

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii



**Wstępna analiza funkcjonalności
Mikrobiologicznego Ogniwia 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 Dzig

Pracownia Metabolomiki

Kraków, 2022

Spis treści

1	Wstęp	4
1.1	Historia MFC	4
1.2	Zastosowania MFC	4
1.3	Podstawy molekularne działania aMFC	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. sphaeroides</i> w pożywce z dodatkiem ścieków komunalnych	7
2.5	Badanie aktywności MlrA w <i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803 McCormick	7
2.6	Pomiary napięcia w układzie aMFC	8
3	Wyniki	8
4	Wnioski	10

Wykaz skrótów

aMFC algae microbial fuel cell. 3, 5, 6, 8, 10

BES bio-electrochemical system. 4

HPLC high-performance liquid chromatography. 6, 8

M27 Medium 27. 7–9

MFC microbial fuel cell. 3–5

MlrA microcystinase USTB-05. 3, 6–9

NASA National Aeronautics and Space Administration. 4

OD optical density. 3, 6–10

SEM standard error mean. 9

TFA trifluoroacetic acid. 8

WW wastewater. 3, 6–10

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. Aktywność MlrA (...). 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.

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. MlrA activity (...). 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.

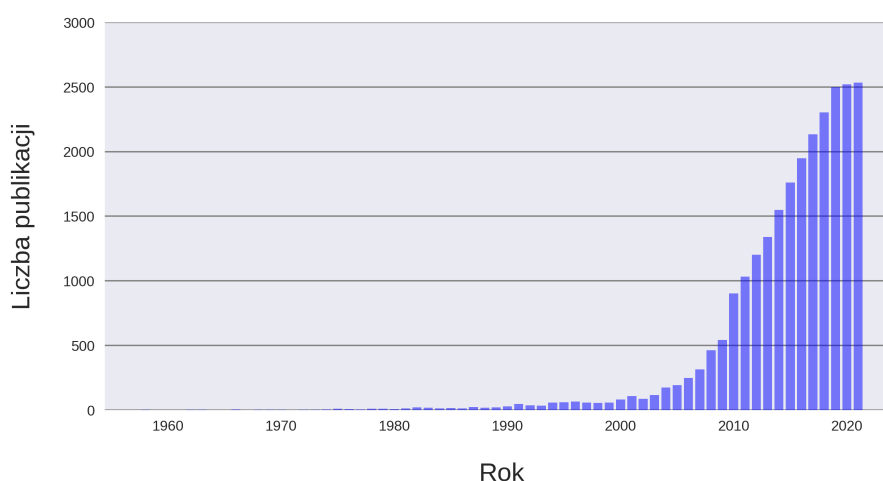
1 Wstęp

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

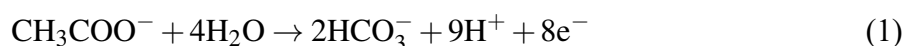


Rysunek 1: Liczba publikacji z „MFC” lub „microbial fuel cell” w tytule w latach 1958–2021. (Dane pochodzą z serwisu <https://webofscience.com>)

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. schematu 1 w dodatku. 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. Jako kontroli 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 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 pożywka BG-11. Obliczono, że mając hodowlę macierzystą o $\text{OD}_{600} = 0.746$, w celu osiągnięcia początkowego $\text{OD}_{600} = 0.200$, należy

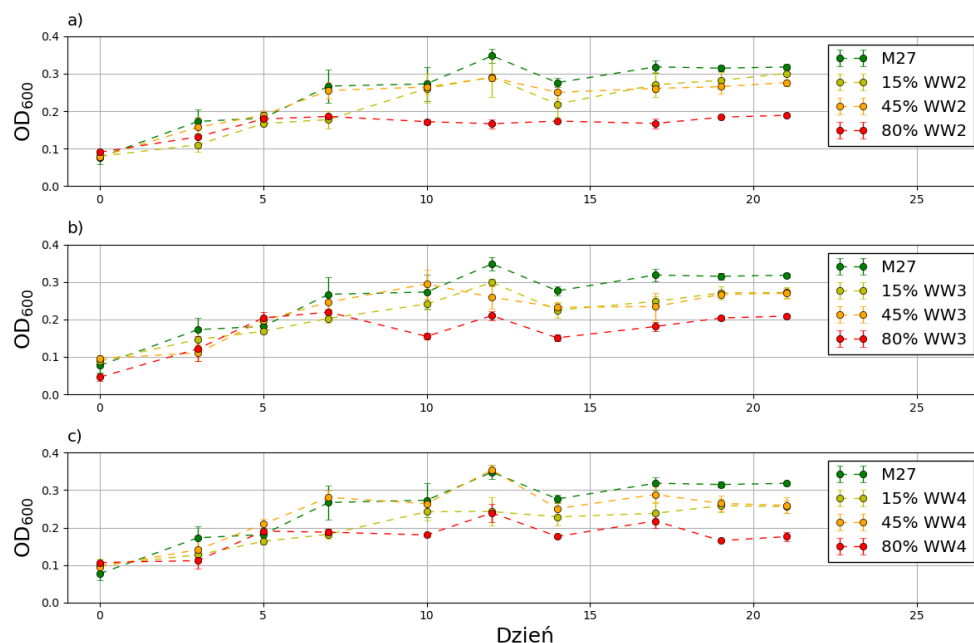
zawiesić komórki z odwirowanych (10733 RCF, 10 min) 10,72 ml hodowli pierwotnej w 40 ml nowej pożywki. Hodowle wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych. Markerem selekcyjnym była kanamycyna ($c = 50 \mu\text{g ml}^{-1}$). Zbierano próbki hodowli po 1 ml w 4, 7, 10 i 14 dniu eksperymentu i komórki 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-dółkowej przeprowadzono test aktywności MlrA. Do studzienek dodano po 45 μl mikrocytyny (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.

2.6 Pomiary napięcia w układzie aMFC

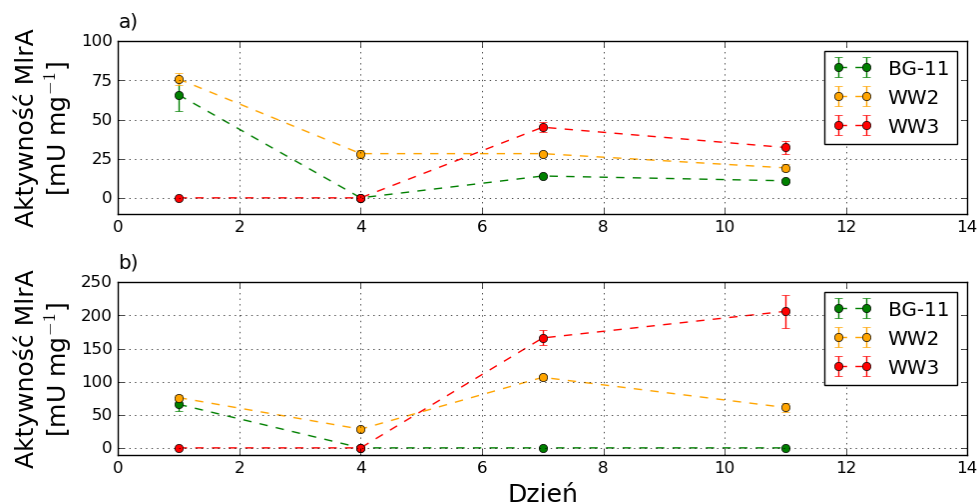
W tym eksperymencie badano wpływ gęstości hodowli *R. sphaeroides* w komorze z anodą na generowane w układzie aMFC napięcie. W komorze z katodą znajdowały się komórki *Synechocystis sp.* PCC 6803 McCormick 7 zawieszone w 250 ml BG-11 + 50 % WW2 ($\text{OD}_{600} = 1.000$). Początkowo w komorze z anodą znajdowało się 250 ml pożywki M27, jednak na samej elektrodzie był obecny wcześniej zaadaptowany biofilm *R. sphaeroides*. Dodawano po 1 ml stężonej zawiesiny *R. sphaeroides* i, po zmieszaniu, mierzono OD_{600} oraz zmiany napięcia prądu stałego (DC) przez ok. 200 min od momentu dodania kolejnej porcji zawiesiny komórek. Dla $\text{OD}_{600} = 0.743$ pomiary prowadzono przez ok. 160 min ze względu na awarię sprzętu, co podczas analizy statystycznej (3) przełożyło się na mniejszą liczbę powtórzeń (n).

3 Wyniki

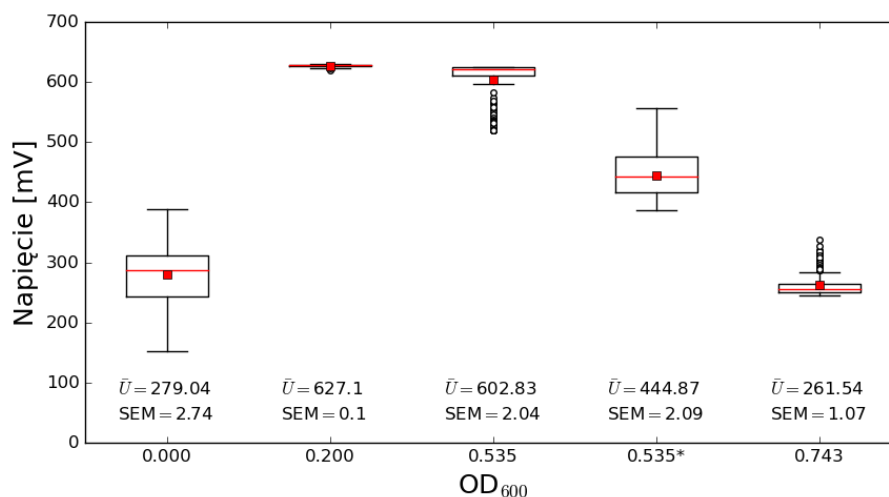
Na rys. 2 przedstawiono wyniki eksperymentu 2.4. W 10 dniu eksperymentu widoczny jest istotny statystycznie spadek OD_{600} w próbkach o $c_{\text{WW}} = 80\%$ względem próbek o niższych stężeniach. Oznacza to hamowanie wzrostu *R. sphaeroides* przy stężeniach WW 80 %. Z tego względu w kolejnych eksperymentach kultywowano *R. sphaeroides* na M27 + 50 % WW. Rys. 3 przedstawia wyniki eksperymentu 2.5. Dla BG-11 oraz WW2 zaobserwowano początkową wysoką aktywność MlrA i jej późniejszy spadek, natomiast w przypadku WW3 początkowa aktywność była bliska 0, a następnie wzrosła w czasie hodowli. Na rys. 4 przedstawiono wyniki pomiarów napięcia w eksperymencie 2.6. Z wykresu wynika, że największe napięcia generowane są w przypadku hodowli *R. sphaeroides* 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.



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: 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. DO ZMIANY!!!!



Rysunek 4: Wykres pudełkowy przedstawiający wyniki pomiaru napięcia prądu stałego (U) w czasie w zależności od OD_{600} hodowli *R. sphaeroides* znajdującej się w komorze z anodą. Uwzględnione zostały wartości ze 160 punktów pomiarowych rejestrowanych co 1 min. 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.

4 Wnioski

Wzrost *R. sphaeroides*, badany poprzez pomiar OD_{600} , 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 OD_{600} *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 metabolizm oraz związków wielocząsteczkowych wchodzących w skład śluzu bakteryjnego, który jest jedną z przyczyn wzrostu oporu wewnętrznego (wielkości mówiącej o spadku szybkości transferu elektronów w obrębie i poza biofilm).

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 gene-

- ration 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.