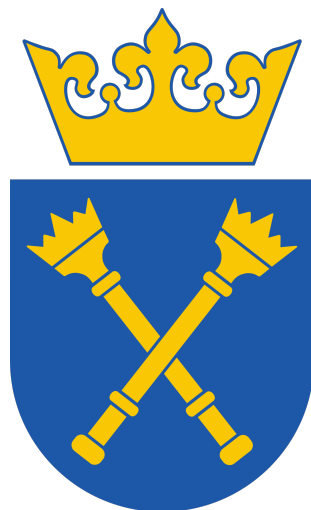


**Uniwersytet Jagielloński w Krakowie**  
**Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii**



**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

<b>Wykaz skrótów</b>	<b>3</b>
<b>1 Wstęp</b>	<b>4</b>
1.1 Historia MFC . . . . .	4
1.2 Zastosowania MFC . . . . .	4
1.3 Podstawy molekularne działania aMFC . . . . .	5
1.4 Cel pracy . . . . .	6
<b>2 Materiały i metody</b>	<b>6</b>
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 Analiza aktywności mlrA w <i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803 McCormick 7 . . . . .	7
2.6 Pomiary napięcia w układzie aMFC . . . . .	8
<b>3 Wyniki</b>	<b>8</b>
3.1 Wzrost <i>R. sphaeroides</i> na ściekach komunalnych . . . . .	8
3.2 Produkcja MlrA przez <i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803 McCormick 7 w hodowli z dodatkiem ścieków komunalnych . . . . .	9
3.3 Zależność napięcia w aMFC od gęstości <i>R. sphaeroides</i> . . . . .	10
<b>4 Wnioski</b>	<b>10</b>

## **Wykaz skrótów**

**aMFC** algae microbial fuel cell 2, 3, 5, 6, 8, 11, 14

**BES** bio-electrochemical system 4

**HPLC** high-performance liquid chromatography 6, 8

**M27** Medium 27 7–9

**MFC** microbial fuel cell 2–5

**MlrA** microcystinase USTB-05 2, 3, 6–11, 14

**NASA** National Aeronautics and Space Administration 4

**OD** optical density 2, 3, 6–11

**SEM** standard error mean 9

**TFA** trifluoroacetic acid 8

**WW** wastewater 2, 3, 6–11, 13

## Streszczenie

Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe (MFC) oparte są na metabolizmie mikroorganizmów oddychających beztlenowo, które uwalniają elektrony na anodę. Z kolei urządzenia aMFC (algae MFC) to klasa systemów MFC wykorzystujących dodatkowo jednokomórkowe organizmy autotroficzne do generowania tlenu niezbędnego podczas utylizacji elektronów na powierzchni katody. Celem konstruowania tego typu systemów jest produkcja energii elektrycznej, jednakże generowane natężenia są stosunkowo niskie, z czego wynika konieczność sprzężenia produkcji energii elektrycznej z innymi procesami, takimi jak oczyszczanie ścieków, czy produkcja wartościowych substancji. W niniejszej pracy testowano wstępnie możliwość wykorzystania w aMFC szczepów *R. sphaeroides* oraz *Synechocystis sp.* PCC 6803 (z heterologową ekspresją mikrocystynazy MlrA) rosnących na pożywkach zawierających ścieki komunalne (WW). Analiza wzrostu *R. sphaeroides* wykazała, że komórki tego szczepu dobrze funkcjonują przy wysokich zawartościach ścieków w pożywce. Wzrost został zahamowany dopiero przy stężeniach WW ok. 80 %, niezależnie od rodzaju stosowanych WW. Z kolei aktywność MlrA w hodowli *Synechocystis sp.* PCC 6803 była nawet wyższa dla próbek z WW względem próby kontrolnej, co mogło być spowodowane zawartością związków organicznych oraz metabolitów wtórnych indukujących produkcję białek i samego MlrA. Wyniki pomiarów napięcia w zaprojektowanym aMFC wskazują, że optymalna gęstość zawiesiny *R. sphaeroides* względem zastosowanej anody powinna mieścić się w zakresie OD<sub>600</sub> 0.2-0.5. Dalszy wzrost gęstości zawiesiny prowadzi najprawdopodobniej do wzrostu oporu wewnętrznego i spadków napięcia. W dalszej perspektywie będą prowadzone analizy funkcjonowania zaprojektowanego aMFC pod kątem poziomu generowania energii elektrycznej, produkcji MlrA oraz bioremediacji nutrientów zawartych w ściekach.

## Abstract

Microbial fuel cells (MFC) are based on metabolism of anoxic microorganisms that use anode as a final electron acceptor. In turn, aMFC (algae MFC) is a class of MFC systems additionally utilizing autotrophic microorganisms to generate molecular oxygen vital for electron disposal on the cathode surface. The goal of constructing this kind of systems is mainly the generation of electrical energy, however the power output is rather low. Therefore such an electricity production should be coupled with other processes such as a wastewater treatment or a production of valuable substances. In this thesis the possibility of employment (in aMFC) of *R. sphaeroides* and *Synechocystis sp.* PCC 6803 (with heterologous expression of microcystinase MlrA) growing on media containing municipal wastewater (WW) was tested. Growth analysis of *R. Sphaeroides* showed that cells of this strain are thriving and functioning quite well at high concentrations of wastewater in medium. Growth would only be inhibited at concentrations of WW about 80 %, independent of wastewater type. Furthermore, MlrA activity in *Synechocystis sp.* PCC 6803 McCormick 7 culture was even higher in media with WW than in a control sample which may be related to the presence of organic compounds and secondary metabolites inducing the production of proteins and MlrA specifically. The voltage measurement in the designed aMFC indicates that optimal density of *R. sphaeroides* suspension toward applied anode should be in range of OD<sub>600</sub> 0.2-0.5. Further increase of cell density most likely leads to the increased internal resistance and decreased voltage. Future prospects are to analyse functionality of the designed aMFC in terms of generated power outputs, MlrA production and bioremediation of nutrients from wastewater.

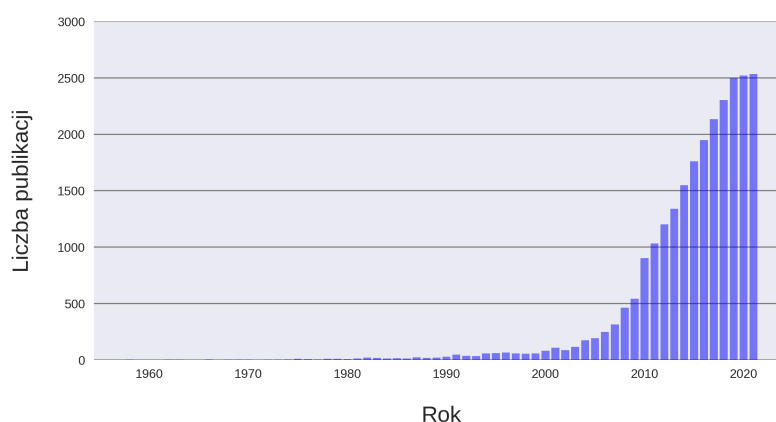
# 1 Wstęp

## 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 zaletami tych systemów są również ich długi czas działania bez konieczności konserwacji i obsługi [9] oraz niewymagające warunki operacyjne [3]. Obecne systemy oczyszczania ścieków

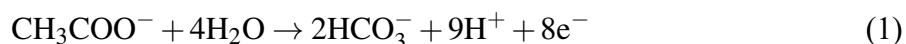


Rysunek 1: Liczba publikacji z „MFC” lub „microbial fuel cell” w tytule w latach 1958–2021. (Dane pochodzą z serwisu <https://webofscience.com>)

wykorzystujące osad czynny zużywają od 0.3 do 0.6 kWh m<sup>-3</sup> 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 CO<sub>2</sub>, 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 elektrotroficzných 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  $\beta$ . 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  $\Phi$ 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 cm<sup>2</sup>, jako anodę – 3 płytki z włókna węglowego o łącznej powierzchni całkowitej 84 cm<sup>2</sup> (warunki operacyjne układu:  $T = 20$  °C, intensywność oświetlenia mierzona w miejscu ustawienia butelek względem lampy była równa 70  $\mu$ mol fotonów m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). 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. 5 i tab. 1 (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  $28^\circ\text{C}$  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  $20^\circ\text{C}$  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 zaszczerpiono 1 ml pierwotnej hodowli *R. sphaeroides*. Pomiary  $\text{OD}_{600}$  były wykonywane przy pomocy spektrofotometru Unicam Helios  $\beta$ . 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  $\text{OD}_{595}$  przy pomocy czytnika mikropłytek BioRad iMark Microplate Reader (droga optyczna  $l$  odpowiada  $200 \mu\text{l}$  roztworu w studzience).

## 2.5 Analiza 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  $\text{OD}_{600} = 0.746$ , w celu osiągnięcia po-

czątkowego  $OD_{600} = 0.200$ , 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 ( $-20^\circ\text{C}$ ). 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  $\mu\text{l}$  mikrocystyny ( $1.5 \text{ mg ml}^{-1}$ ) i 5  $\mu\text{l}$  odpowiedniego, wcześniej zebranego nadsącza (lizatu) w różnych rozcieńczeniach (1x i 10x). Reakcję prowadzono przez 1 h, po czym zatrzymano ją poprzez dodanie 5  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  lizatu + 95  $\mu\text{l}$  buforu fosforanowego pH 7.0 + 100  $\mu\text{l}$  odczynnika Bradforda; **b** 2  $\mu\text{l}$  lizatu + 98  $\mu\text{l}$  buforu fosforanowego pH 7.0 + 100  $\mu\text{l}$  odczynnika; **c** 1  $\mu\text{l}$  lizatu + 99  $\mu\text{l}$  buforu fosforanowego pH 7.0 + 100  $\mu\text{l}$  odczynnika. Wykonano odpowiednie krzywe kalibracyjne.

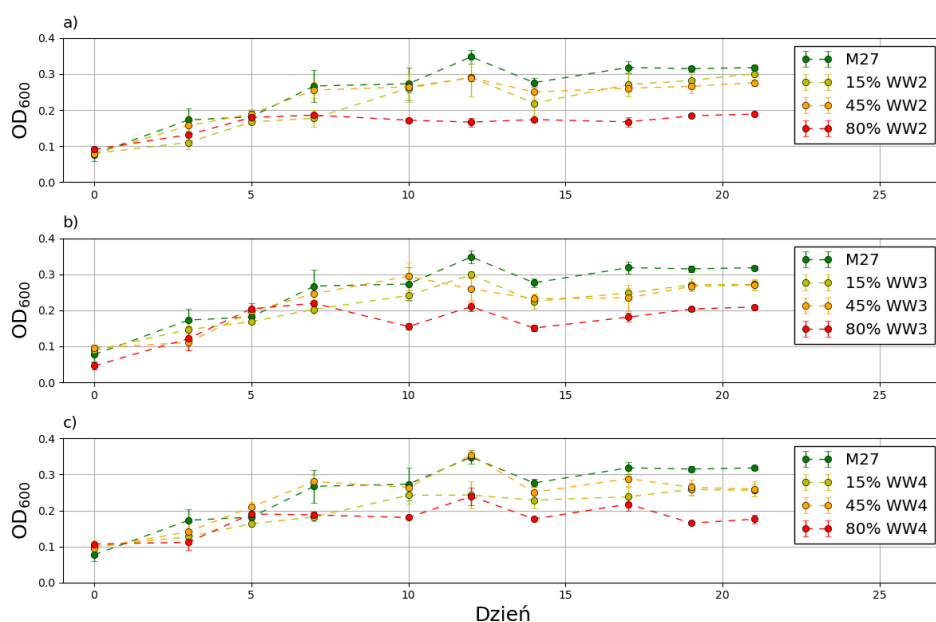
## 2.6 Pomiary napięcia w układzie aMFC

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 ( $OD_{600} = 1.000$ ). 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. Pomiary napięcia wykonywane były z częstotliwością 5 Hz.

## 3 Wyniki

### 3.1 Wzrost *R. sphaeroides* na ściekach komunalnych

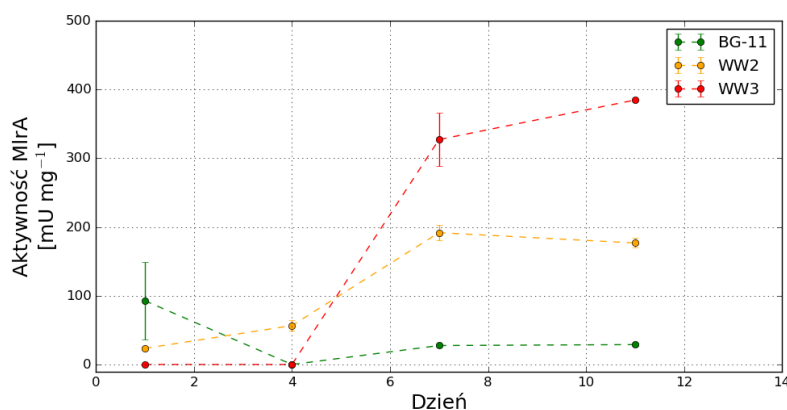
Na rys. 2 przedstawiono wyniki eksperymentu 2.4. W 10 dniu eksperymentu widoczny jest istotne statystycznie zahamowanie wzrostu  $OD_{600}$  w próbkach o  $c_{WW} = 80\%$  względem próbek o niższych stężeniach. Oznacza to hamowanie wzrostu *R. sphaeroides* przy stężeniach WW 80 %. Z tego względu w kolejnych eksperymentach kultywowano *R. sphaeroides* na M27 + 50 % WW.



Rysunek 2: Zmiany  $OD_{600}$  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 ( $n = 3$ ).

### 3.2 Produkcja MlrA przez *Synechocystis* sp. PCC 6803 McCormick 7 w hodowli z dodatkiem ścieków komunalnych

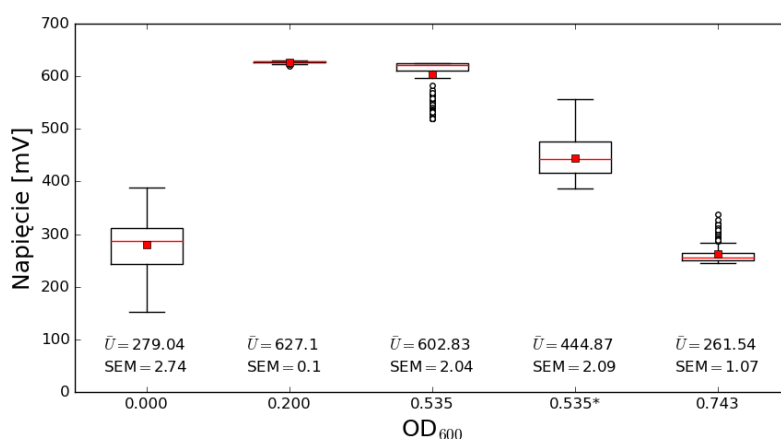
Na rys. 3 przedstawiono wyniki eksperymentu 2.5. W przypadku próby kontrolnej aktywność MlrA była największa na początku eksperymentu. Widoczny jest istotny wzrost aktywności względem próby kontrolnej, szczególnie dla próbek zawierających WW3. W tym przypadku wydaje się, że aktywność wzrasta asymptotycznie do wartości ok. 400  $mU\ mg^{-1}$ . W przypadku próby zawierającej WW2 wartością graniczną wydaje się być 200  $mU\ mg^{-1}$ .



Rysunek 3: 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 ( $n = 2 \vee n = 3$ ).

### 3.3 Zależność napięcia w aMFC od gęstości *R. sphaeroides*

Rys. 4 przedstawia wyniki pomiarów napięcia w eksperymencie 2.6. 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 OD<sub>600</sub> w zakresie od 0.200 do 0.535, przy czym hodowle gęstsze, o OD<sub>600</sub> bliskim 0.500 wykazują spadki napięcia po dłuższym czasie.



Rysunek 4: Wykres pudełkowy przedstawiający wyniki pomiaru napięcia prądu stałego ( $U$ ) w czasie w zależności od OD<sub>600</sub> 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.

## 4 Wnioski

Wzrost *R. sphaeroides*, badany poprzez pomiar OD<sub>600</sub>, 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.

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 wykorzystywa-

nych do biodegradacji zanieczyszczeń na różnych etapach oczyszczania. W celu zbadania różnic w zawartości białka całkowitego (będącego wskaźnikiem przyrostu biomasy) wykreślono zależności zawartości białka w próbce od czasu dla odpowiednich prób z eksperymentu 2.5 (Dodatek, rys. 6). Z wykreślonej zależności wynika, że zawartość białka 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 najprawdopodobniej wzbogacone (względem BG-11) zarówno o związki organiczne podnoszące wydajność produkcji biomasy, jak i o metabolity wtórne pochodzenia mikrobiologicznego, które ukierunkowują metabolizm *Synechocystis spp.* PCC 6803 McCormick 7 na produkcję mikrocystynazy MlrA. WW2 natomiast mogą być 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.

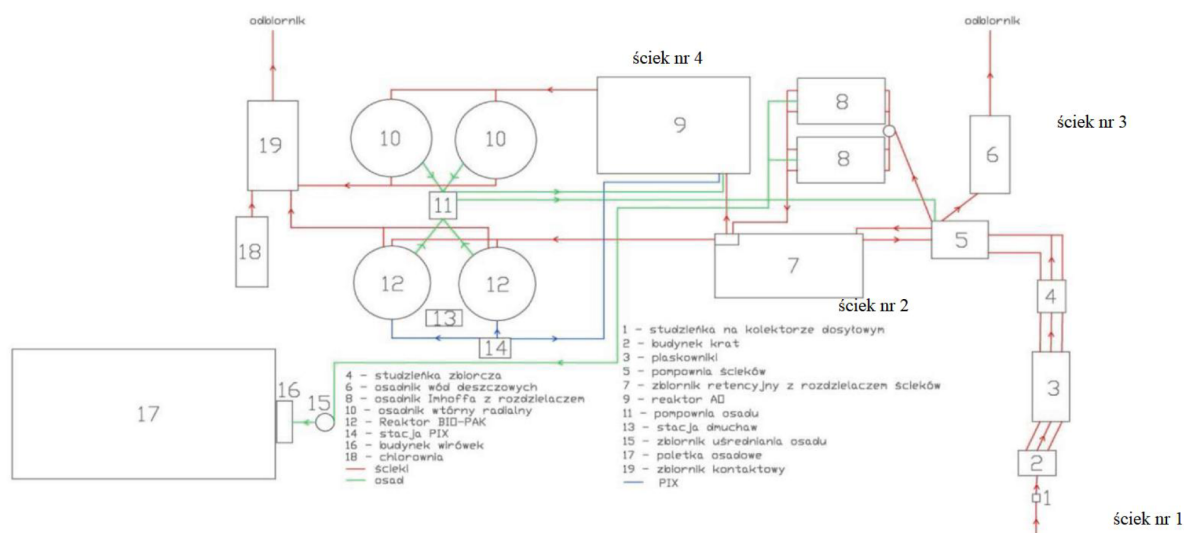
Początkowy wzrost napięcia w ogniwie aMFC w zależności od  $OD_{600}$  *R. sphaeroides* spowodowany jest wzrostem liczby komórek uwalniających elektrony na powierzchnię anody, generujących tym samym coraz wyższą różnicę potencjałów pomiędzy elektrodami. Późniejszy spadek napięcia wynika najpewniej z obecności zbyt dużej liczby komórek *R. sphaeroides* względem ograniczonej powierzchni elektrody. Wraz ze wzrostem liczby komórek rośnie ilość produkowanych metabolitów, które mogą hamować procesy subkomórkowe oraz związków wielko-cząsteczkowych wchodzących w skład śluzu bakteryjnego, który jest jedną z przyczyn wzrostu oporu wewnętrznego i w konsekwencji spadku napięcia.

## 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

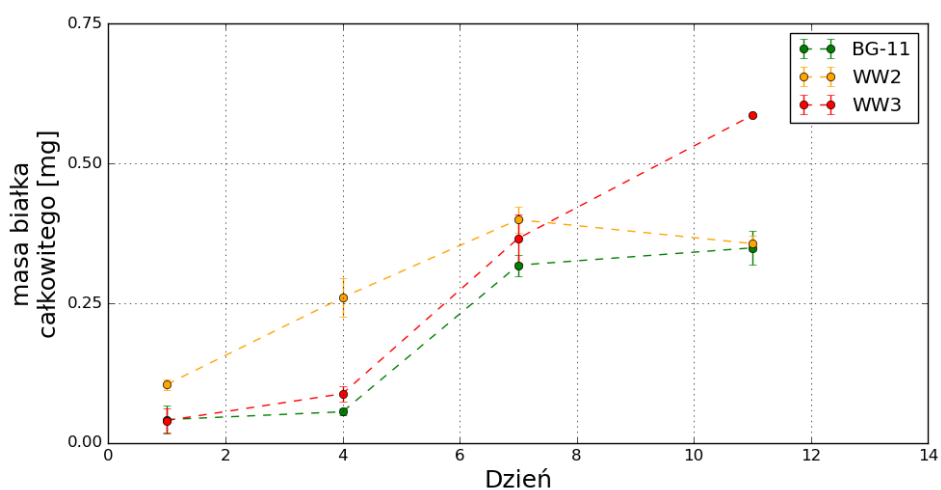


Rysunek 5: Schemat oczyszczalni ścieków w Myślenicach (Zaczerpnięto z: Miernik, W., Młynski, D., Chmielowski, K., & Karwacki, P. (1AD). WPŁYW ŚCIEKÓW OCZYSZCZONYCH NA OCZYSZCZALNI W MYŚLENICACH NA JAKOŚĆ WÓD ICH ODBIORNIKA. INFRASTRUKTURA I EKOLOGIA TERENÓW WIEJSKICH, I(1), 191–207.) Na rysunku oznaczono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

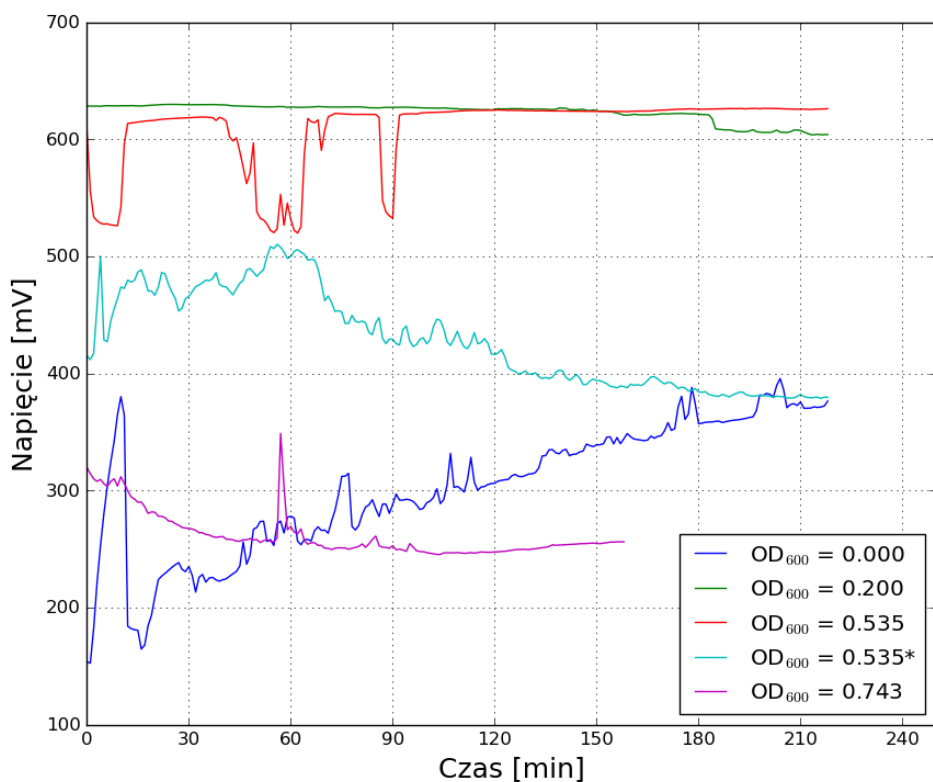
Tabela 1: Opis próbek WW1-4, które zostały pobrane z oczyszczalni ścieków w Myślenicach (rys. 4).

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 2.5. 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.