



دانشکده علوم پایه و کشاورزی

مرکز تهران شرق

پایان نامه

برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد

رشته ریاضی کاربردی

گروه ریاضی

عنوان پایان نامه:

تئوری مدل سازی و آنالیز فرآیند های زیستی

مبتنی بر مهار تولید و اثر تکانه ای

فرناز فرزادنیا

استاد راهنما: دکتر محمدرضا پیغامی

استاد مشاور: دکتر شهریار فرهمند راد

فروردین ۹۱

چکیده

این کار یکی از مدل های ریاضی از فرآیند های زیستی با مهار تولید و اثر تکانه ای را ارائه می نماید. برای شروع، به کمک یک مثال، مدل ریاضی فرآیند زیستی با مهار تولید و اثر تکانه ای را فرموله می کنیم. سپس بر اساس مدل، به بررسی آنالیز پایداری فرآیند زیستی می پردازیم. در این جا تناوب نوسانی محصول را نیز محاسبه می کنیم که یک چهارچوب زمانی دقیقی برای فرآیند زیستی منظم می باشد. با محاسبه تناوب نوسانی، به یک خروجی پایدار دست می یابیم که معادل با آن فرآیند زیستی با اثر تکانه ای، در محیط تولید یکسان است. به علاوه، بهینه سازی فرآیند تولید با توجه به پارامتر های موزون بررسی می شود. شبیه سازی های عددی که از اطلاعات بیولوژیکی استفاده شده به منظور توضیح نتایج اصلی ارائه شده اند.

واژگان کلیدی: فرآیند زیستی با اثر تکانه ای، بهینه سازی، جواب متناوب، مهار محصول، پایداری.

فهرست مندرجات

۱	مقدمه
۴	۱ پیش نیاز ها و تعاریف
۵	۱-۱ مفاهیم زیست شناسی
۱۴	۲-۱ مفاهیم ریاضی
۲۱	۳-۱ مفاهیم آماری
۲۴	۴-۱ مروری بر الگوریتم ژنتیک
۳۰	۲ معادلات دیفرانسیل تکانه ای
۳۱	۱-۲ وجود جواب تناوبی دستگاه (۷-۱)
۳۴	۲-۲ وجود جواب متناوب از مرتبه اول
۳۶	۳-۲ مکان وجود جواب متناوب مرتبه اول
۳۸	۴-۲ پایداری جواب متناوب از مرتبه اول
۴۱	۵-۲ جواب متناوب از مرتبه دو
۴۴	۳ مدل سازی
۴۱	۱-۳ مدل سازی اولیه
۴۷	۲-۳ تخمین پارامتر های مدل
۵۲	۳-۳ آنالیز حساسیت
۵۵	۴-۳ بررسی پویایی دستگاه (۱۹-۳)
۶۵	۴ بهینه سازی
۶۶	۱-۴ شبیه سازی و نتایج آن
۷۱	۲-۴ بهینه سازی فرآیند زیستی

۸۷	نتیجه گیری و پیشنهادات	۵
۸۸.....	نتیجه گیری.....	۱-۵
۸۹.....	پیشنهادات.....	۲-۵
۹۰.....	پیوست (الف) اثبات قضیه	
۹۳.....	پیوست (ب) برنامه های MATLAB.....	
۹۸.....	پیوست (ج) جدول توزیع F.....	
۱۰۰	مراجع	
۱۰۴	واژه نامه فارسی به انگلیسی	
۱۰۸	چکیده انگلیسی	

لیست جداول و اشکال

- جدول ۳-۱) مقادیر اولیه و پارامتری از نتایج بونا و موزر..... ۴۹
- جدول ۳-۲) داده ها و پارامتر های جنبشی در مدل خان..... ۵۰
- جدول ۳-۳) تغییر درصدی در محاسبه تولید LGA ۵۳
- جدول ۴-۱) میزان زاد و ولد در الگوریتم ژنتیک..... ۸۱-۸۶
- شکل ۱-۱) تاثیر غلظت گلوکز اولیه بر روی کورینه باکتریوم گلوتامسیوم..... ۷
- شکل ۱-۲) تاثیر غلظت گلوکز اولیه بر روی رشد کورینه باکتریوم گلوتامسیوم..... ۸
- شکل ۱-۳) تاثیر غلظت سوبسترای اولیه بر روی رشد کورینه باکتریوم گلوتامسیوم..... ۸
- شکل ۱-۴) تاثیر غلظت محصول (ال- گلوتامیک اسید) بر روی نرخ رشد کورینه باکتریوم گلوتامسیوم..... ۹
- شکل ۱-۵) غلظت اکسیژن حل نشده در مقابل زمان. نقاطی که شیب افزایش DOC..... ۱۱
- شکل ۱-۶) رفتار غیر مونودی بین نرخ رشد ویژه و غلظت سوبسترا، داده های تجربی و شبیه سازی..... ۱۱
- شکل ۱-۷) شکل نمادین از فرآیند بیوسیستم سی-گلوتامسیوم..... ۱۳
- شکل ۱-۸) ثابت چرخه ای..... ۱۹

- شکل ۹-۱) ثابت چرخه ای مماسی، جایی که σ برای "فاز مماسی" مناسب است..... ۲۰
- شکل ۱۰-۱) نمودار چگالی توزیع F ۲۳
- شکل ۱۱-۱) دیاگرام بلوکی الگوریتم ژنتیکی ساده..... ۲۹
- شکل ۱-۲) توضیح دستگاه (۷-۱)..... ۳۶
- شکل ۱-۳) نمایی از شبیه سازی بر اساس مدل نهار محصول با داده های بونا و موزر..... ۴۹
- شکل ۲-۳) نمایی از شبیه سازی برای رشد سی - گلوتامسیوم با داده های خان..... ۵۰
- شکل ۳-۳) شبیه سازی از داده های تجربی گرفته از بونا و موزر..... ۵۱
- شکل ۴-۳) شبیه سازی از داده های تجربی بر گرفته از خان و همکارانش..... ۵۲
- شکل ۱-۴) معرفی قضیه ۱-۴-۳ از حالت ناپایدار..... ۶۷
- شکل ۲-۴) معرفی قضیه ۱-۴-۳ از حالت پایدار..... ۶۸
- شکل ۳-۴) نتایج شبیه سازی از ابتدای فرآیند تا اولین برداشت از محیط کشت..... ۶۹
- شکل ۴-۴) معرفی قضیه ۱-۴-۳ از رفتار مجانبی..... ۷۰
- شکل ۵-۴) حساسیت T به K_P و K_S ۷۲

شکل ۴-۶) وابستگی $PROD_{out}$ به W_f و S_F ۷۲

شکل ۴-۷) وابستگی $PROD_{out}$ به W_f ۷۳

شکل ۴-۸) وابستگی $PROD_{out}$ به K_p و K_S ۷۴

شکل ۴-۹) موثرترین متغیر ۸۰

شکل ۴-۱۰) میزان مقدار تابع بهینه و متغیر های آن ۸۰

شکل الف-۱) توضیح (۱-۷) ۹۲

شکل ب-۱) میزان اثر متغیر ها در تابع $F(W_f, P_{set}, S_F)$ ۹۵

شکل ب-۲) مقدار تابع $F(W_f, P_{set}, S_F)$ ۹۵

فهرست علائم

K_{ipx} ثابت مهار رشد برای محصول (g/l)

K_S ثابت رشد مونود برای سوبسترا (g/l)

$K_{P/S}$ ثابت محصول مونود برای سوبسترا (g/l)

K_r ثابت رشد مونود برای غلظت ویژه بیوتن (g/l)

m_s پایداری سلولی (h^{-1})

P غلظت محصول (ال - گلوتامیک اسید) (g/l)

P_{max} ماکزیمم غلظت محصول (g/l)

P_{set} آستانه غلظت محصول (g/l)

$q_{p,max}$ نرخ ویژه ماکزیمال محصول (h^{-1})

S غلظت سوبسترا (گلوکز) (g/l)

X غلظت بیومس (g/l)

t(h) زمان

T(h) تناوب چرخه نوسانی محصول

$Y_{X/S}$ (g/g) ضریب محصول بیومس به سوبسترا

$Y_{P/S}$ (g/g) ضریب محصول تولید به سوبسترا

$Y_{P/X}$ (g/g) ضریب محصول تولید به بیومس

$\frac{dX}{dt}$ (g/h) نرخ رشد بیومس

$\frac{dS}{dt}$(g/h) نرخ مصرف سوبسترا

$\frac{dP}{dt}$(g/h) نرخ تولید محصول

EPD انحراف نقاط پایانی

$SSWR$ مجموع مربعات وزن ها

حروف یونانی

α ضریب شکل دهی محصول متناظر رشد (g/g)

β ضریب شکل دهی محصول متناظر غیر رشد (g/g)

μ(h⁻¹) نرخ رشد ویژه

μ_{max}(h⁻¹) نرخ رشد ویژه ماکزیمال

λ($\lambda = -Y_{P/S}Y_{P/X}Y_{X/S}/Y_{P/S} + Y_{P/X}Y_{X/S}$) ثابت مثبت حقیقی

مقدمه

ریاضیات زیستی، یک حوزه بین رشته ای از مطالعات آکادمیک است که فرآیند های زیستی را با استفاده از ابزار ها و روش ها، مدل سازی می کند. این رشته هم کاربرد نظری و هم کاربرد علمی در تحقیقات بیولوژیکی داشته که اغلب با همکاری بین ریاضی دانان، فیزیک دانان، زیست شناسان، پزشکان، جانورشناسان، شیمی دانان و .. انجام می گیرد. تحقیق در زیست شناسی غالباً بر پایه آزمایش با مواد استوار است در حالی که در ریاضیات زیستی، این آزمایش ها یک ماهیت نظری دارند. ریاضی دانان مفاهیم و ویژگی های سازماندهی شده را به کار می گیرند تا برای سوال هایی که زیست شناسان درباره ساختمان موجودات زنده مطرح می کنند، جواب هایی بیابند. یک ضرورت اصلی به کار بردن ریاضیات در سیستم های زیستی، توانایی ساخت مدل های ریاضی است. این مدل ها، دستگاه های ریاضی هستند که بر هم کنش های پیچیده سیستم های زیستی را با یک روش ساده ارائه می کنند و این امکان را به زیست شناسان می دهند که ویژگی های آن ها را راحت تر تحلیل کنند. ریاضیات در اکثر شاخه های زیست شناسی کاربرد دارد. یکی از حوزه های تحقیقاتی ریاضیات زیستی، مدل سازی فرآیند زیستی با مهار تولید و اثر تکانه ای است.

جمع شدن محصولات در محیط کشت، رشد میکروارگانیسم ها را متوقف می کند و باروری فرآیند های زیستی را کاهش می دهد. تحقیق بر روی فیزیولوژی میکروارگانیسم ها نگاه جدیدی را بر روی مکانیسم (ساز و کار) مهار محصول فراهم می کند که باعث کم شدن هزینه های تخمیر در محصولاتی چون استون، اتانول، لاکتیک اسید و ال- گلوتامیک اسید (LGA) می شود (تیان^۱، ۲۰۱۱). ال-گلوتامیک

^۱ Tian

اسید (شناخته شده به صورت گلوتامین) تاکنون یکی از مهمترین آمینو اسید های تجاری است. تولید جهانی این محصول ، که به طور وسیع با تخمیر بدست می آید، به بیش از ۱ میلیون تن در سال می رسد. LGA به عنوان یک افزودنی طعم دهنده استفاده می شود و مشتقات زیاد آن برای شروع بسیاری از سنتز های شیمیایی خاص مختلف بکار می روند (سارش^۱، ۲۰۰۹).

خیلی از پدیده های بیولوژیکی مانند آستانه ها، مدل های ریتمی ناگهانی در پزشکی، داروشناسی و سیستم های فرکانسی، اثرات تکانه ای را در خود نشان می دهند (لاکشمیکانتان^۲، ۱۹۸۹). بنابراین معادلات دیفرانسیلی تکانه ای به عنوان یک توصیف طبیعی از پدیده های مشاهده شده از بعضی مشکلات واقعی دنیا ظاهر شده است. مقاله های زیادی معادلات دیفرانسیل تکانه ای را در حالت پویای خود معرفی کرده اند و نیز نتایج جالبی بدست آورده اند (لیو و چن^۳، ۲۰۰۳؛ منگ و چن^۴، ۲۰۰۸؛ سان و چن^۵، ۲۰۰۸؛ تانگ و چن^۶، ۲۰۰۲، ۲۰۰۴a؛ زنگ و همکارانش^۷، ۲۰۰۶، جیانگ^۸، ۲۰۰۷a). در فرآیند های میکروبی گو و چن^۹، ۲۰۰۹؛ سان، ۲۰۱۰ و تیان، ۲۰۱۰ بر روی مدل های حالت وابسته با کنترل حالت تکانه مطالعاتی کرده اند که از اصل پوانکاره و بندیکسون-پوانکاره در معادله دیفرانسیل تکانه ای استفاده کرده اند. اما هیچ یک از تحقیقات، اثر مهار محصول را بر روی مدل ریاضی در فرآیند زیستی با اثر تکانه ای در نظر نگرفته اند. این مسئله ما را بر آن داشت که در این پایان نامه به مدل سازی فرآیند های تکانه ای با مهار تولید و

^۱ Suresh

^۲ Lakshmikanthan

^۳ Liu and Chen

^۴ Meng and Chen

^۵ Sun and Chen

^۶ Tang and Chen

^۷ Zneg et al

^۸ Jiang

^۹ Gue and Chen

به بهینه سازی متغیرها پردازیم. برای بهینه سازی، از الگوریتم ژنتیک استفاده می کنیم. این الگوریتم از قاعده زنجیره مارکوفی پیروی می کند که اثبات شده که این زنجیره همگرا است.

این پایان نامه مشتمل بر ۵ فصل می باشد که به ترتیب زیر تنظیم شده است:

مطالعه این شاخه از ریاضیات زیستی نیاز به مفاهیم زیست شناسی دارد، به همین دلیل در فصل اول، این مفاهیم و تعاریف آورده شده و در ادامه مفاهیم پایه ای در ریاضیات و معادلات دیفرانسیل و آمار برای درک بهتر مطالب بیان شده است.

در فصل دوم، جواب متناوب دستگاه کموسات با نرخ رشد مونود و کنترل بازخورد حالت تکانه را در نظر می گیریم.

در فصل سوم به مدل سازی فرآیند زیستی با مهار تولید و اثر تکانه ای می پردازیم. سپس رفتارهای پویا و رفتارهای مماسی دستگاه معادلات دیفرانسیلی با حالت تکانه را مورد بررسی قرار می دهیم.

بحث اصلی این پایان نامه، قضایا و نتایجی است که در فصل چهارم بدست می آیند. در این فصل، در کنار شبیه سازی برای بررسی نتایج آنالیزی، به منظور بهینه سازی فرآیند زیستی، بهینه سازی با توجه به پارامترهای موزون مورد بررسی قرار خواهد گرفت. در فصل آخر در مورد نتایج اصلی بحث می شود.

و برخی از اثبات های ریاضی در پیوست (۱) آمده و در پیوست (۲) نتایج عددی با استفاده از برنامه متلب آورده شده است.

مقالات اصلی که این پایان نامه با مطالعه آن ها تدوین شده است، مقالات (تیان، ۲۰۱۰، ۲۰۱۱)،

(سارش، ۲۰۰۹) و (سان، ۲۰۱۰) می باشند.

فصل ۱

پیش نیازها و تعاریف

۱-۱ مفاهیم زیست شناسی

تعریف ۱-۱-۱ (گایتون^۱، ۲۰۰۶): تخمیر پدیده‌ای ناشی از مجموعه فعالیت‌های زیستی است که در آن ترکیبات آلی که دارای مولکولهای بزرگ هستند به ترکیباتی با مولکولهای کوچکتر و ساده‌تر شکسته و تجزیه (کاتابولیسم) می‌شود و از فرآیند آن، علاوه بر ایجاد ترکیبات آلی ساده‌تر، دی‌اکسید کربن و انرژی آزاد می‌شود. تخمیر، فرآیند تغییر شیمیایی است که بوسیله ارگانیسم‌ها یا محصولات آنها ایجاد می‌شود و معمولاً همراه با تولید حباب و گرما می‌باشد.

تعریف ۲-۱-۱ (خان^۲، ۲۰۰۵): در فرآیند تولید، رشد سلولی از میان چند فاز عبور می‌کند:

- ۱- فاز تاخیری: در این مرحله سلول با محیط جدید تطبیق پیدا می‌کنند و بر تعداد آن‌ها افزوده نمی‌شود. بسته به سن سلول، محیط کشت و عوامل مختلف محیطی، طول این مرحله متفاوت است.
- ۲- فاز لگاریتمی: سلول‌های باکتری رشد تصاعدی دارند و به صورت تصاعدی تقسیم می‌شوند. در این مرحله میکروارگانیسم‌ها مواد غذایی را مصرف کرده و تعدادشان به صورت نمایی یا لگاریتمی افزایش می‌یابد. تحت شرایط مطلوب تعداد سلول‌ها در ۱۵-۲۰ دقیقه دو برابر می‌شود.
- ۳- فاز سکون: باکتری‌ها تعدادشان زیاد شده و به دلیل این که مواد مغذی محیط کشت تمام شده دیگر تولید نمی‌شوند. در این مرحله میزان تولید با میزان مرگ و میر برابر است.

^۱ Guyton
^۲ Khan

۴- فاز مرگ: مواد مغذی باکتری ها تمام می شود و باکتری ها می میرند.

تعریف ۱-۱-۳ (گایتون، ۲۰۰۶): انواع سیستم های کشت در تخمیر

- پردازش دسته ای: در این روش، محیط کشت در مرحله سکون تخریب می گردد تا توده زیستی (سلول ها، ارگانسیم ها) و ترکیبات اضافه شده و جدید برداشت شوند. بهترین نقطه مثبت این روش، سطح مناسب بازده و نقطه منفی آن، مواد زائد غذایی استفاده نشده توسط ارگانسیم ها می باشد.
- مداوم یا پیوسته: در این روش، محیط کشت بر اساس یک یا دو ترکیب محدود کننده طراحی می شود. زمانی که مقدار اولیه این ترکیبات کم باشد، رشد متوقف نشده و به وضعیت سکون می رسد، اما رشد دوباره با افزودن ترکیب محدود کننده کنترل می شود، به این روش کموستات هم می گویند.
- روش پردازش دسته ای: در این نوع، یک تحریک کننده محیط کشت به طور مداوم یا متناوب اضافه می گردد. تولید پنی سیلین که یک متابولیت ثانویه است، با این روش صورت می گیرد.

۱-۱-۲ مطالعات بر روی مهارها

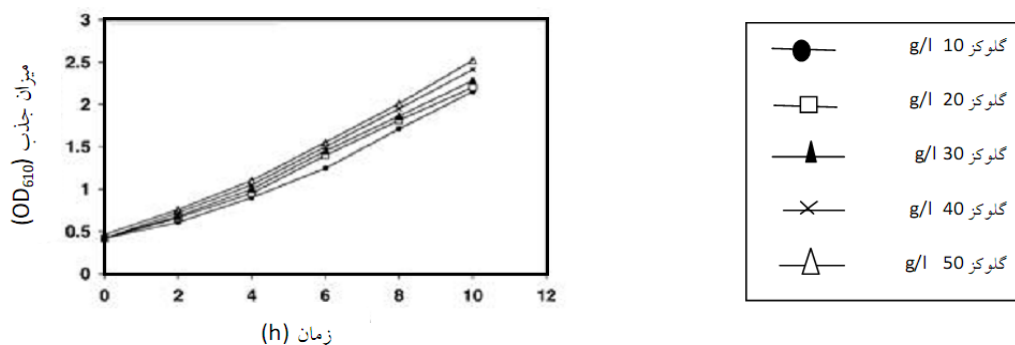
در این زیر بخش عواملی که باعث ایجاد وقفه بر روی رشد محصول می شود را بیان می کنیم.

۱- مهار سوپسترا

با توجه به تحقیقی که خان و همکارانش^۱ نشان دادند، در تخمیر ال-گلوتامیک اسید توسط کورینه باکتریوم گلوتامسیوم، در غلظت بالا، مهار رشد توسط سوپسترا (گلوکز) و توسط محصول در تقریباً تمام غلظت ها به ظاهر اتفاق می افتد. خان و همکارانش دنباله ای از آزمایشات پردازش دسته ای، با مقدار

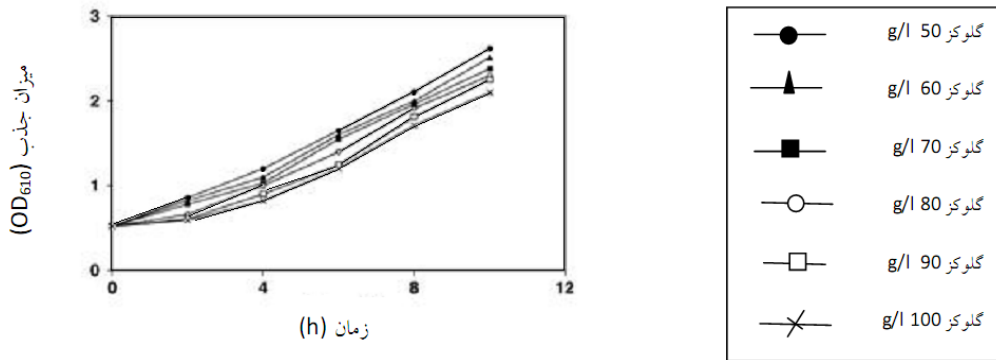
^۱ Khan et al

غلظت های مختلف از سوبسترای اولیه (گلوکز) را به منظور بررسی محدوده مربوط به مهار توقف، انجام دادند. تخمیر پردازش دسته ای (برای تولید ال-گلوتامیک اسید) در بیوراکتور با میزان غلظت های مختلف از گلوکز اولیه انجام شده و مهار محصول بعد از آنالیز داده های مربوط به هر دوره زمانی بدست آمده است. در فرآیند رشد که سوبسترا (گلوکز) عامل محدود کننده می باشد، فرض شده که بقیه عوامل موجود در کشت، در سینتیک تخمیر اثری ندارند. شکل (۱-۱) تراکم بهینه مواد مغذی در 610 nm در مقابل زمان تخمیر، برای غلظت های گلوکز اولیه مختلف را نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود، رشد به آرامی و با اضافه شدن غلظت سوبسترا، زیاد شده و تا 50 g/l گلوکز (حوزه محدودیت سوبسترا)، هیچ اثری از مهار نیست (خان، ۲۰۰۵).



شکل ۱-۱) تاثیر غلظت گلوکز اولیه بر روی کورینه باکتریوم گلوتامسیوم

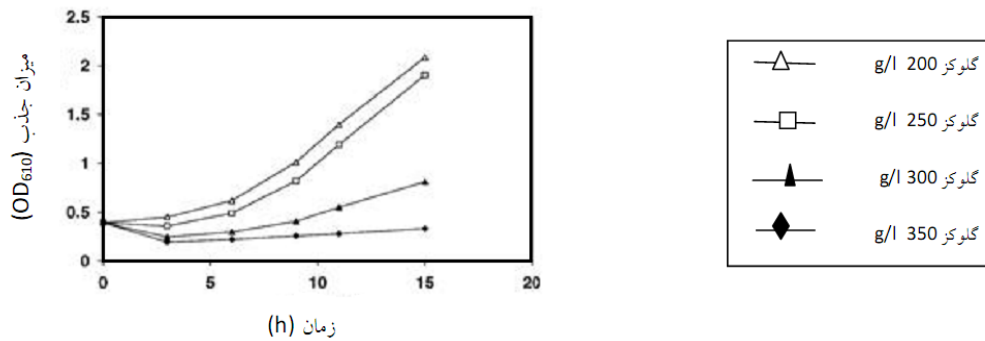
در بیش از 50 g/l گلوکز، رشد به ظاهر با افزایش غلظت گلوکز اولیه، کاهش می یابد (شکل ۱-۲). اگر به افزودن غلظت گلوکز اولیه ادامه دهیم، ممکن است در یک نقطه رشد، به طور کامل متوقف شود.



شکل ۱-۲) تاثیر غلظت گلوکز اولیه بر روی رشد کورینه باکتریوم گلوتامسیوم

اثر شدید مهار رشد در شکل (۱-۳) قابل مشاهده است. در این جا زمانی که غلظت گلوکز اولیه

۳۵۰ g/l است، رشد قابل مشاهده نیست.



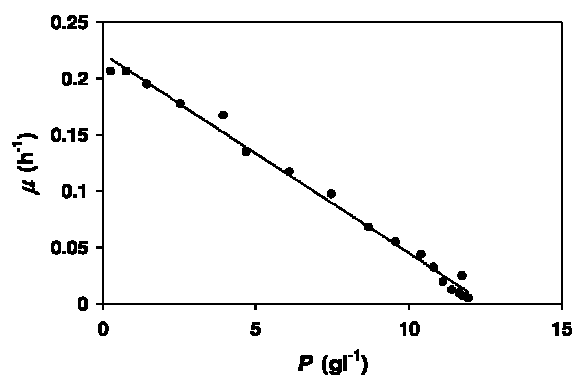
شکل ۱-۳) تاثیر غلظت سوسترای اولیه بر روی رشد کورینه باکتریوم گلوتامسیوم

۲- مهار محصول

همان طور که در شکل (۱-۴) دیده می شود ، نرخ رشد (μ) به طور مداوم با افزایش غلظت ال-

گلوتامیک اسید کاهش می یابد و تقریباً به صفر می رسد، در این زمان غلظت محصول به بالاترین نقطه

یعنی تقریباً $12g/l$ رسیده است. این موضوع نشان می دهد که رشد سلول توسط محصول متوقف شده است. برگتر و کنور^۱ نیز به چنین نتیجه ای رسیدند (برگتر و کنور، ۱۹۷۲). و این مهم ممکن است بخاطر این باشد که در همان ابتدا، زمانی که غلظت محصول قابل صرفه نظر کردن یا کم است، مهار قابل مشاهده نیست و به محض این که اسید جمع شد، مهار به تدریج افزایش می یابد. نرخ رشد ویژه به طور مداوم در ماکزیمم غلظت ال-گلوتامیک اسید کاهش می یابد و به صفر می رسد. در اینجا کاهش با توجه به شکل (۱-۴) تقریباً خطی است. مهار رشد توسط محصول (ال-گلوتامیک اسید) در طی تخمیر صورت می گیرد. در غلظت های بالا، مثل $350g/l$ گلوکز، رشد تقریباً صفر است که ممکن است به دلیل مهار خیلی شدید سوستر باشد (خان، ۲۰۰۵).



شکل (۱-۴) تاثیر غلظت محصول (ال-گلوتامیک اسید) بر روی نرخ رشد کورینه باکتریوم گلوتامسیوم

عوامل زیاد دیگری نیز وجود دارند که بر روی رشد و تولید دوباره میکروارگانیسم ها در فرآیند های زیستی تاثیر دارند. برای مثال، در بعضی از میکروبیهای هوازی، میزان اکسیژن حل نشده (DOC) در محیط بیوراکتور، یک عامل کلیدی در رشد میکروبی بشمار می رود. به منظور پایداری سطح اکسیژن حل نشده در یک محدوده مناسب و مطلوب، لازم است که میزان اکسیژن حل نشده (DOC) مشاهده و کنترل شود.

^۱ Bergter and Knorre

این کار ضروری است، چون سطح پایین DOC باعث کاهش در محصول توده زیستی و نرخ رشد ویژه می شود. برای میکروارگانیسم های در نظر گرفته شده، اکسیژن درخواستی، تحت تاثیر بعضی از عوامل است که در بین آن ها، غلظت توده زیستی، غلظت و نوع سوبسترا و شرایط فرآیند مهم است. زمانی که غلظت توده زیستی به سطح تعیین شده ای می رسد، استراتژی کنترل بکار گرفته می شود، یعنی قسمتی از توده زیستی موجود در محیط کشت بیوراکتور تخلیه و مقدار تجویز شده سوبسترا، در هر مرحله اضافه می شود. در این صورت امکان نگره داشتن میزان اکسیژن حل نشده در یک سطح مطلوب به وجود می آید و از این طریق می توان به راحتی میزان DOC را کنترل کرد. زمان اضافه شدن سهم بعدی سوبسترا به بیوراکتور، بر اساس تغییرات موجود در غلظت اکسیژن حل نشده (DOC) است (یعنی مثلاً، به محض این که DOC از مقدار تعیین شده ۴۵٪ می گذرد، سهم بعدی سوبسترا وارد محیط کشت می شود). زمانی که نرخ اکسیژن دریافتی بیشتر از نرخ اکسیژن حل نشده است، DOC کاهش می یابد (شکل ۱-۵). هم چنین غلظت گلوکز نیز کم می شود. در نتیجه، تقاضای میکروارگانیسم برای اکسیژن کاهش می یابد. زمانی که نرخ اکسیژن حل نشده بیشتر از نرخ اکسیژن دریافتی است، DOC شروع به افزایش می کند. سوبسترای اضافه شده، باعث نوسان DOC می شود که همگی نمونه بارز از این روش مقداردهی است (کسپرسکای^۱، ۲۰۰۸).

^۱ Kasperski