

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii



**Optymalizacja pomiarów napięcia
w układzie MFC z jednoczesną produkcją
MlrA w komórkach *Synechocystis sp.* PCC
6803 McCormick 7**

Filip Stanisław Hajdyla
Nr albumu: 1164936

Praca licencjacka z Biotechnologii
pod opieką dr hab. Dariusza Dzigi

Pracownia Metabolomiki

Kraków, 2022

Spis treści

1	Wstęp	4
1.1	Historia MFC	4
1.2	Zastosowania MFC	4
1.3	Podstawy molekularne działania MFC	5
1.4	Cel pracy	6
2	Materialy i metody	6
2.1	Sprzęt i oprogramowanie	6
2.2	Odczynniki chemiczne	7
2.3	Wykorzystane szczepy	7
2.4	Badanie wzrostu <i>R. spheroides</i> na wodach ściekowych	7
2.5	Badanie aktywności MlrA w <i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803 McCormick 7	7
2.6	Pomiary napięcia w układzie MFC	8
3	Wyniki	8
4	Wnioski	8

Wykaz skrótów

BES bio-electrochemical system. 4

HPLC high-performance liquid chromatography. 6, 8

M27 Medium 27. 7–9

MFC microbial fuel cell. 1, 4–6, 8

MlrA microcystinase USTB-05. 1, 6, 7, 9

NASA National Aeronautics and Space Administration. 4

OD optical density. 6–10

SEM standard error mean. 9, 10

WW wastewater. 6–9

Streszczenie

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut purus elit, vestibulum ut, placerat ac, adipiscing vitae, felis. Curabitur dictum gravida mauris. Nam arcu libero, nonummy eget, consectetur id, vulputate a, magna. Donec vehicula augue eu neque. Pellentesque habitant morbi tristique senectus et netus et malesuada fames ac turpis egestas. Mauris ut leo. Cras viverra metus rhoncus sem. Nulla et lectus vestibulum urna fringilla ultrices. Phasellus eu tellus sit amet tortor gravida placerat. Integer sapien est, iaculis in, pretium quis, viverra ac, nunc. Praesent eget sem vel leo ultrices bibendum. Aenean faucibus. Morbi dolor nulla, malesuada eu, pulvinar at, mollis ac, nulla. Curabitur auctor semper nulla. Donec varius orci eget risus. Duis nibh mi, congue eu, accumsan eleifend, sagittis quis, diam. Duis eget orci sit amet orci dignissim rutrum.

Abstract

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut purus elit, vestibulum ut, placerat ac, adipiscing vitae, felis. Curabitur dictum gravida mauris. Nam arcu libero, nonummy eget, consectetur id, vulputate a, magna. Donec vehicula augue eu neque. Pellentesque habitant morbi tristique senectus et netus et malesuada fames ac turpis egestas. Mauris ut leo. Cras viverra metus rhoncus sem. Nulla et lectus vestibulum urna fringilla ultrices. Phasellus eu tellus sit amet tortor gravida placerat. Integer sapien est, iaculis in, pretium quis, viverra ac, nunc. Praesent eget sem vel leo ultrices bibendum. Aenean faucibus. Morbi dolor nulla, malesuada eu, pulvinar at, mollis ac, nulla. Curabitur auctor semper nulla. Donec varius orci eget risus. Duis nibh mi, congue eu, accumsan eleifend, sagittis quis, diam. Duis eget orci sit amet orci dignissim rutrum.

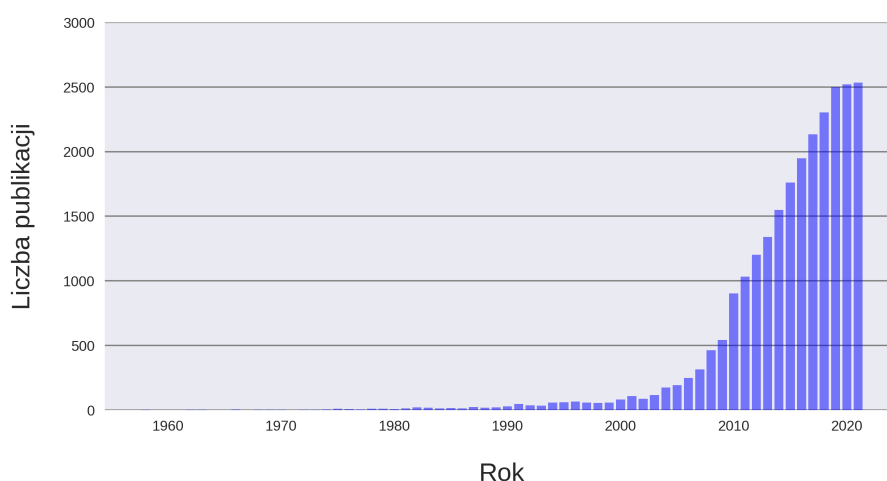
1 Wstęp

1.1 Historia MFC

MFC (*ang.* microbial fuel cell) to urządzenia umożliwiające generowanie energii elektrycznej z wykorzystaniem mikroorganizmów. Należą one do szerszej klasy urządzeń BES (*ang.* bio-electrochemical system) [1]. Pomysł wykorzystania mikroorganizmów do generowania elektryczności przypisuje się Michaelowi Potterowi [2], natomiast idea „elektryczności zwierząt”, a więc elektryczności związanej z układami ożywionymi, sięga aż XVIII wieku [1]. Pomimo iż pracę Pottera uważa się za początek technologii MFC, dopiero po ponad 50 latach od jej publikacji znalazła ona praktyczne zastosowanie w oczyszczaniu i przetwarzaniu odpadów ściekowych w prąd elektryczny podczas lotów kosmicznych organizowanych przez NASA [3].

1.2 Zastosowania MFC

W ostatniej dekadzie zainteresowanie systemami BES, a w szczególności MFC, wzrosło diametralnie, co odzwierciedla wzrost liczby związanych z nimi publikacji przedstawiony na rys. 1. Pojawiające publikacje związane z MFC dotyczą różnych aspektów tej technologii. Wiele z nich skupia się na ogólnym zrozumieniu molekularnych podstaw działania tych systemów [3–5], inne poruszają kwestie związane z ich konstrukcją i użyciem odpowiednich materiałów do budowy elektrod i membran [6, 7], a jeszcze inne skupiają się na bardzo istotnych aspektach ekonomicznych [8]. Wysokie zainteresowanie technologią MFC w ostatnich latach wynika z potencjału do wykorzystania ich w celu jednoczesnego oczyszczania wód ściekowych, generowania energii elektrycznej oraz cennej biomasy, która mogłaby następnie zostać wykorzystana w bio rafineriach do produkcji biopaliw, biopolimerów i biochemikaliów. Niewątpliwymi zaletami

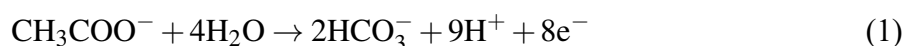


Rysunek 1: Liczba publikacji z „MFC” lub „microbial fuel cell” w tytule w latach 1958–2021. (Dane pochodzą z serwisu <https://webofscience.com>)

tych systemów są również ich długi czas działania bez konieczności konserwacji i obsługi [9] oraz niewymagające warunki operacyjne [3]. Obecne systemy oczyszczania ścieków wykorzystujące osad czynny zużywają od 0.3 do 0.6 kWh m⁻³ co w skali globalnej przekłada się na 4 % całkowitego zużycia energii [10]. Wszystkie ww. zalety systemów MFC sprawiają natomiast, że mogłyby one być częściowym rozwiązaniem problemu nadmiernej akumulacji odpadów, umożliwiając ich pozytywnie energetyczną biokonwersję. Obecnie uważa się, że systemy te nie są w stanie całkowicie zastąpić tradycyjnych oczyszczalni ścieków, ale że mogłyby służyć jako jeden z komponentów nowoczesnych oczyszczalni połączonych z biorafineriami.

1.3 Podstawy molekularne działania MFC

W systemach MFC, do generowania elektryczności, wykorzystuje się utleniająco-redukujący charakter reakcji metabolicznych przeprowadzanych przez mikroorganizmy, które możemy podzielić na rezydujące na powierzchni anody elektrogeny (uwalniające na nią elektrony) oraz zasiedlające katodę elektrotrofy (pobierające i wykorzystujące elektrony) [10]. Elektrogeny przeprowadzają procesy oddychania beztlenowego, utleniając znajdujące się w pożywce związki organiczne oraz wykorzystując anodę jako ostateczne źródło elektronów. Przykładem takiego procesu może być utlenianie octanu:



Zdolność do transferu elektronów na powierzchnię metali (lub innych przewodników) wynika z naturalnego przystosowania tych organizmów do życia na powierzchni rud metali i wykorzystania ich jako ostateczny akceptor elektronów. Transfer elektronów na elektrodę może zachodzić na różne sposoby [1]:

1. Transport bezpośredni (z wykorzystaniem cytochromu c);
2. Transport przez nano-przewody;
3. Transport za pośrednictwem mediatorów redox;

Choć nie poznano jeszcze dokładnie molekularnych mechanizmów transferu elektronów, wiadomo, że najwolniejszym oraz niekorzystnym z technologicznego punktu widzenia sposobem jest transport za pośrednictwem mediatorów redox, gdyż jest on znacznie ograniczony szybkością dyfuzji. Do najbardziej efektywnych elektrogenów należą *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella oneidensis* oraz *Rhodobacter spheroides*. Elektrotrofy są z kolei organizmami pobierającymi elektrony z powierzchni katody (za pośrednictwem mediatorów redox) i redukującymi CO₂, lub organizmami przeprowadzającymi fotosyntezę oksygeniczną [1, 11]. Uwolniony w wyniku procesu fotosyntezy tlen jest następnie wykorzystywany w reakcji redukcji tlenu do wody:



Użycie organizmów zapewniających wysokie tempo zużycia elektronów np. intensywnie fotosyntetyzujących alg, takich jak *Chlorella vulgaris*, lub cyjanobakterii z rodzaju *Synechocystis* pozwala na efektywne zapewnienie odpowiednich ilości tlenu w komorze katodowej bez konieczności jej mechanicznego napowietrzania, co pozwala dodatkowo zmniejszyć koszty operacyjne [11]. Należy jednak pamiętać, aby zapewnić odpowiednie warunki bytującym w komorze organizmom.

1.4 Cel pracy

W niniejszej pracy skupiłem się na badaniu wzrostu organizmów elektrogenicznych i elektrotroficznych w środowisku o wysokim zanieczyszczeniu związkami organicznymi, z jednoczesną ekspresją i badaniem aktywności mikrocystynazy MlrA [12, 13] w komórkach elektrotrofów (*Synechocystis sp.* PCC 6803), oraz na optymalizacji pomiarów napięcia prądu elektrycznego generowanego podczas wzrostu i metabolizmu tych mikroorganizmów. Praca Pani Konstancji Gałat dowiodła, że w przypadku hodowli z użyciem rozcieńczonych WW jako pożywki, największą ekspresję MlrA wykazuje szczep *Synechocystis sp.* PCC 6803 McCormick 7 kultywowany przy użyciu WW2 (2.2) [14], dlatego w niżej opisanych badaniach użyty został właśnie ten szczep, a do jego kultywacji wykorzystano ww. substrat. W sekcji 2 zostaną opisane metody i wykonanie poszczególnych eksperymentów.

2 Materiały i metody

2.1 Sprzęt i oprogramowanie

Do pomiarów gęstości optycznej (OD) używane były czytniki mikroplatek Molecular Devices SpectraMax iD5, BioRad iMark Microplate Reader, oraz spektrofotometr Unicam Helios β . Do analizy aktywności MlrA metodą HPLC wykorzystano chromatograf Agilent Technologies 1220 Infinity LC. W celu homogenizacji komórek używano homogenizatora Bertin Technologies Precellys Evolution (8000 rpm, 4 cykle po 45 s) oraz kuleczek szklanych. Celem pomiaru i ustalania pH pożywek zastosowano pH-metr BECKMAN Φ 50 pH Meter. Do budowy układu MFC wykorzystano butelki firmy (...) o pojemności 250 ml, membranę nafionową (...), jako katodę — płytkę miedzianą o powierzchni całkowitej (...) cm^2 , jako anodę — 3 płytki z włókna węglowego firmy (...) o łącznej powierzchni całkowitej (...) cm^2 (warunki operacyjne układu: $T = 20^\circ\text{C}$, intensywność oświetlenia mierzona w miejscu ustawienia butelek względem lampy była równa $70 \mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Do pomiarów różnicy potencjałów pomiędzy elektrodami w układzie MFC użyto multimetru PeakTech 4000 wraz z dedykowanym oprogramowaniem do zbierania danych przy pomocy komputera. Do analizy danych i wizualizacji wykorzystano oprogramowanie MS Excel, OriginLabs oraz język programowania Python (głównie moduły pandas i matplotlib).

2.2 Odczynniki chemiczne

Kwas trifluorooctowy (TFA), odczynnik Bradforda, bufor fosforanowy (pH 7), media, wody ściekowe (WW) pochodzące z oczyszczalni w Myślenicach (numeracja objaśniona w dodatku — tab. 1). (ta sekcja jeszcze nie jest gotowa)

2.3 Wykorzystane szczepy

Synechocystis sp. PCC 6803 McCormick 7 [15] były kultywowane z użyciem standardowego medium BG-11 z dodatkiem $50 \mu\text{l ml}^{-1}$ kanamycyny, w kolbach Erlenmayera, w temperaturze 28°C i natężeniu światła $40 \mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Kolbi były umieszczone na wytrząsarce orbitalnej (110 rpm). *Rhodobacter spheroides* kultywowano na pożywce M27 do hodowli *Rhodobacter* przygotowanej wg. protokołu dostępnego w Pracowni Metabolomiki, w probówkach typu Falcon (50 ml), w temperaturze 20°C i natężeniu światła $40 \mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.4 Badanie wzrostu *R. spheroides* na wodach ściekowych

W tym eksperymencie badano wzrost *R. spheroides* przy różnych rodzajach i rozcieńczeniach wód ściekowych w pożywce. Eksperyment wykonano w dwóch turach. W pierwszej turze, w probówkach Falcon 15 ml sporządzono mieszaniny M27 z wodami ściekowymi nr 2, 3 i 4, w stężeniach 5 %, 15 % i 45 % ($V = 14 \text{ ml}$). Ustalono pH mieszanin do pH 7. Jako kontroli użyto czystego M27 (pH 6.8). Wszystkie próbki zaszczepiono 1 ml pierwotnej hodowli *R. spheroides*. Pomiary OD_{600} były wykonywane przy pomocy spektrofotometru Unicam Helios β . Drugą turę eksperymentu przygotowano w sposób analogiczny. Różnicą było testowanie innych stężeń wód ściekowych (15 %, 45 % i 80 %). Hodowle wykonano w tryplikatach. Mierzono OD_{595} przy pomocy czytnika mikropłytek BioRad iMark Microplate Reader (droga optyczna l odpowiada $200 \mu\text{l}$ roztworu w studzience).

2.5 Badanie aktywności MlrA w *Synechocystis sp.* PCC 6803 McCormick 7

W tym eksperymencie mierzono aktywność MlrA w komórkach *Synechocystis sp.* PCC 6803 przy różnych rodzajach WW w pożywce. W tym celu przygotowano mieszaniny BG-11 z WW2 i WW3 w proporcjach 1:1 w objętościach po 40 ml. Kontrolą była czysta pożywka BG-11. Obliczono, że mając hodowlę macierzystą o $\text{OD}_{600} = 0.746$, w celu osiągnięcia początkowego $\text{OD}_{600} = 0.200$, należy zawiesić komórki z odwirowanych (10733 RCF, 10 min) 10,72 ml hodowli pierwotnej w 40 ml nowej pożywki. Hodowle wykonano w tryplikatach. Markerem selekcyjnym była kanamycyna ($c = 50 \mu\text{g ml}^{-1}$). Zbierano próbki hodowli po 1 ml w 4, 7, 10 i 14 dniu eksperymentu i zamrażano (-20°C). Po rozmrożeniu próbki homogenizowano (2.1), a następnie odwirowywano (16873 RCF, 5 min), a nadsącz zbierano do nowych probówek typu Eppendorf 1.5 ml. Na płycie 96-dołkowej przeprowadzono test aktywności MlrA. Do studzie-

nek dodano po 45 μl mikrocystyny (1.5 mg ml^{-1}) i 5 μl odpowiedniego, wcześniej zebranego nadsącza (lizatu). Reakcję prowadzono przez 1 h, po czym zatrzymano ją poprzez dodanie 5 μl 1 % TFA. Rozdział mieszaniny prowadzono przy pomocy techniki HPLC (2.1). Celem normalizacji obliczonych na podstawie danych z HPLC aktywności białka mierzono całkowite stężenie białka metodą Bradforda: 5 μl lizatu + 95 μl buforu fosforanowego pH 7.0 + 100 μl odczynnika Bradforda.

2.6 Pomiary napięcia w układzie MFC

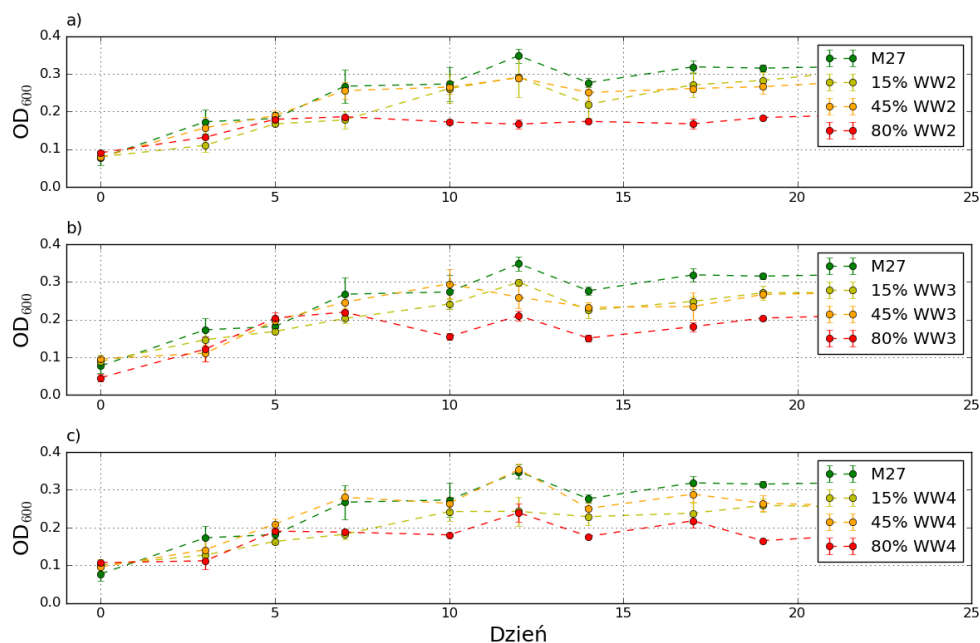
W tym eksperymencie badano wpływ gęstości hodowli *R. spheroides* w komorze z anodą na generowane w układzie MFC napięcie. W komorze z katodą znajdowały się komórki *Synechocystis sp.* PCC 6803 McCormick 7 zawieszone w 250 ml BG-11 + 50 % WW2 ($\text{OD}_{600} = 1.000$). Początkowo w komorze z anodą znajdowało się 250 ml czystego M27, jednak na samej elektrodzie był obecny wcześniej zaadaptowany biofilm *R. spheroides*. Dodawano po 1 ml stężonej zawiesiny *R. spheroides* i, po zmieszaniu, mierzono OD_{600} oraz zmiany napięcia prądu stałego (DC) przez 218 min od momentu dodania kolejnej porcji zawiesiny komórek. Dla $\text{OD}_{600} = 0.743$ pomiary prowadzono przez 158 min ze względu na awarię sprzętu, co podczas analizy statystycznej (3) przełożyło się na mniejszą liczbę powtórzeń (n).

3 Wyniki

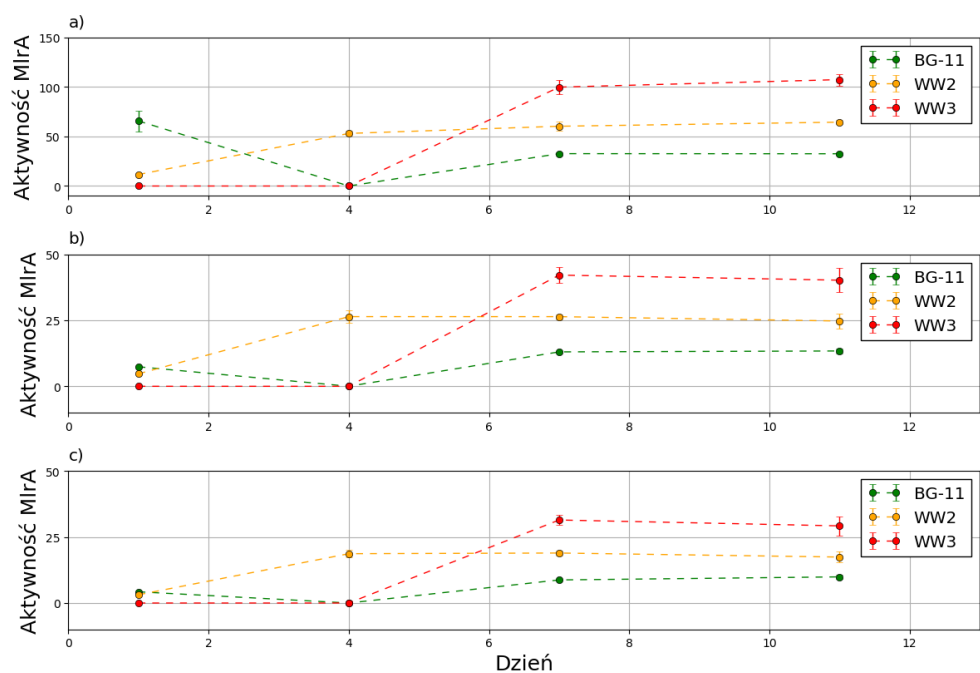
Na rys. 2 przedstawiono wyniki eksperymentu 2.4. W 10 dniu eksperymentu widoczny jest istotny statystycznie spadek OD_{600} w próbkach o $c_{WW} = 80 \%$ względem próbek o niższych stężeniach. Oznacza to hamowanie wzrostu *R. spheroides* przy stężeniach WW 80 %. Z tego względu w kolejnych eksperymentach kultywowano *R. spheroides* na M27 + 50 % WW. Rys. 3 przedstawia wyniki eksperymentu 2.5. (...) Na rys. 4 przedstawiono wyniki pomiarów napięcia w eksperymencie 2.6. Z wykresu wynika, że największe napięcia generowane są w przypadku hodowli *R. spheroides* o OD_{600} w zakresie od 0.200 do 0.535, przy czym hodowle gęstsze, o OD_{600} bliskim 0.500 wykazują spadki napięcia po dłuższym czasie.

4 Wnioski

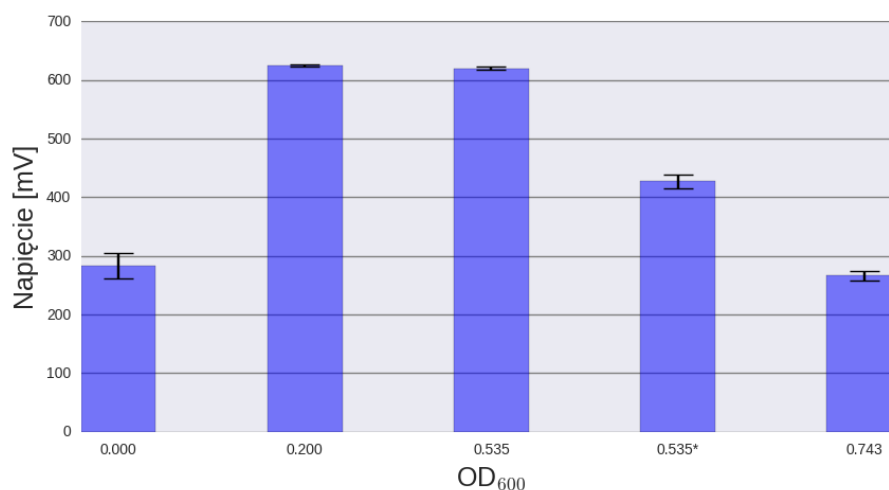
Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Ut purus elit, vestibulum ut, placerat ac, adipiscing vitae, felis. Curabitur dictum gravida mauris. Nam arcu libero, nonummy eget, consectetur id, vulputate a, magna. Donec vehicula augue eu neque. Pellentesque habitant morbi tristique senectus et netus et malesuada fames ac turpis egestas. Mauris ut leo. Cras viverra metus rhoncus sem. Nulla et lectus vestibulum urna fringilla ultrices. Phasellus eu tellus sit amet tortor gravida placerat. Integer sapien est, iaculis in, pretium quis, viverra ac, nunc. Praesent eget sem vel leo ultrices bibendum. Aenean faucibus. Morbi dolor nulla, malesuada



Rysunek 2: Zmiany OD_{600} hodowli *R. spheroides* w czasie w M27: a) zawierającym WW2 w stężeniach 15 %, 45 % i 80 %; b) zawierającym WW3 w stężeniach 15 %, 45 % i 80 %; c) zawierającym WW4 w stężeniach 15 %, 45 % i 80 %. Słupki błędów to SEM (n = 3).



Rysunek 3: Aktywność MlrA w lizatach komórek *Synechocystis sp.* PCC 6803 McCormick 7 kulturowanych z użyciem różnych rodzajów WW zmieszanych w proporcjach 1:1 z BG-11 jako pożywki. Słupki błędów to SEM (n = 3). Aktywność przeliczono na całkowitą zawartość białka w lizatach. Pomiar białka przeprowadzono w próbkach rozcieńczonych a) 20x; b) 50x; c) 100x.



Rysunek 4: Uśrednione wartości napięcia w zależności od OD₆₀₀ hodowli *R. spheroides* znajdującej się w komorze z anodą. *Pomiar wykonany po 24 h adaptacji mikroorganizmów do elektrody. Słupki błędów to SEM (n = 11; dla OD₆₀₀ = 0.743, n = 8).

eu, pulvinar at, mollis ac, nulla. Curabitur auctor semper nulla. Donec varius orci eget risus. Duis nibh mi, congue eu, accumsan eleifend, sagittis quis, diam. Duis eget orci sit amet orci dignissim rutrum.

Literatura

- [1] Carlo Santoro, Catia Arbizzani, Benjamin Erable, and Ioannis Ieropoulos. Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. *Journal of Power Sources*, 356:225–244, 2017.
- [2] M C Potter and Proc R Soc Lond B. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 84(571):260–276, 1911.
- [3] Anthony J Slate, Kathryn A Whitehead, Dale A C Brownson, and Craig E Banks. Microbial fuel cells : An overview of current technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 101(March 2018):60–81, 2019.
- [4] Willy Verstraete Bruce E. Logan, Bert Hamelers, René Rozendal, Uwe Shroder, Jurg Keller, Stefano Freguia, Peter Aelterman and Korneel Rabaey. Critical Review Microbial Fuel Cells : Methodology and Technology. *Environmental Science Technology*, 40(17):5181–5192, 2006.
- [5] Derek R. Lovley. Bug juice: Harvesting electricity with microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 4(7):497–508, 2006.

- [6] Rajnish Kaur, Aanchal Marwaha, Varun A. Chhabra, Ki Hyun Kim, and S. K. Tripathi. Recent developments on functional nanomaterial-based electrodes for microbial fuel cells. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119(October):109551, 2020.
- [7] Siti Mariam Daud, Byung Hong Kim, Mostafa Ghasemi, and Wan Ramli Wan Daud. Separators used in microbial electrochemical technologies: Current status and future prospects. *Bioresource Technology*, 195:170–179, 2015.
- [8] Juan R. Trapero, Laura Horcajada, Jose J. Linares, and Justo Lobato. Is microbial fuel cell technology ready? An economic answer towards industrial commercialization. *Applied Energy*, 185:698–707, 2017.
- [9] W. Habermann and E. H. Pommer. Biological fuel cells with sulphide storage capacity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35(1):128–133, 1991.
- [10] Ahmed AlSayed, Moomen Soliman, and Ahmed Eldyasti. Microbial fuel cells for municipal wastewater treatment: From technology fundamentals to full-scale development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 134(February):110367, 2020.
- [11] C. Nagendranatha Reddy, Hai T.H. Nguyen, Md T. Noori, and Booki Min. Potential applications of algae in the cathode of microbial fuel cells for enhanced electricity generation with simultaneous nutrient removal and algae biorefinery: Current status and future perspectives. *Bioresource Technology*, 292(August):122010, 2019.
- [12] Jason Dexter, Dariusz Dziga, Jing Lv, Junqi Zhu, Wojciech Strzalka, Anna Maksylewicz, Magdalena Maroszek, Sylwia Marek, and Pengcheng Fu. Heterologous expression of mlrA in a photoautotrophic host – Engineering cyanobacteria to degrade microcystins. *Environmental Pollution*, 237:926–935, 2018.
- [13] Jason Dexter, Alistair J. McCormick, Pengcheng Fu, and Dariusz Dziga. Microcystinase – a review of the natural occurrence, heterologous expression, and biotechnological application of MlrA, 2021.
- [14] Konstancja Gałat. Badanie systemu ekspresji białka MlrA w *Synechocystis* z jednoczesną bioremediacją ścieków komunalnych, 2022.
- [15] Jakub Puchalski. Porównanie poziomu produkcji białka MlrA przez modyfikowane genetycznie szczepy sinic oraz analiza aktywności liofilizatów MlrA przechowywanych w różnych temperaturach, 2021.