза, водородотрофного метаногенеза и разложения неактивной биомассы. Отметим, что в модели, объединяющей (16) и (17), соблюдается баланс как общего углерода (C), так и его изотопа (13C), что позволяет корректно описывать их динамику.

Модель анаэробного окисления метана нитратом

Для математического описания ДАОМ использовалась следующая стехиометрическая реакция:



Функция Моно для АОМ с двумя лимитирующими общую скорость субстратами (растворенный метан и нитрат) была использована для описания роста биомассы, потребления субстрата и формирования продукта:

$$\rho_{AOM} = \rho_{mAOM} B_{AOM} \frac{CH_4}{K_{CH_4} + CH_4} \frac{NO_3^-}{K_{NO_3^-} + NO_3^-}, \tag{19}$$

где B_{AOM} - концентрация биомассы окисляющих метан микроорганизмов; CH_4 , NO_3^- - концентрации растворенных метана и нитрат-иона; ρ_{AOM} - скорость потребления метана; ρ_{mAOM} - максимальная удельная скорость потребления метана; K_{CH_4} , $K_{NO_3^-}$ - соответствующие константы полу-насыщения. В итоге, процесс DAOM описывался следующей системой уравнений:

$$\begin{aligned}\frac{dCH_4}{dt} &= -\rho_{AOM}, \\ \frac{dNO_3^-}{dt} &= -\frac{8-23Y_{AOM}}{5} \rho_{AOM}, \\ \frac{dCO_2}{dt} &= (1-5Y_{AOM}) \rho_{AOM}, \\ \frac{dN_2}{dt} &= \frac{8-28Y_{AOM}}{10} \rho_{AOM}, \\ \frac{dB_{AOM}}{dt} &= Y_{AOM} \rho_{AOM} - k_d B_{AOM},\end{aligned}\tag{20}$$

где N_2 , CO_2 - концентрации растворенных азота и диоксида углерода, соответственно; Y_{AOM} - экономический коэффициент, отражающий долю субстрата, переходящего в биомассу окисляющих метан микроорганизмов.

Изменение концентрации растворенного $^{13}C-CH_4$ в результате микробиологических реакций описывалось следующим уравнением:

$$\begin{aligned}\frac{d^{13}C-CH_4}{dt} &= \frac{^{13}C-Ac}{Ac} \frac{1}{\alpha_{Acetocl}} (1-2.5Y_{Acetocl}) \rho_{Acetocl} \\ &+ \frac{^{13}C-CO_2}{CO_2} \frac{I}{\alpha_{H_2/CO_2-meth}} (1-5Y_{H_2/CO_2-meth}) \rho_{meth} - \frac{^{13}C-CH_4}{CH_4} \frac{I}{\alpha_{AOM}} \rho_{AOM}.\end{aligned}\tag{21}$$

Таким образом, из (21) следует, что содержание ^{13}C в метане зависит от скоростей ацетокластического и водородотрофного метаногенеза, также как и скорости процесса DAOM. При этом, согласно (21), вклад этих процессов имеет разные знаки (в процессе метаногенеза метан является продуктом реакции, а в процессе DAOM - субстратом реакции). В математической модели был учтен также массообмен CH_4 , CO_2 и H_2 между газовой и жидкой фазами [Vavilin et al., 2018a]:

$$\begin{aligned}\frac{dP_{CO_2}}{dt} &= -K_{PCO_2} (k_{HCO_2} P_{CO_2} - CO_{2dis}) \frac{V_L}{V_G} \frac{V_M}{1000}, \\ \frac{dP_{CH_4}}{dt} &= -K_{PCH_4} (k_{HCH_4} P_{CH_4} - CH_{4dis}) \frac{V_L}{V_G} \frac{V_M}{1000}, \\ \frac{dP_{H_2}}{dt} &= -K_{PH_2} (k_{HH_2} P_{H_2} - H_{2dis}) \frac{V_L}{V_G} \frac{V_M}{1000},\end{aligned}\tag{22}$$

где K_P - соответствующие константы массообмена [1/сут], определяющие как быстро концентрация растворенного газа приближается к равновесному значению, и которые считались равными для всех газов, k_{HCO_2} , k_{HCH_4} , k_{HH_2} - константы Генри (35, 1,36 и 0,87 ммол/л бар) для CO_2 , CH_4 и H_2 , соответственно; P_{CO_2} , P_{CH_4} , P_{H_2} - парциальные давления CO_2 , CH_4 и H_2 ; CO_{2dis} , CH_{4dis} и H_{2dis} - концентрации растворенных газов; V_L/V_G - отношение объемов жидкой и газовой фазы в исследуемом инкубационном сосуде; V_M - объем одного моля газа в мл. Дополнительно рассматривался массообмен между растворенной и газообразной формами азота N_2 .

Для описания массообмена газов, содержащих изотоп ^{13}C ($^{13}CO_2$ и $^{13}CH_4$) рассматривались следующие уравнения:

$$\frac{dP_{^{13}\text{CO}_2}}{dt} = -\frac{I}{\alpha_{\text{exCO}_2}} K_L \left(k_{H\text{CO}_2} P_{^{13}\text{CO}_2\text{-gas}} - ^{13}\text{C}\text{CO}_{2\text{dis}} \right) \frac{V_L}{V_G} \frac{V_M}{1000}, \quad (23)$$

$$\frac{dP_{^{13}\text{CH}_4}}{dt} = -\frac{I}{\alpha_{\text{exCH}_4}} K_L \left(k_{H\text{CH}_4} P_{^{13}\text{CH}_4\text{-gas}} - ^{13}\text{C}\text{CH}_{4\text{dis}} \right) \frac{V_L}{V_G} \frac{V_M}{1000},$$

где α_{ex} – коэффициент фракционирования в процессе массообмена $^{13}\text{CO}_2$ и $^{13}\text{CH}_4$ в жидкой и газовой фазах. В системах уравнений (22) и (23) переменные $\text{CO}_{2\text{dis}}$, $\text{CH}_{4\text{dis}}$, $^{13}\text{CO}_{2\text{dis}}$, $^{13}\text{CH}_{4\text{dis}}$ означают концентрации растворенных газов и их изотопов.

Отношение изотопов ^{13}C и ^{12}C в целлюлозе, метане, диоксиде углерода, ацетате и биомассе вычислялось по формуле:

$$\delta^{13}\text{Q}[\text{‰}] = \left[\frac{^{13}\text{Q}/(\text{Q}-^{13}\text{Q})}{0.0112372} - 1 \right], \quad (24)$$

где ^{13}Q – концентрации обогащенных ^{13}C субстратов, продуктов и биомасс; Q – концентрации компонентов без рассмотрения их изотопного состава.

Вклад водородотрофного метаногенеза в общую продукцию метана рассчитывался по отношению:

$$f_C = \frac{\text{CH}_4^{\text{H}_2/\text{CO}_2}}{\text{CH}_4^{\text{H}_2/\text{CO}_2} + \text{CH}_4^{\text{Acetate}}}, \quad (25)$$

где $\text{CH}_4^{\text{H}_2/\text{CO}_2}$, $\text{CH}_4^{\text{Acetate}}$ количество метана, образовавшегося из H_2+CO_2 (11) и ацетата (10), соответственно.

Для решения системы дифференциальных уравнений, представленной выше, использовался решатель ode15s, в котором реализован многошаговый метод численного интегрирования переменного порядка (был использован 5 порядок) системы МАТЛАБ [MathWorks Inc., 1984]. Были заданы допустимые значения относительной (10^{-14}) и абсолютной (10^{-16}) погрешностей. Решатель был использован в режиме решения системы дифференциальных уравнений, записанных в явном виде.

Процесс калибровки модели состоял из двух этапов. На первом этапе использовались лишь экспериментальные данные для образующегося метана без рассмотрения его изотопного состава. Заметим, что найденные коэффициенты роста биомассы микроорганизмов и их распада не являются однозначными, поскольку концентрации биомассы микроорганизмов, как правило, не измеряются, а скорости утилизации субстратов (12)-(14), (19) зависят, прежде всего, от концентрации биомассы и максимальной удельной скорости потребления субстрата. При этом, чем выше начальная концентрация биомассы B_0 , тем меньшую величину нужно выбрать для максимальной удельной скорости потребления субстрата ρ_m . Характерные для анаэробных микробиологических процессов кинетические коэффициенты содержатся, в частности, в обобщающей работе [Batstone et al., 2002]. Ключевые параметры, используемые в предлагаемой модели, приведены в таблице 1. В модели концентрации рассчитывались в молях, затем они пересчитывались на г/л. На втором этапе калибровки использовались экспериментальные данные $\delta^{13}\text{CH}_4$. В результате определялись коэффициенты фракционирования изотопов α .

В виде приложения, статья дополнена двумя файлами (МАТЛАБ): 1) основным (main) с графическим представлением результатов вычислений и 2) подпрограммой (equations), содержащей сами уравнения. Это позволяет читателю непосредственно проводить анализ динамики процесса ДАОМ. Там же содержатся значения всех параметров и начальных условий переменных модели. Общее число переменных модели, включая изотопные переменные, составляет 30. Общее число параметров, включая начальные концентрации переменных, достигает 70. Размерности переменных и параметров динамической модели, близкой к применяемой в настоящей статье, приведены в недавно опубликованной статье [Vavilin et al., 2018b]. Там же представлена и матричная форма модели.

Таблица 1. Ключевые параметры (μ_m , ρ_m , K_S) и начальные концентрации биомассы B_0 математической модели, описывающие образование и анаэробное окисление метана в инкубациях с минеротрофным торфом. При моделировании для концентраций использовались единицы мол/л. В соответствии с экспериментальными данными, затем они пересчитывались в весовые единицы.

Процесс	B_0 , г/л	*Константы скорости	K_S , мг/л	** α_C
---------	-------------	---------------------	--------------	---------------

		$k_h, \text{сут}^{-1}$		
		$\mu_m = \rho_m Y, \text{сут}^{-1}$		
Гидролиз и кислотогенез целлюлозы		$k_h=0.012$		1.003
Ацетокластический метаногенез**	7.3×10^{-3}	0.02	0.2	1.01
Водородотрофный метаногенез	1.1×10^{-3}	0.1075	$2 \times 10^{-8} (\text{H}_2)$	1.075
АОМ	1.4×10^{-2}	0.014	1.6×10^{-3} (CH_4)	1.018

* В модели для всех групп биомассы использовались одинаковые экономические коэффициенты Y , равные $0.025 \text{ мол мол}^{-1}$, и коэффициент распада биомассы k_d , равный $0.04 \mu_m$;

** В последнем столбце указаны факторы фракционирования изотопов углерода (α_C) для отдельных процессов гидролиза/кислотогенеза, ацетокластического и водородотрофного метаногенеза и анаэробного окисления метана, соответственно;

*** Для расчетов в модели предполагалась лишь одна группа ацетокластических метаногенов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика микробиологических процессов представлена на рисунке 2. Разложение целлюлозы, описываемое простой реакцией 1-го порядка, происходит медленно (рис. 2а). Поскольку концентрации биомассы ацетокластических метаногенов и водородотрофных метаногенов значительны (рис. 2е), текущие концентрации ацетата и растворенного водорода малы (рис. 2а, 2с). В этом случае скорость образования метана определяется скоростью гидролиза целлюлозы. В отсутствие нитрата концентрация растворенного метана линейно увеличивается (рис. 2с), соответственно, линейно увеличивается и давление метана (рис. 2г). Поскольку метан в этом случае является продуктом реакции, величина $\delta^{13}\text{CH}_4$ уменьшается (рис. 2h), из-за того что более тяжелый углерод ^{13}C остается в субстрате (целлюлоза) и частично переходит в биомассу микроорганизмов (не представлено в рис. 2). Доля водородотрофного метаногенеза в образовании метана в конце процесса приближается к классическому соотношению 1/3 (рис. 2i), поскольку в модели не учитывались такие процессы, как синтрофное окисление ацетата и гомоацетогенез.

Введение нитрата приводит к доминированию скорости реакции DAOM (18) над скоростью многоступенчатого процесса образования метана из целлюлозы. Концентрация нитрата в исследуемом интервале времени линейно снижается, тогда как парциальное давление метана и концентрация растворенного метана снижаются медленно (рис. 2d, 2г, 2с).

Поскольку метан в процессе его анаэробного окисления нитратом является субстратом, величина $\delta^{13}\text{CH}_4$ увеличивается (рис. 2h). Согласно (19), скорость DAOM при уменьшении концентрации нитрата снижается, что приводит к замедлению процесса фракционирования и увеличения $\delta^{13}\text{CH}_4$ (рис. 2h). Величина кажущегося коэффициента фракционирования α_C (8) снижается (рис. 2f). Таким образом, по результатам инкубационных экспериментов и вычисления кажущегося коэффициента фракционирования можно определить влияет ли процесс анаэробного окисления метана на его образование. Коэффициент фракционирования изотопов углерода в процессе окисления метана нитратом равен 1.018, что сопоставимо с коэффициентом фракционирования изотопов углерода в процессе ацетокластического метаногенеза, равным 1.01 [Penning et al., 2006]. При этом коэффициент фракционирования изотопов углерода в процессе водородотрофного метаногенеза много больше (1.075) [Whiticar, 1999], чем таковой для ацетокластического метаногенеза.

Как уже отмечалось выше, используемая динамическая модель имеет большое число переменных и параметров. Калибровка модели осуществлялась в 2 этапа. При этом на 1-м этапе калибровалась модель без рассмотрения изотопного состава переменных модели. Значения

изотопных переменных составляют около 1% значений обычных переменных. Согласно динамической модели, оценка изменений изотопных переменных позволяет сравнивать доминирование тех или иных процессов (в нашем случае, процессов анаэробного образования метана и его окисления). В соответствии с (21), изменение концентрации более тяжелого метана $^{13}\text{CH}_4$ зависит от коэффициентов фракционирования изотопов углерода в процессах образования метана и его окисления. Модель показала, что при описании динамики $^{13}\text{CH}_4$ наиболее чувствительным параметром является коэффициент фракционирования в процессе DAOM (рис. 3). Из рис. 3 следует, что для коэффициента $\alpha_C^{DAOM} = 1.018$ значимой является третья цифра после точки. Еще раз подчеркнем, что изменение скорости реакции в результате кинетического изотопного эффекта составляет небольшую величину.

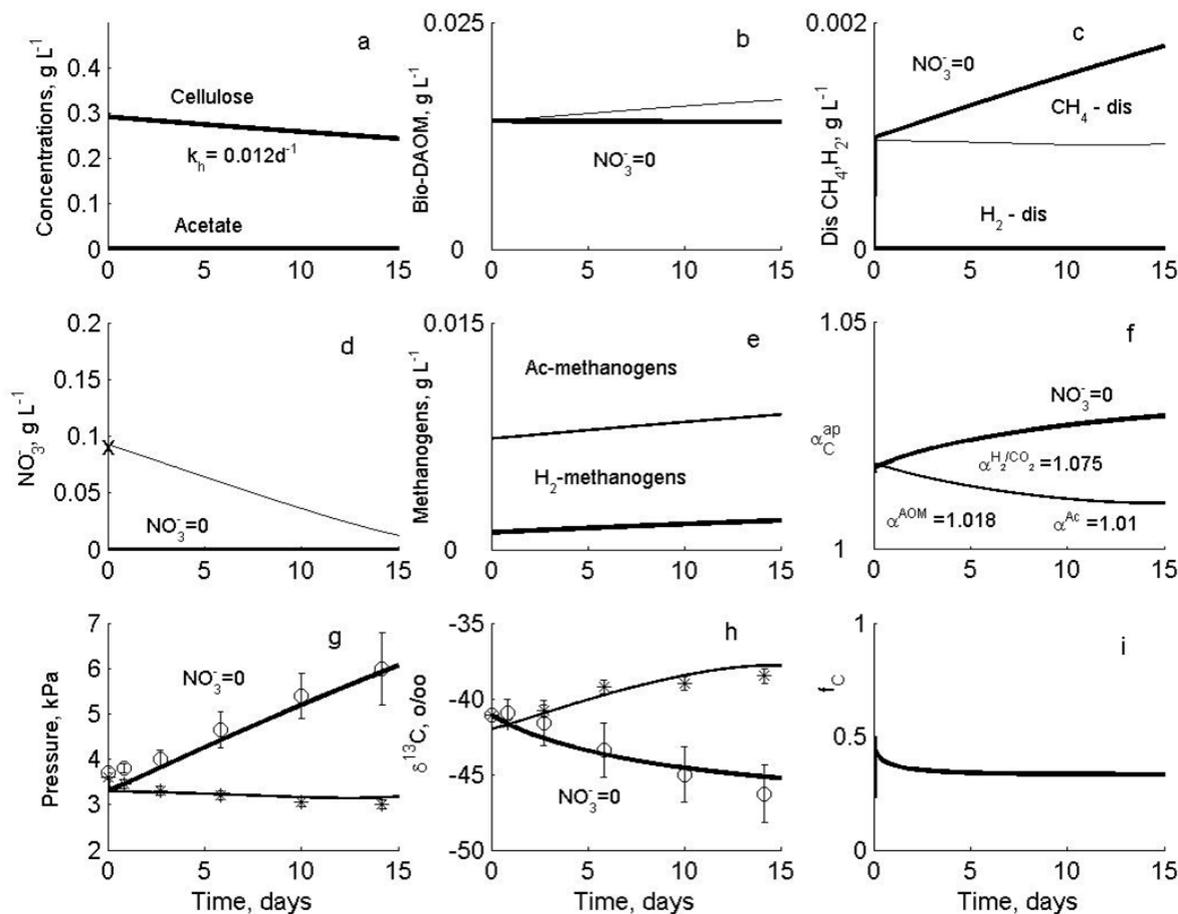


Рис. 2. Динамика анаэробного окисления метана нитратом. Символы: эксперимент [Smemo, Yavitt, 2007]; кривые: динамическая модель в отсутствии и присутствии нитрата. Ключевые кинетические коэффициенты представлены в Табл. 1. Толстыми линиями показана динамика системы в отсутствии нитрата (рис. 2b, 2c, 2f, 2g и 2h). Принимается, что превращение целлюлозы в метан идет одинаково в присутствии и отсутствии нитрата (рис. 2a, 2e, 2i).

Условные обозначения: 'a': концентрации целлюлозы и ацетата; 'b': концентрация биомассы анаэробных метаноокисляющих микроорганизмов; 'c': концентрация растворенного метана и водорода; 'd': концентрация нитрата; 'e': концентрация биомассы ацетокластических и водородотрофных метаногенов; 'f': кажущийся коэффициент фракционирования стабильного углерода (δ); 'g': парциальное давление метана; 'h': отношение изотопов ^{13}C и ^{12}C в метане в промилях (‰); 'i': доля водородотрофного метаногенеза в общей продукции метана (25).

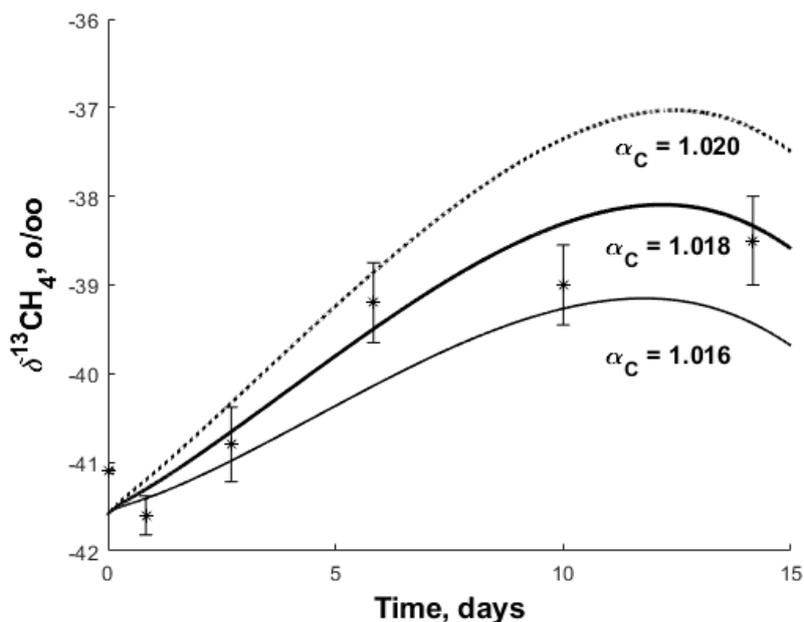


Рис. 3. Динамика величины $\delta^{13}\text{C} - \text{CH}_4$ при разных значениях коэффициента фракционирования α_C^{DAOM} .

Согласно модели, увеличение начальной концентрации нитрата увеличивает скорость DAOM, что приводит к уменьшению концентрации растворенного метана и парциального давления метана. При этом величина $\delta^{13}\text{CH}_4$ возрастает. В ходе инкубации концентрация растворенного нитрата лимитирует общую скорость процесса DAOM. Концентрация нитрата линейно снижается (рис. 2d), а концентрация растворенного метана изменяется незначительно (рис. 2c). Лишь в конце инкубации при небольшой концентрации нитрата скорость образования метана из целлюлозы начинает превалировать над скоростью потребления метана в результате DAOM. При этом парциальное давление метана, и, соответственно, концентрация растворенного метана начинают увеличиваться (рис. 2g, 2c). Начинает уменьшаться и величина $\delta^{13}\text{CH}_4$ (рис. 2h). В полевых исследованиях Ши и др. [Shi et al., 2017] показали, что присутствие DAOM в торфяниках, в которые проникают удобрения, может контролироваться количеством применяемого нитрата и глубиной проникновения его в бескислородный слой.

Согласно Ноксу с соавторами [Кнох et al., 1992], отношение изотопов $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в растворенном и газообразном метане практически не отличаются. Математическая модель подтвердила это (рис. 4). В уравнениях (23) фактор фракционирования $\alpha_{ex\text{CH}_4}$ в процессе массообмена был малым (0.001). Таким образом, основное фракционирование изотопов углерода происходит в результате микробиологических процессов и, прежде всего, в процессе DAOM.

Ранее, Смето и Явитт [Smemo, Yavitt, 2007] в своих расчетах применили модель смешения метана, добавленного в начале процесса с метаном, образующимся биологически. При этом допускалось, что в ходе процесса анаэробного окисления метана нитратом фракционирование изотопов углерода не происходит. Используя экспериментальные данные Смето и Явитта, приближенная оценка фракционирования, проведенная нами с помощью динамической модели, показала, что коэффициент фракционирования изотопов углерода в процессе окисления метана нитратом является значимым (1.018). Согласно Вавилину и Рытову [2016], коэффициент фракционирования изотопов углерода в процессе окисления метана нитритом равен 1.032.

ВЫВОДЫ

Для описываемого эксперимента в ходе одновременного образования метана из целлюлозы и его анаэробного окисления нитратом превалирует процесс анаэробного окисления метана. В ходе инкубации концентрация растворенного нитрата лимитирует общую скорость процесса DAOM.

Поскольку метан для DAOM является субстратом, в исследуемой системе идет обогащение метана более тяжелым углеродом ^{13}C , что приводит к возрастанию величины $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$. В отличие от работы [Smemo, Yavitt, 2007], приближенная оценка фракционирования, проведенная с помощью динамической модели, показала, что коэффициент фракционирования изотопов углерода в процессе окисления метана нитратом является значимым (1.018) и сопоставимым с коэффициентом фракционирования для ацетокластического метаногенеза (1.01), используемых при расчетах. Он много меньше соответствующего коэффициента фракционирования для водородотрофного метаногенеза (1.075). По результатам инкубационных экспериментов и вычисления кажущегося коэффициента фракционирования изотопов углерода в метане можно определить влияет ли процесс анаэробного окисления метана на его образование.

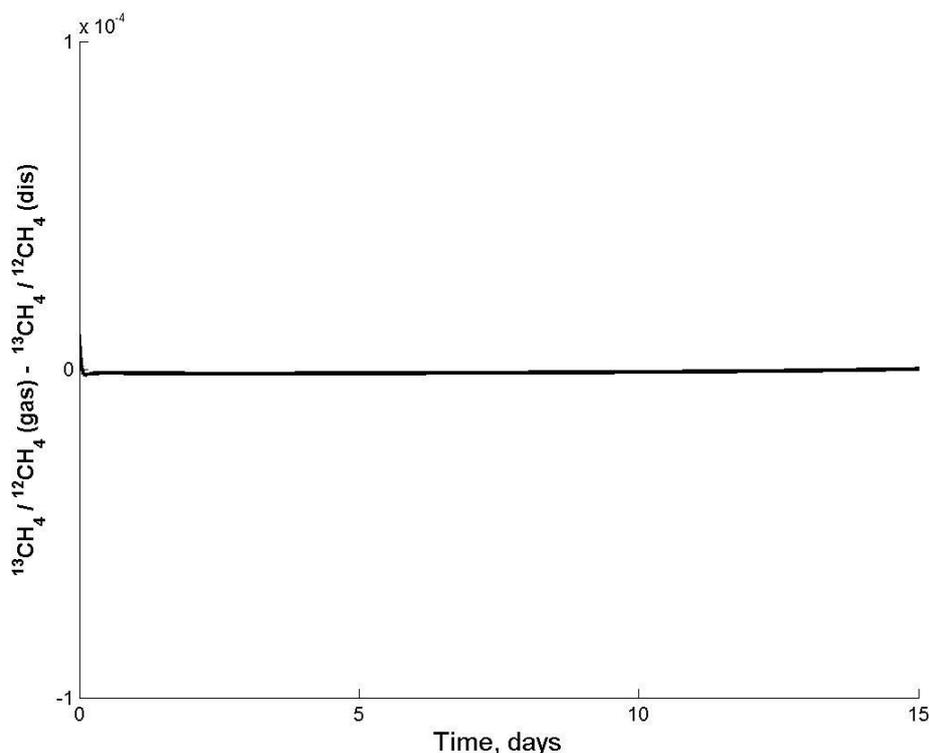


Рис. 4. Отношение изотопов ^{13}C и ^{12}C для растворенного и газообразного метана в инкубационном эксперименте.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена по плану НИР ИВП РАН АААА-А18-118022090104-8.

ЛИТЕРАТУРА

- Вавилин В.А., Рытов С.В. 2016. Ингибирование нитрит-ионом в процессе анаэробного окисления метана микроорганизмами и динамика фракционирования стабильных изотопов углерода и водорода // Водные Ресурсы. Т. 43. № 4. С. 426-430.
- Галимов Э.М. 1973. Изотопы углерода в нефтегазовой геологии. Москва: Наука. 384 с.
- Каллистова А.Ю., Меркель А.Ю., Тарногвецкий И.Ю., Пименов Н.В. 2017. Образование и окисление метана прокариотами // Микробиология. Т. 86. № 6. С. 661-683.
- Batstone D.J., Keller J., Angelidaki I., Kalyuzhnyi S.V., Pavlosthatiss S.G., Rozzi A., Sanders W.T.M., Siegrist H., Vavilin V.A. 2002. Anaerobic Digestion Model No.1 (ADM1). IWA Press. Padstow, Cornwall, UK: TJ International (Ltd), 77 p.

- Bridgham R.D., Cadillo-Quiroz H., Keller J.K., Zhuang Q. 2013. Methane emissions from wetlands: biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales // *Glob. Change Biol.* V. 19. P. 1325-1346.
- Conrad R. 2005. Quantification of methanogenic pathways using stable carbon isotopic signatures: a review and a proposal // *Organ. Geochem.* V. 36. P. 739-752.
- Craig H. 1957. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide // *Geochim. Cosmochim. Acta.* V. 12. P. 133-149.
- Ettwig K.F., Butler M.K., Le Paslier D., Pelletier E., Mangenot S., Kuypers M.M.M., Schreiber F., Dutilh B.E., Zedelius J., de Beer D., Gloerich J., Wessels H.J.C.T., van Alen T., Luesken F., Wu M.L., van de Pas-Schoonen K.T., Op den Camp H.J.M., Janssen-Megens E.M., Francoijs K.J., Stunnenberg H.K., Weissenbach J., Jetten M.M., Strous M. 2010. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria // *Nature.* V. 464. P. 543-550.
- Hornibrook E.R.C., Longstaffe F.J., Fyfe W.S. 2000. Evolution of stable carbon isotope compositions for methane and carbon dioxide in freshwater wetlands and other anaerobic environments // *Geochim. Cosmochim. Acta.* V. 64. P. 1013-1027.
- Knox M, Quay P.D., Wilbur D. 1992. Kinetic isotopic fractionation during air-water gas transfer of O₂, N₂, CH₄, and H₂ // *Journal of Geophys. Res.* V. 97(C12). P. 20335-20343.
- Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology // *Microbiol. Molecul. Biol. Rev.* V. 66. P. 506-577.
- MathWorks Inc. 1984. The MathWorks, Inc. Natick, Massachusetts 01760 USA: www.matworks.com.
- Penning H, Claus P, Casper P, Conrad R. 2006. Carbon isotope fractionation during acetoclastic methanogenesis by *Methanosaeta concilii* in culture and lake sediment // *Appl. Environ. Microbiol.* V. 72. P. 5648-5652.
- Rasigraf O., Vogt C., Richnow H.H., Jetten M.S.M., Ettwig K.F. 2012. Carbon and hydrogen isotope fractionation during nitrite-dependent anaerobic methane oxidation by *Methylomirabilis oxyfera* // *Geochim. Cosmochim. Acta.* V. 89. P. 256-264.
- Rayleigh J.W.C. 1896. Theoretical consideration respecting the separation of gases by diffusion and similar processes // *Philos. Mag.* V. 42. P. 493-498.
- Rittmann B.E., McCarty P.L. 2001. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. New York: McGraw-Hill. 768 p.
- Smemo K.A., Yavitt J.B. 2007. Evidence for anaerobic CH₄ oxidation in freshwater peatlands // *Geomicrobiol. J.* V. 24. P. 583-597.
- Smemo K.A., Yavitt J.B. 2011. Anaerobic oxidation of methane: an underappreciated aspect of methane cycling in peatland ecosystems? // *Biogeosciences.* V. 8. P. 779-793.
- Shi Y., Wang Z., He C., Zhang X., Sheng L., Ren X., 2017. Using ¹³C isotopes to explore denitrification-dependent anaerobic methane oxidation in paddy-peatland // *Nature Publ. Group. Sci. Rep.* V. 7. N 40848. Doi: 10.1038/srep40848.
- Vavilin V.A., Rytov S.V. 2015. Nitrate denitrification with nitrite or nitrous oxide as intermediate products: Stoichiometry, kinetics and dynamics of stable isotope signatures // *Chemosphere.* V. 134. P. 417-426.
- Vavilin V.A., Rytov S.V., Conrad R. 2017. Modelling methane formation in sediments of tropical lakes focusing on syntrophic acetate oxidation: Dynamic and static isotope equations // *Ecol. Modell.* V. 363. P. 81-95.
- Vavilin V.A., Rytov S.V., Lokshina L.Y. 2018a. Modelling the specific pathway of CH₄ and CO₂ formation using carbon isotope fractionation: an example for a boreal mesotrophic fen // *Isotope Env. Health Studies.* V. 54. P. 475-493.
- Vavilin V.A., Rytov S.V., Lokshina L.Y. 2018b. Dynamic isotope equations for ¹³CH₄ and ¹³CO₂ describing methane formation with a focus on the effect of anaerobic respiration in sediments of some tropical lakes // *Ecol. Modell.* V. 386. P. 59-70.
- Whiticar M.J. 1999. Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane // *Chem. Geology.* V. 161. P. 291-314.
- Zinder S.H. 1993. In: *Methanogenesis, Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics* (ed. J.G. Ferry), New York: Chapman & Hall.