

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii



**Wstępna analiza funkcjonalności
Mikrobiologicznego Ogniwa Paliwowego (MFC)
ukierunkowanego na produkcję mikrocystynazy
(MlrA) w *Synechocystis sp.* PCC6803 na bazie
ścieków komunalnych**

Filip Stanisław Hajdyla
Nr albumu: 1164936

Praca licencjacka z Biotechnologii
pod opieką dr hab. Dariusza Dzigi

Pracownia Metabolomiki

Kraków, 2022

*Składam serdeczne podziękowania dr hab. Dariuszowi Dzidze
oraz pozostałym członkom Pracowni Metabolomiki
za cierpliwość, wyrozumiałość, pomoc oraz inspirację*

*Pracę tę dedykuję moim rodzicom,
którzy umożliwili mi kształcenie
dając tym samym start w lepszą przyszłość*

Non omnis moriar!

Spis treści

1	Wstęp	5
1.1	Historia MFC	5
1.2	Zastosowania MFC	5
1.3	Podstawy molekularne działania aMFC	6
1.4	Cel pracy	7
2	Materialy i metody	7
2.1	Sprzęt i oprogramowanie	7
2.2	Odczynniki chemiczne	8
2.3	Wykorzystane szczepy	8
2.4	Badanie wzrostu <i>R. sphaeroides</i> w pożywce z dodatkiem ścieków komunalnych	8
2.5	Pomiary napięcia w układzie aMFC	8
2.6	Badanie aktywności mlrA w <i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803 McCormick 7	9
3	Wyniki	9
4	Wnioski	11

Wykaz skrótów

aMFC algae microbial fuel cell. 4, 6–8, 11

BES bio-electrochemical system. 5

HPLC high-performance liquid chromatography. 7, 9

M27 Medium 27. 8–10

MFC microbial fuel cell. 4–6

MrA microcystinase USTB-05. 4, 7, 9, 11, 12

NASA National Aeronautics and Space Administration. 5

OD optical density. 4, 7–11

SEM standard error mean. 10

TFA trifluoroacetic acid. 9

WW wastewater. 4, 7–12, 14

Streszczenie

MFC są ogniwami elektrochemicznymi wykorzystującymi mikroorganizmy do generowania elektronów uwalnianych na anodę. Urządzenia aMFC to klasa systemów MFC wykorzystujących jednokomórkowe organizmy autotroficzne do generowania tlenu niezbędnego podczas utylizacji elektronów na powierzchni katody. W niniejszej pracy badano wzrost *R. sphaeroides* na pożywkach zawierających ścieki komunalne (WW), aktywność mikrocystynazy MlrA produkowanej przez komórki *Synechocystis sp.* PCC 6803 McCormick 7 kultywowane na pożywkach zawierających WW oraz zależności napięcia prądu stałego w układzie aMFC od gęstości zawiesiny *R. sphaeroides* umieszczonej w komorze z anodą. Wzrost *R. sphaeroides* został zahamowany dopiero przy stężeniach WW ok. 80 %, niezależnie od rodzaju stosowanych WW. Wyniki pomiarów napięcia wskazują, że optymalna gęstość zawiesiny *R. sphaeroides* względem zastosowanej anody powinna być w zakresie OD₆₀₀ 0.200-0.500. Dalszy wzrost gęstości zawiesiny prowadzi najprawdopodobniej do wzrostu oporu wewnętrznego i spadków napięcia. Aktywność mikrocystynazy MlrA wzrosła dla próbek z WW względem próby kontrolnej. Może to być spowodowane zawartością związków organicznych oraz metabolitów wtórnych indukujących produkcję białek i samego MlrA. Aby odpowiedzieć co dokładnie wpływa na produkcję MlrA należy przeprowadzić dalsze badania pod kątem analizy chemicznej oraz metabolomicznej badanych WW.

Abstract

MFC is an electrochemical cell utilising microorganisms to generate electrons that are later released onto the anode surface. aMFC is a class of MFC systems that uses autotrophic organisms to generate oxygen which is essential for electron disposal on the cathode surface. In the following thesis growth of *R. sphaeroides* on media containing municipal wastewater (WW) was investigated as well as MlrA microcystinase activity produced by *Synechocystis sp.* PCC 6803 McCormick 7 cells growing on media containing WW, and the dependence of direct current voltage in aMFC system on *R. sphaeroides* anode suspension's density. *R. sphaeroides* growth was inhibited only by 80 % WW independent of WW type. Voltage measurement results indicate that the optimal density of *R. sphaeroides* suspension against applied anode should be in the range of OD₆₀₀ 0.200-0.500. Further increase in the density most likely leads to the increase of internal resistance and therefore decrease of voltage values. Microcystinase MlrA activity was significantly larger for samples containing WW toward control sample. This could be caused by a presence of organic compounds and metabolites that might increase overall protein or mainly MlrA production. Further study focused mainly on chemical and metabolomic analysis of investigated WW is needed in order to answer what is the particular cause of increase in MlrA activity.

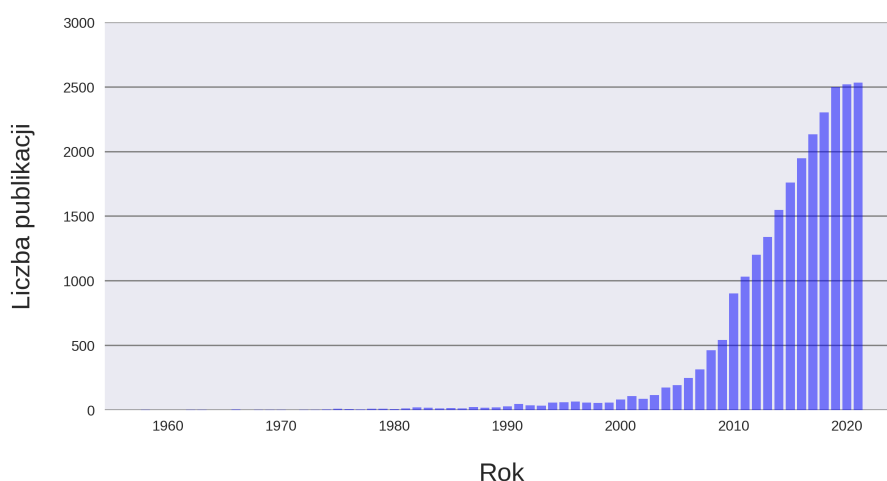
1 Wstęp

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 żywionymi, 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 się publikacje związane z MFC dotyczą różnych aspektów tej technologii. Wiele z nich dotyczy zrozumienia 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 produkcji cennej biomasy, która mogłaby następnie zostać wykorzystana w biorafineriach do produkcji biopaliw, biopolimerów i biochemikaliów. Niewątpliwymi

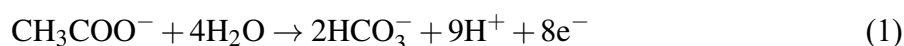


Rysunek 1: Liczba publikacji z „MFC” lub „microbial fuel cell” w tytule w latach 1958–2021. (Dane pochodzą z serwisu <https://webofscience.com>)

zaletami 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 energetycznie korzystną biokonwersję. Obecnie uważa się, że systemy te nie są w stanie całkowicie zastąpić tradycyjnych oczyszczalni ścieków, ale mogłyby służyć jako jeden z komponentów nowoczesnych oczyszczalni połączonych z biorafineriami.

1.3 Podstawy molekularne działania aMFC

W systemach aMFC (algae microbial fuel cell), 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 ostateczny akceptor 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 sphaeroides*. 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 do utylizacji elektronów 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 organizmom bytującym w komorze z katodą.

1.4 Cel pracy

W niniejszej pracy przeprowadzono wstępne badania wzrostu organizmów elektrogenicznych i elektrotroficznych w środowisku o wysokim zanieczyszczeniu związkami organicznymi, z jednoczesnym pomiarem 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 ścieków komunalnych (WW) jako pożywki, największą ekspresję MlrA wykazuje szczep *Synechocystis sp.* PCC 6803 McCormick 7 rosnący na pożywce z dodatkiem WW2 (2.2) [14], dlatego w niżej opisanych badaniach użyty został właśnie ten szczep, a do jego kultury wykorzystano ww. substrat.

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 aMFC wykorzystano oprzyrządowanie zakupione w Mirong Mirong Store (Chiny) z pojemnikami o objętości 250 ml, membranę nafionową Sigma-Aldrich, jako katodę – płytkę mosiężną o powierzchni całkowitej 30 cm², jako anodę – 3 płytki z włókna węglowego o łącznej powierzchni całkowitej 84 cm² (warunki operacyjne układu: $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 aMFC 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

Media hodowlane BG-11 i M27 do hodowli *Rhodobacter* oraz wszystkie potrzebne bufony wykonywane były zgodnie ze standardowymi protokołami dostępnymi w Pracowni Metabolomiki. Mikrocytynazę-LR pochodzi ze szczepu *Microcystis aeruginosa* PCC 6803 pozyskanego z Instytutu Pasteura (Paryż, Francja). Ścieki komunalne (WW) pochodzą z oczyszczalni ścieków w Myślenicach. Zostały one rozporcjowane, zamrożone, a przed użyciem wysterylizowane w autoklawie. Nie były one jednak poddane filtracji ani innym procesom oczyszczania. WW ponumerowano (1-4) wg. rys. 4 i tab. 4 (Dodatek). Pozostałe odczynniki chemiczne zostały zakupione w Merck Millipore (Burlington, MA, USA).

2.3 Wykorzystane szczepy

Synechocystis sp. PCC 6803 McCormick 7 [15] był kultywowany 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 $40 \mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Kolby były umieszczone na wstrząsarce orbitalnej (110 rpm). *Rhodobacter sphaeroides* 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. sphaeroides* w pożywce z dodatkiem ścieków komunalnych

W tym eksperymencie badano wzrost *R. sphaeroides* przy różnych rodzajach i rozcieńczeniach wód ściekowych w pożywce. Eksperyment wykonano w dwóch turach. W pierwszej turze, w probówkach Falcon 15 ml sporządzono mieszaniny pożywki M27 z wodami ściekowymi nr 2, 3 i 4, w stężeniach 5 %, 15 % i 45 % ($V = 14 \text{ ml}$). Ustalono pH mieszanin do ok. 7. Do próby kontrolnej użyto pożywki M27 (pH 6.8). Wszystkie próbki zaszczepiono 1 ml pierwotnej hodowli *R. sphaeroides*. 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 trzech powtórzeniach biologicznych. Mierzono OD_{595} przy pomocy czytnika mikropłytek BioRad iMark Microplate Reader (droga optyczna l odpowiada $200 \mu\text{l}$ roztworu w studzience).

2.5 Pomiary napięcia w układzie aMFC

W tym eksperymencie badano wpływ gęstości hodowli *R. sphaeroides* w komorze z anodą na generowane w układzie aMFC napięcie. W komorze z katodą znajdowały się komórki *Synechocystis sp.* PCC 6803 McCormick 7 zawieszone w $250 \text{ ml BG-11} + 50 \% \text{ WW2}$ ($\text{OD}_{600} = 1.000$). Początkowo w komorze z anodą znajdowało się 250 ml pożywki M27, jednak na samej elektro-

dzie był obecny wcześniej zaadaptowany biofilm *R. sphaeroides*. Dodawano po 1 ml stężonej zawiesiny *R. sphaeroides* i, po zmieszaniu, mierzono OD₆₀₀ oraz zmiany napięcia prądu stałego (DC) przez ok. 200 min od momentu dodania kolejnej porcji zawiesiny komórek. Pomiar napięcia wykonywane były z częstotliwością 5 Hz.

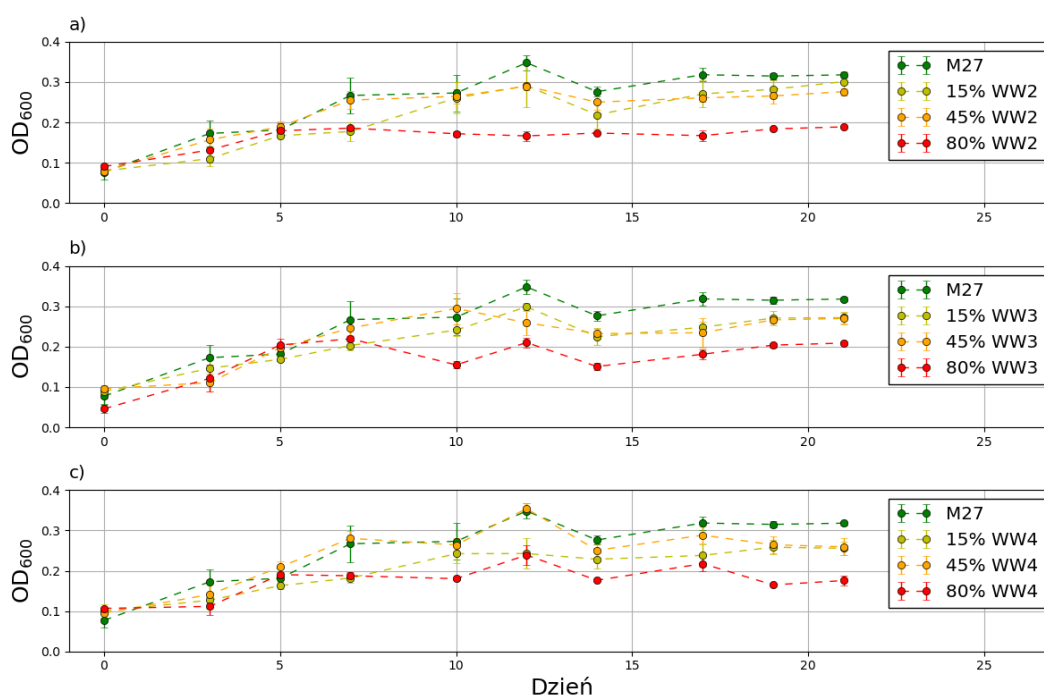
2.6 Badanie aktywności mlrA w *Synechocystis sp.* PCC 6803 McCormick 7

Aktywność MlrA w komórkach *Synechocystis sp.* PCC 6803 McCormick 7 mierzono 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 hodowla prowadzona na pożywce BG-11. Obliczono, że mając hodowlę macierzystą o OD₆₀₀ = 0.746, w celu osiągnięcia początkowego OD₆₀₀ = 0.200, należy zawiesić komórki z odwirowanych (10733 RCF, 10 min) 10,72 ml hodowli pierwotnej w 40 ml nowej pożywki. Hodowle wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych. 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 komórki 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 płytce 96-dołkowej przeprowadzono test aktywności MlrA. Do studzienek dodano po 45 μl mikrocystyny (1.5 mg ml^{-1}) i 5 μl odpowiedniego, wcześniej zebranego nadsącza (lizatu) w różnych rozcieńczeniach (1x i 10x). 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 w 3 rozcieńczeniach: **a** 5 μl lizatu + 95 μl buforu fosforanowego pH 7.0 + 100 μl odczynnika Bradforda; **b** 2 μl lizatu + 98 μl buforu fosforanowego pH 7.0 + 100 μl odczynnika; **c** 1 μl lizatu + 99 μl buforu fosforanowego pH 7.0 + 100 μl odczynnika. Wykonano odpowiednie krzywe kalibracyjne.

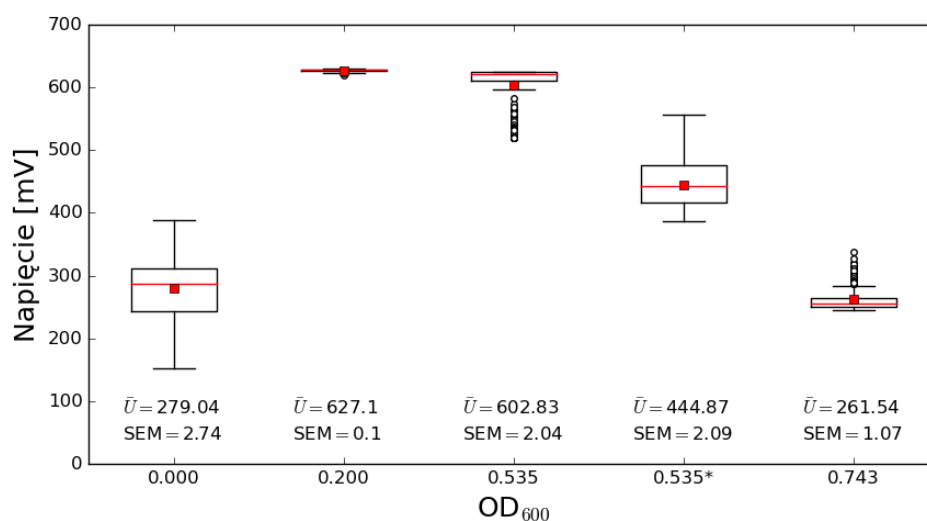
3 Wyniki

Na rys. 2 przedstawiono wyniki eksperymentu 2.4. W 10 dniu eksperymentu widoczny jest istotny statystycznie spadek OD₆₀₀ w próbkach o $c_{WW} = 80 \%$ względem próbek o niższych stężeniach. Oznacza to hamowanie wzrostu *R. sphaeroides* przy stężeniach WW 80 %. Z tego względu w kolejnych eksperymentach kultywowano *R. sphaeroides* na M27 + 50 % WW.

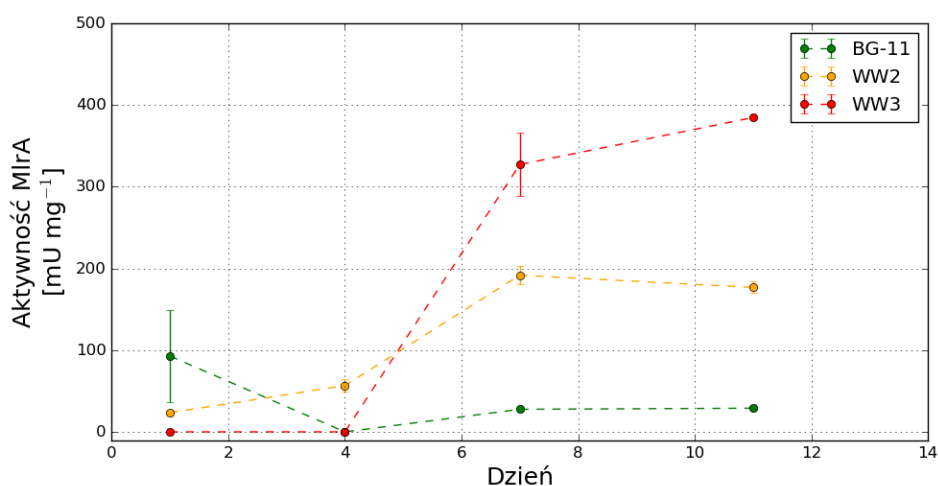
Rys. 3 przedstawia wyniki pomiarów napięcia w eksperymencie 2.5. Podczas analizy danych zostały wzięte pod uwagę wyniki z pierwszych 160 min pomiaru rejestrowane co 1 min. Z wykresu wynika, że największe napięcia generowane są w przypadku hodowli *R. sphaeroides* o OD₆₀₀ w zakresie od 0.200 do 0.535, przy czym hodowle gęstsze, o OD₆₀₀ bliskim 0.500 wykazują spadki napięcia po dłuższym czasie.



Rysunek 2: Zmiany OD₆₀₀ hodowli *R. sphaeroides* 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: Wykres pudełkowy przedstawiający wyniki pomiaru napięcia prądu stałego (U) w czasie w zależności od OD₆₀₀ hodowli *R. sphaeroides* znajdującej się w komorze z anodą. Czerwonym kwadratem oznaczono wartość średniej arytmetycznej napięcia (\bar{U}) dla danej serii. Czerwoną linią oznaczona została wartość mediany danej serii pomiarowej. Punkty odbiegające zostały oznaczone czarnymi kółeczkami. * oznacza pomiar wykonany po 24 h adaptacji komórek *R. sphaeroides* do elektrody.



Rysunek 4: Aktywność MlrA w kolejnych dniach hodowli normalizowana na 1 mg białka całkowitego w lizatach komórek *Synechocystis* sp. PCC 6803 McCormick 7 rosnących na różnych rodzajach WW zmieszanych w proporcjach 1:1 z BG-11. Słupki błędów to SEM ($n = 2 \vee n = 3$).

Na rys. 4 przedstawiono wyniki eksperymentu 2.6. W przypadku próby kontrolnej aktywność MlrA była największa na początku eksperymentu. Widoczny jest istotny wzrost aktywności względem próby kontrolnej, szczególnie dla próbek zawierających WW3. W tym przypadku wydaje się, że aktywność wzrasta asymptotycznie do wartości ok. 400 mU mg⁻¹. W przypadku próby zawierającej WW2 wartością graniczną wydaje się być 200 mU mg⁻¹.

4 Wnioski

Wzrost *R. sphaeroides*, badany poprzez pomiar OD₆₀₀, na pożywkach zawierających WW w stężeniach nieprzekraczających 50 % nie został zahamowany w sposób istotny statystycznie. Dopiero w przypadku 80 % WW wzrost był hamowany po ok. 7-10 dniach hodowli. Co ciekawe, nie było to zależne od rodzaju stosowanych WW, co wskazuje na niewrażliwość komórek *R. sphaeroides* na różnego rodzaju zanieczyszczenia i metabolity wtórne występujące w ściekach komunalnych na różnych etapach oczyszczania, jeśli występują one w umiarkowanych stężeniach.

Początkowy wzrost napięcia w ogniwie aMFC w zależności od OD₆₀₀ *R. sphaeroides* spowodowany jest wzrostem liczby komórek uwalniających elektrony na powierzchnię anody, generujących tym samym coraz wyższą różnicę potencjałów pomiędzy elektrodami. Późniejszy spadek napięcia wynika najpewniej z obecności zbyt dużej liczby komórek *R. sphaeroides* względem ograniczonej powierzchni elektrody. Wraz ze wzrostem liczby komórek rośnie ilość produkowanych metabolitów, które mogą hamować procesy subkomórkowe oraz związków wielko-cząsteczkowych wchodzących w skład śluzu bakteryjnego, który jest jedną z przyczyn wzrostu oporu wewnętrznego i w konsekwencji spadku napięcia.

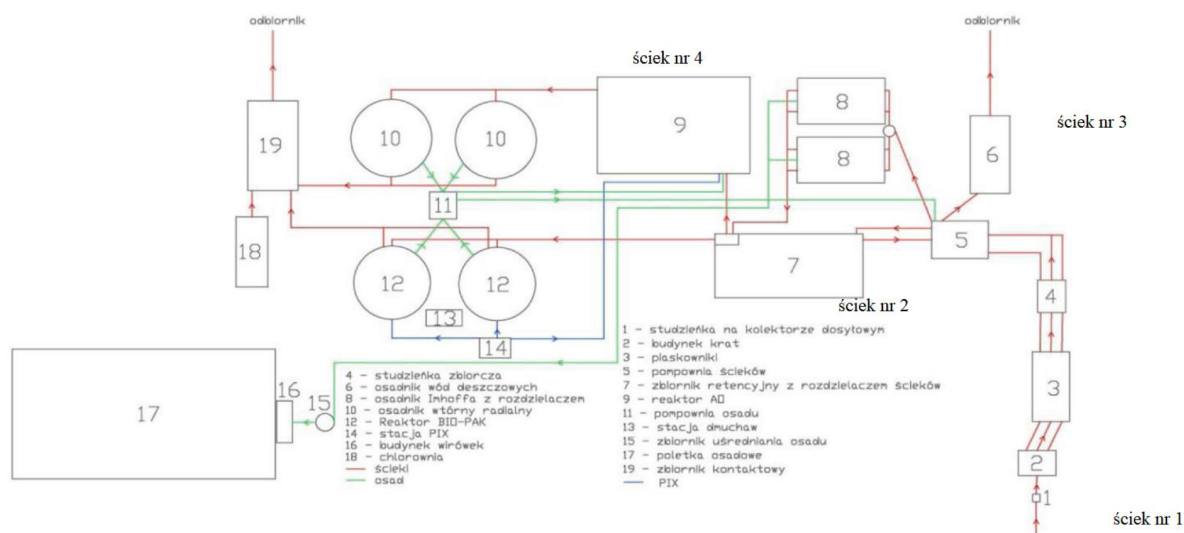
Aktywność MlrA w przypadku komórek *Synechocystis spp.* PCC 6803 McCormick 7 wzrasta znacząco względem kontroli już po 4-7 dniach prowadzenia hodowli. Przyczyną tego zjawiska mogła być wyższa zawartość związków organicznych w WW wykorzystywanych do produkcji białek lub zawartość metabolitów wtórnych pochodzących od organizmów wykorzystywanych do biodegradacji zanieczyszczeń na różnych etapach oczyszczania. W celu zbadania różnic w zawartości białka całkowitego wykreślono zależności zawartości białka w próbce od czasu dla odpowiednich prób z eksperymentu 2.6 (Dodatek, rys. 4). Z wykreślonej zależności wynika, że zawartość białka całkowitego względem kontroli w ostatnich punktach pomiarowych jest wyższa dla próbki zawierającej WW3, natomiast dla próbki z WW2 różnica nie występuje. Można więc wnioskować, że WW3 są wzbogacone zarówno o związki organiczne podnoszące wydajność produkcji białka całkowitego, jak i o metabolity wtórne pochodzenia mikrobiologicznego, które ukierunkowują metabolizm *Synechocystis spp.* PCC 6803 McCormick 7 na produkcję mikrocystynazy MlrA. WW2 natomiast są wzbogacone głównie o związki organiczne wykorzystywane przez te komórki do produkcji białek ogólnie. W celu zbadania, jakie związki organiczne i metabolity wtórne wpływają na produkcję białka całkowitego oraz w szczególności mikrocystynazy MlrA, potrzebne są dalsze badania ukierunkowane na analizy chemiczne i metabolomiczne badanych próbek WW.

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. 189, 2021.
- [14] Konstancja Gałat. Charakterystyka produkcji mikrocystynazy (MlrA) w szczepach autotroficznych *Synechocystis sp. PCC6803* z wykorzystaniem 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.

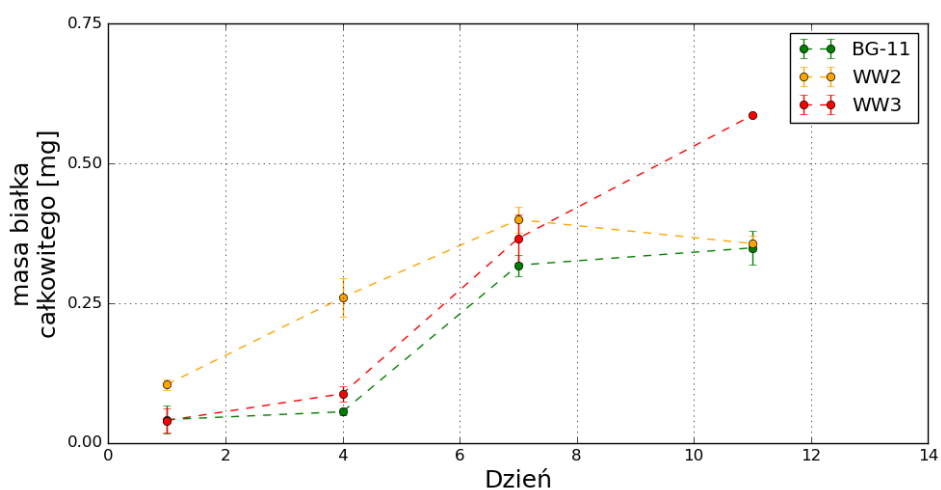
Dodatek



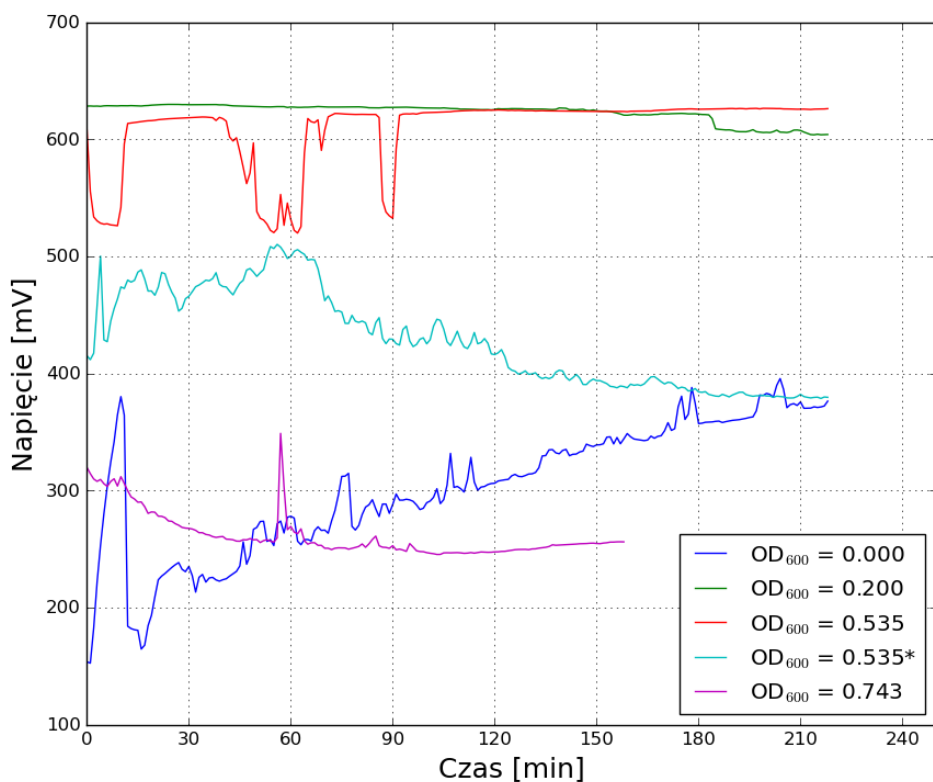
Rysunek 5: Schemat oczyszczalni ścieków w Myślenicach (Zaczerpnięto z: Miernik, W., Młynski, D., Chmielowski, K., & Karwacki, P. (1AD). WPŁYW ŚCIEKÓW OCZYSZCZONYCH NA OCZYSZCZALNI W MYŚLENICACH NA JAKOŚĆ WÓD ICH ODBIORNIKA. INFRASTRUKTURA I EKOLOGIA TERENÓW WIEJSKICH, I(1), 191–207.) Na rysunku oznaczono numerami 1-4 etapy oczyszczania, na których zostały pobrane badane później WW.

Tabela 1: Opis próbek WW1-4, które zostały pobrane z oczyszczalni ścieków w Myślenicach (rys. 4).

Numer WW	Opis
1	Ścieki surowe, zawierające również odpady stałe
2	Ścieki po usunięciu lipidów (flotacji)
3	Ścieki po kontakcie z osadem czynnym (procesy beztlenowe, stary zbiornik)
4	Ścieki po kontakcie z osadem czynnym (naprzemiennie procesy tlenowe i beztlenowe, cykl ok. 3 h)



Rysunek 6: Zależność zawartości białka całkowitego od czasu w próbkach z eksperymentu 2.6. Wartości były początkowo mierzone w celu normalizacji wyników aktywności MlrA.



Rysunek 7: Wykres pomiarów napięcia w układzie aMFC w czasie w zależności od gęstości hodowli *R. sphaeroides* umieszczonej w komorze z anodą. * Oznacza pomiar po 24 h adaptacji mikroorganizmów do anody.