



Politechnika Wrocławska

DZIEDZINA: nauki ścisłe i przyrodnicze

DYSCYPLINA: nauki chemiczne

ROZPRAWA DOKTORSKA

Analiza mikrobiomu anodowego i jego funkcjonalności w układach bioelektrochemicznych wykorzystywanych do biodegradacji zanieczyszczeń hydrofobowych oraz syntezy biosurfaktantów

Mgr inż. Natalia Tyszkiewicz

Promotorzy:

dr hab. inż. Grzegorz Pasternak, prof. PWr

prof. dr hab. Piotr Młynarz

Słowa kluczowe: mikrobiologiczne ogniwa paliwowe, mikrobiom, genom, biosurfaktanty, biodegradacja, związki trudnodegradowalne, związki ropopochodne

WROCŁAW 2026

*Składam serdeczne podziękowania
Promotorowi Panu dr. hab. inż. Grzegorzowi Pasternakowi, prof. PWr
za poświęcony czas, umożliwienie realizacji badań,
za nieocenione wsparcie merytoryczne.
Dziękuję za cenne wskazówki, inspirujące dyskusje
oraz motywację do podejmowania kolejnych wyzwań badawczych.*

*Serdecznie dziękuję również
Promotorowi Panu Prof. dr. hab. Piotrowi Młynarzowi
za wieloletnią opiekę naukową, nieustające wsparcie oraz zaufanie,
którym obdarzał mnie przez cały okres naszej współpracy.
Szczególnie dziękuję za gotowość do pomocy w każdej sytuacji,
wrozumiałość oraz życzliwość, które miały ogromne znaczenie
zarówno dla powstania niniejszej pracy, jak i dla mojego rozwoju naukowego.*

*Bardzo dziękuję
pracownikom i doktorantom z kampusu na Gdańskiej, a w szczególności:
dr. inż. Aleksandrowi de Rosset, dr. inż. Bartoszowi Widerze, dr. inż. Denisowi Kopcowi,
mgr inż. Izabeli Walendzik, dr. inż. Darii Mincie, dr. inż. Karolinie Kordek-Khalil,
mgr inż. Katarzynie Gajewskiej, mgr Małgorzacie Ulatowskiej, mgr inż. Marcie Posadzy
za przyjaźń, wsparcie i wzajemną motywację,
które ułatwiały realizację pracy doktorskiej.*

*Dziękuję również
pracownikom Katedry Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii,
a w szczególności przyjaciółce dr. inż. Natalii Pudelko oraz dr. Jerzemu Wiśniewskiemu
za wsparcie oraz cenne rady podczas realizacji badań.*

*Pragnę podziękować
mojemu partnerowi Adamowi, mamie Agnieszce, rodzinie i przyjaciółom,
za wsparcie, niesłabnącą motywację i zrozumienie,
podczas realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej.*



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Niniejsza rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach projektu OPUS 17 „Mechanizmy transformacji materiałów odpadowych z przemysłu naftowego do biosurfaktantów” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (2019/33/B/NZ9/02774) oraz projektu NAWA STER InterDocSchool „Badania metagenomiczne społeczności drobnoustrojów oparte na sekwencji nukleotydów całych metagenomów” zrealizowanego na Uniwersytecie w Tartu, Estonia.

Spis treści

STRESZCZENIE	8
ABSTRACT.....	11
WYKAZ SKRÓTÓW	13
WYKAZ SYMBOLI	15
1. WSTĘP TEORETYCZNY	16
1.1. Wprowadzenie do problematyki.....	16
1.2. Źródło i charakterystyka związków trudnodegradowalnych.....	17
1.2.1. Zanieczyszczenia z przemysłu petrochemicznego	17
1.2.1.1. Benzen	19
1.2.1.2. Ropa naftowa	19
1.2.1.3. Olej napędowy	20
1.2.2. Zanieczyszczenia z przemysłu spożywczego.....	21
1.2.2.1. Posmażalnice oleje roślinne	21
1.3. Układy bioelektrochemiczne	22
1.3.1. Typy układów bioelektrochemicznych	22
1.3.2. Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe	23
1.3.2.1. Materiały anodowe.....	24
1.3.2.2. Materiały katodowe.....	25
1.3.2.3. Rodzaje membran	25
1.3.3. Czynniki wpływające na efektywność BES.....	26
1.3.3.1. Substrat.....	26
1.3.3.2. Źródło mikroorganizmów	27
1.3.3.3. Parametry środowiskowe: pH i temperatura.....	28
1.3.4. Parametry oceny wydajności BES.....	29
1.4. Mikrobiom anodowy.....	30
1.4.1. Egzoelektrogeny	31
1.4.2. Mechanizmy transportu elektronów	31
1.4.3. Biofilm anodowy	33
1.4.4. Mikroorganizmy syntroficzne i konkurencyjne w MFC	34
1.4.5. Czyste szczepy a mieszane społeczności mikrobiologiczne w MFC	37
1.5. Biosurfaktanty.....	38
1.5.1. Właściwości i klasyfikacja.....	38
1.5.2. Rola biosurfaktantów w degradacji zanieczyszczeń	41
1.5.3. Znaczenie biosurfaktantów w układach BES.....	43

2. CEL I ZAKRES PRACY	45
3. METODYKA I MATERIAŁY	46
3.1. Projektowanie i konstrukcja MFC	46
3.2. Materiał biologiczny	47
3.3. Pożywki mikrobiologiczne	48
3.4. Eksperymenty elektrochemiczne	48
3.4.1. Pomiar napięcia w czasie rzeczywistym (RTM)	48
3.4.2. Woltamperometria liniowa (LSV)	48
3.4.3. Chronoamperometria	49
3.4.4. Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (EIS)	49
3.4.5. Woltamperometria cykliczna (CV)	49
3.5. Analiza struktury i aktywności społeczności drobnoustrojów	49
3.5.1. Ekstrakcja DNA	49
3.5.2. Sekwencjonowanie regionu V3-V4 genu 16S rRNA	50
3.5.3. Sekwencjonowanie pełnego metagenomu	50
3.5.4. Analiza bioinformatyczna danych z sekwencjonowania 16S rRNA	50
3.5.5. Analiza bioinformatyczna danych z sekwencjonowania typu shotgun	51
3.5.6. Identyfikacja genów odpowiedzialnych za degradację węglowodorów	51
3.5.7. Wizualizacja danych	52
3.5.8. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (qPCR)	53
3.6. Techniki analityczne	53
3.6.1. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)	53
3.6.2. Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS/MS)	54
3.6.3. Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS)	55
3.7. Pomiary fizykochemiczne	56
3.7.1. Chemiczne zapotrzebowanie na tlen (ChZT) i wydajność kulombowska (CE)	56
3.7.2. Pomiary tlenu oraz pH	56
3.8. Ocena aktywności biosurfaktantów	56
3.8.1. Pomiar napięcia powierzchniowego	56
3.8.2. Testy emulsyfikacji	57
3.8.3. Stabilność piany	57
3.8.4. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)	57
3.9. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)	57
4. WYNIKI I DYSKUSJA	58

4.1. Biodegradacja benzenu w MFC.....	58
4.1.1. Inokulacja MFC oraz przebieg eksperymentu	58
4.1.2. Wydajność MFC	59
4.1.3. Analiza metabolitów metodą NMR	65
4.1.4. Analiza struktury i aktywności społeczności mikroorganizmów	67
4.1.5. Podsumowanie i wnioski	73
4.2. Biodegradacja oleju napędowego w MFC – wpływ potencjału anody na dynamikę rozwoju mikroorganizmów	76
4.2.1. Inokulacja MFC oraz przebieg eksperymentu	76
4.2.2. Wydajność MFC	77
4.2.3. Analiza struktury i dynamiki wzrostu mikroorganizmów	78
4.2.4. Podsumowanie i wnioski	84
4.3. Biodegradacja ropy naftowej w MFC	87
4.3.1. Porównanie różnych społeczności mikroorganizmów w MFC	87
4.3.1.1. Inokulacja MFC oraz przebieg eksperymentu	87
4.3.1.2. Wydajność MFC	89
4.3.1.3. Analiza struktury i aktywności społeczności mikrobiologicznych	93
4.3.1.4. Identyfikacja genów związanych z degradacją węglowodorów	108
4.3.1.5. Podsumowanie i wnioski	122
4.3.2. Podniesienie skali oraz wydajności ogniw dla wybranych społeczności mikroorganizmów.....	125
4.3.2.1. Inokulacja MFC oraz przebieg eksperymentu	125
4.3.2.2. Wydajność MFC	126
4.3.2.3. Stopień biodegradacji ropy naftowej w ogniwach	134
4.3.2.4. Analiza struktury społeczności mikroorganizmów	135
4.3.2.5. Analiza morfologii biofilmu bakteryjnego	137
4.3.2.6. Analiza biosurfaktantów uzyskanych w wyniku bioelektrosyntezy	139
4.3.2.7. Podsumowanie i wnioski	142
4.4. Biodegradacja oleju posmażalniczego w MFC	145
4.4.1. Inokulacja MFC oraz przebieg eksperymentu	145
4.4.2. Wydajność MFC	146
4.4.3. Analiza biosurfaktantów uzyskanych w wyniku bioelektrosyntezy.....	147
4.4.4. Analiza struktury społeczności mikroorganizmów	151
4.4.5. Podsumowanie i wnioski	152
5. PODSUMOWANIE	153
6. DOROBK NAUKOWY	156

6.1. Publikacje naukowe związane z rozprawą doktorską	156
6.2. Wystąpienia konferencyjne	156
6.3. Udział w projektach i grantach naukowych	158
6.4. Nagrody i wyróżnienia	158
6.5. Pozostała działalność naukowa i organizacyjna	159
7. SPIS TABEL I RYSUNKÓW	161
8. BIBLIOGRAFIA.....	169

STRESZCZENIE

Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe (MFC) to układy bioelektrochemiczne, w których mikroorganizmy przekształcają związki organiczne w energię elektryczną. W literaturze naukowej dominowały dotychczas publikacje koncentrujące się przede wszystkim na oczyszczaniu ścieków oraz wytwarzaniu energii elektrycznej. Zastosowanie MFC w biodegradacji złożonych, hydrofobowych zanieczyszczeń oraz w biosyntezie związków powierzchniowo czynnych pozostaje natomiast stosunkowo słabo zbadane. Pomimo rosnącego zainteresowania układami bioelektrochemicznymi, niewiele prac skupiało się na zależności między degradacją węglowodorów, aktywnością elektrochemiczną a syntezą biosurfaktantów w MFC. Niniejsza praca ma na celu wypełnienie tej luki poprzez kompleksową, interdyscyplinarną analizę procesów zachodzących w MFC, łącząc metody elektrochemiczne, mikrobiologiczne, metabolomiczne i metagenomiczne.

Celem niniejszej rozprawy było określenie struktury oraz funkcjonalności anodowych społeczności mikroorganizmów rozwijających się w MFC, zdolnych do biodegradacji związków ropopochodnych, produkcji biosurfaktantów oraz generowania energii elektrycznej w zróżnicowanych warunkach eksperymentalnych.

Na początkowym etapie pracy oceniono możliwość wykorzystania technologii MFC do biodegradacji benzenu jako modelowego związku aromatycznego. W tym celu zastosowano strategię inokulacji opartą na czystych szczepach, a następnie ich wzbogacanie osadem czynnym. Dodatkowo przeprowadzono analizę wpływu glukozy jako kosubstratu, co pozwoliło na ukształtowanie funkcjonalnych społeczności anodowych i uzyskanie rekordowych wartości gęstości mocy. Kompleksowa charakterystyka elektrochemiczna, mikrobiologiczna (16S rRNA) oraz metabolomiczna (NMR) wykazała wysoką efektywność bioelektrochemiczną układów, należącą do najwyższych dotychczas raportowanych w literaturze. Benzen pełnił rolę czynnika selekcyjnego, sprzyjając rozwojowi mikroorganizmów zdolnych do jego degradacji oraz transferu elektronów, w tym m.in. *Citrobacter freundii*, *Comamonas testosteroni*, *Arcobacter faecis*, *Myroides odoratus* oraz *Dysgonomonas sp.*

W kolejnym etapie pracy przeanalizowano wpływ przyłożonego potencjału do anody na strukturę i bioróżnorodność społeczności mikroorganizmów anodowych rozwijających się w układach MFC zasilanych olejem napędowym. Wykazano, że ujemna polaryzacja anody (-0,3 V) sprzyjała formowaniu się bardziej złożonych i funkcjonalnie wyspecjalizowanych biofilmów anodowych, co było związane z uzyskaniem najwyższej gęstości mocy. Społeczności rozwijające się przy tym potencjale charakteryzowały się wyższą bioróżnorodnością oraz zwiększonym udziałem taksonów zdolnych do bezpośredniego transferu elektronów i degradacji węglowodorów, w tym przedstawiciele rodzajów *Comamonas*, *Gordonia*, *Pseudomonas*, *Geobacter* oraz *Rhodococcus*. Uzyskane wyniki wykazały, że potencjał anody pełni kluczową rolę selekcyjną w kształtowaniu funkcjonalności mikrobiomu anodowego i efektywności elektrochemicznej układów MFC w procesie biodegradacji ropopochodnych.

Następnie oceniono zdolność do biodegradacji ropy naftowej oraz potencjał elektrochemiczny dziewięciu inokulów pochodzących ze zróżnicowanych nisz ekologicznych. Wykazano, że zastosowanie strategii kosubstratowej opartej na suplementacji octanem sodu pozwoliło na blisko 4-krotny wzrost średniej gęstości mocy, osiągając rekordową wartość 18,3 W/m³ dla mikroflory wzbogaconej z separatora związków ropopochodnych. Wysoka wydajność energetyczna była powiązana ze spadkiem napięcia powierzchniowego anolitów, co dowodzi aktywnej biosyntezy biosurfaktantów wspomagających biodostępność węglowodorów. W ramach pracy, po raz pierwszy określono występowanie genów funkcjonalnych zaangażowanych w degradację związków ropopochodnych w MFC (m.in. *nahB*, *tmoF*, *ladA* i *ahyA*). Wykazanie ich obecności w warunkach bioelektrodegradacji rzuca nowe światło na molekularne mechanizmy sprzężenia degradacji węglowodorów z zewnątrzkomórkowym transferem elektronów.

W dalszej części pracy podjęto próbę skalowania układów MFC oraz oceniono ich stabilność podczas długotrwałej eksploatacji. Do badań wyselekcjonowano trzy najbardziej efektywne konsorcja mikroorganizmów wzbogacone w układach MFC we wcześniejszym etapie. Wraz z trzykrotnym zwiększeniem powierzchni anody oraz czterokrotnym wzrostem objętości roboczej reaktora, odnotowano wzrost maksymalnej gęstości mocy o 42 %: z poziomu 18,3 W/m³ do 26 W/m³. Wynik ten jest ponad 4-krotnie wyższy od dotychczasowych doniesień literaturowych dla systemów zasilanych ropą naftową, zintegrowanych z produkcją biosurfaktantów. Wykorzystanie techniki LC-MS/MS umożliwiło identyfikację profilu biosurfaktantów produkowanych *in situ*, natomiast analiza metagenomiczna potwierdziła synergistyczne współistnienie taksonów egzoelektrogennych (*Geobacter anodireducens*, *Arcobacter faecis*) z gatunkami odpowiedzialnymi za biodegradację węglowodorów i biosyntezę związków powierzchniowo czynnych (*Pseudomonas stutzeri*, *Gordonia terrae*).

Ostatni etap pracy dotyczył eksperymentu związanego z wykorzystaniem oleju posmażalniczego jako substratu do syntezy biosurfaktantów w MFC. W pierwszej kolejności opracowano protokół analizy LC-MS/MS do identyfikacji ramnolipidów w próbkach anolitów. Na jego podstawie przeprowadzono analizy, które wykazały obecność jedenastu biosurfaktantów należących do grupy mono- oraz diramnolipidów. Przeprowadzone profilowanie taksonomiczne wykazało, że w społeczności anodowej dominował *Pseudomonas aeruginosa*, znany ze zdolności do zewnątrzkomórkowego transferu elektronów, produkcji mediatorów (np. piocyjaniny) oraz syntezy ramnolipidów. Obserwowana różnorodność ramnolipidów była większa niż w układach z frakcjami ropopochodnymi. Wynik ten wskazuje na możliwość wykorzystania oleju posmażalniczego jako substratu do produkcji biosurfaktantów w układach MFC.

Wyniki niniejszej dysertacji wskazują, że mikrobiologiczne ogniwa paliwowe stanowią efektywną platformę do jednoczesnej biodegradacji zanieczyszczeń hydrofobowych, produkcji biosurfaktantów i wytwarzania energii elektrycznej. Rodzaj inokulum, potencjał anody oraz charakter substratu determinują zarówno aktywność egzoelektrogenną, jak i strukturę społeczności mikroorganizmów a także jej zdolność

do biosyntezy surfaktantów. Uzyskane wyniki wnoszą istotny wkład w poznanie mechanizmów funkcjonowania społeczności mikroorganizmów w obecności złożonych węglowodorów oraz potwierdzają wysokie możliwości aplikacyjne technologii MFC w procesach bioremediacji oraz rozwoju zrównoważonych technologii energetycznych.

ABSTRACT

Microbial fuel cells (MFCs) are bioelectrochemical systems in which microorganisms convert organic compounds into electrical energy. To date, the scientific literature has predominantly focused on wastewater treatment and electricity generation. In contrast, the application of MFCs for the biodegradation of complex, hydrophobic pollutants and the biosynthesis of surface-active compounds remains relatively underexplored. Despite the growing interest in bioelectrochemical systems, few studies have focused on the relationship between hydrocarbon degradation, electrochemical activity, and biosurfactant synthesis in MFCs. This study aims to address this gap through a comprehensive, interdisciplinary analysis of the processes occurring in MFCs, integrating electrochemical, microbiological, metabolomic, and metagenomic approaches.

The objective of this dissertation was to characterize the structure and functionality of anodic microbial communities developing in MFCs, capable of hydrocarbon biodegradation, biosurfactant production, and electricity generation under diverse experimental conditions.

In the initial phase, the potential of MFC technology for the biodegradation of benzene, selected as a model aromatic compound, was evaluated. A strategy combining pure-strain inoculation followed by enrichment with activated sludge was employed. Additionally, the effect of glucose as a co-substrate was assessed, enabling the formation of functional anodic communities and achieving record power density values. Comprehensive electrochemical, microbiological (16S rRNA), and metabolomic (NMR) characterization demonstrated high bioelectrochemical efficiency, among the highest reported to date. Benzene acted as a selective factor, promoting the growth of microorganisms capable of its degradation and electron transfer, including *Citrobacter freundii*, *Comamonas testosteroni*, *Arcobacter faecis*, *Myroides odoratus*, and *Dysgonomonas sp.*

Subsequently, the influence of applied anode potential on the structure and biodiversity of anodic microbial communities in diesel-fed MFCs was investigated. It was shown that negative anode polarization (-0,3 V) promoted the formation of more complex and functionally specialized anodic biofilms, which correlated with the highest power density achieved. Communities developing under this potential exhibited higher biodiversity and an increased abundance of taxa capable of direct electron transfer and hydrocarbon degradation, including members of the genera *Comamonas*, *Gordonia*, *Pseudomonas*, *Geobacter*, and *Rhodococcus*. These results indicate that anode potential plays a key selective role in shaping the functionality of the anodic microbiome and the electrochemical performance of MFCs in hydrocarbon biodegradation processes.

The biodegradation potential of crude oil and the electrochemical activity of nine inocula from diverse ecological niches were then evaluated. Implementation of a co-substrate strategy using sodium acetate supplementation resulted in nearly a fourfold increase in average power density, reaching a record 18,3 W/m³ for microbial communities enriched from a petroleum compound separator. High energy efficiency was associated

with a decrease in the surface tension of the anolytes, indicating active biosurfactant synthesis that enhances hydrocarbon bioavailability. For the first time, this study identified the presence of functional genes involved in hydrocarbon degradation in MFCs, including *nahB*, *tmoF*, *ladA*, *ahyA*. Their detection under bioelectrodegradation conditions provides new insight into the molecular mechanisms coupling hydrocarbon degradation with extracellular electron transfer.

Further experiments addressed MFC scale-up and long-term operational stability. Three of the most efficient microbial consortia, enriched in the previous stage, were selected. Increasing the anode surface area three times and the reactor working volume four times resulted in a 42 % increase in maximum power density, from 18,3 W/m³ to 26 W/m³. This performance exceeds by more than fourfold previously reported values for crude oil-fed systems integrated with biosurfactant production. LC-MS/MS analysis enabled *in situ* identification of biosurfactant profiles, while metagenomic analysis confirmed the synergistic coexistence of exoelectrogenic taxa (*Geobacter anodireducens*, *Arcobacter faecis*) with species responsible for hydrocarbon degradation and surface-active compound biosynthesis (*Pseudomonas stutzeri*, *Gordonia terrae*).

The final stage of the study focused on an experiment using waste frying oil as a substrate for biosurfactant synthesis in MFCs. First, an LC-MS/MS analytical protocol was developed for the identification of rhamnolipids in anolyte samples. Based on this protocol, analyses revealed the presence of eleven biosurfactants, including both mono- and dirhamnolipids. Taxonomic profiling showed that the anodic community was dominated by *Pseudomonas aeruginosa*, known for its ability to perform extracellular electron transfer, produce mediators (e.g., pyocyanin), and synthesize rhamnolipids. The observed diversity of rhamnolipids was higher than in MFCs supplied with petroleum-derived fractions. These results indicate the potential of using waste frying oil as a substrate for biosurfactant production in MFC systems.

Overall, the results demonstrate that microbial fuel cells represent an effective platform for the simultaneous biodegradation of hydrophobic pollutants, biosurfactant production, and electricity generation. Inoculum type, anode potential, and substrate characteristics determine both exoelectrogenic activity and microbial community structure. These findings provide significant insights into the functioning of microbial communities in the presence of complex hydrocarbons and confirm the high application potential of MFC technology in bioremediation processes and the development of sustainable energy technologies.

WYKAZ SKRÓTÓW

- AEM**, ang. Anion Exchange Membrane – membrana anionowymienna
- API**, ang. American Petroleum Institute – Amerykański Instytut Naftowy
- ASV**, ang. amplicon sequence variants – unikalne sekwencje amplikonów
- BTEX** – benzen, toluen, etylobenzen i ksylen
- CE**, ang. Coulombic efficiency – efektywność kulombowska
- CEM**, ang. Cation Exchange Membrane – membrana kationowymienna
- ChZT** – chemiczne zapotrzebowanie na tlen
- CMC**, ang. Critical Micelle Concentration – krytyczne stężenie micelizacji
- CPE**, ang. constant phase element – element fazy stałej
- CV**, ang. Cyclic Voltammetry – woltamperometria cykliczna
- DET**, ang. Direct Electron Transfer – bezpośredni transfer elektronów
- DIET**, ang. Direct Interspecies Electron Transfer – bezpośredni międzygatunkowy transfer elektronów
- ECM**, ang. equivalent circuit model – model obwodu równoważnego
- EET**, ang. extracellular electron transfer – zewnątrzkomórkowy transfer elektronów
- EIS**, ang. Electrochemical Impedance Spectroscopy – elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna
- EPA**, ang. Environmental Protection Agency – amerykańska Agencja Ochrony Środowiska
- EPS**, ang. extracellular polymeric substances – zewnątrzkomórkowe substancje polimerowe
- ESI**, ang. electrospray ionization – jonizacja elektrorozpylaczem
- HDG**, ang. hydrocarbon degradation-related genes – geny związane z degradacją węglowodorów
- HMM**, ang. Hidden Markov Model – ukryty model Markowa
- HRT**, ang. Hydraulic Retention Time – czas retencji hydraulicznej
- IET**, ang. Indirect Electron Transfer – pośredni transfer elektronów
- LSV**, ang. Linear Sweep Voltammetry – woltamperometria liniowa
- MES**, ang. Microbial Electrosynthesis – mikrobiologiczna elektrosynteza
- MDC**, ang. Microbial Desalination Cell – mikrobiologiczne ogniwo odsalające

MEC, ang. Microbial Electrolysis Cell – mikrobiologiczne ogniwo elektrolizy

MSM, ang. mineral salt medium – podłoże mineralne

NGS, ang. next generation sequencing – sekwencjonowanie nowej generacji

OCV, ang. open circuit voltage – napięcie obwodu otwartego

OCP, ang. open circuit potential – potencjał obwodu otwartego

ORR, ang. oxygen reduction reaction – reakcja redukcji tlenu

qPCR, ang. quantitative Polymer Chain Reaction – ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy

PCA, ang. Principal Component Analysis – analiza głównych składowych

PMMA – polimetakrylan metylu

PP – polipropylen

PTFE – poli(tetrafluoroetylen)

RPKG, ang. reads per kilobase per genome – odczyty na kilobazę na genom

SHE, ang. Standard Hydrogen Electrode – standardowa elektroda wodorowa

SPE, ang. solid phase extraction – ekstrakcja do fazy stałej

SRB, ang. sulfate-reducing bacteria – bakterie redukujące siarkę

ST, ang. surface tension – napięcie powierzchniowe

TEA, ang. Terminal Electron Acceptor – ostateczny akceptor elektronów

TLC, ang. thin layer chromatography – chromatografia cienkowarstwowa

WR – węglowodory ropopochodne

WWA – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

WYKAZ SYMBOLI

Symbol	Znaczenie	Jednostka
A_{AN}	Powierzchnia geometryczna anody	m^2
A_K	Powierzchnia katody	m^2
CE	Efektywność kulombowska	%
ChZT	Chemiczne zapotrzebowanie na tlen	mg/L
E	Potencjał elektrody mierzony względem standardowej elektrody wodorowej jako elektrody odniesienia	mV vs SHE
E_{24}	Indeks emulsyfikacji	%
F	Stała Faradaya	C/mol
h_0	Początkowa wysokość piany	cm
h_{10}	Wysokość piany po 10 minutach	cm
HRT	Czas retencji hydraulicznej	h
I	Natężenie prądu	A
OCV	Napięcie obwodu otwartego	V
OCP	Potencjał obwodu otwartego	V
P	Gęstość mocy	$W/m^2, W/m^3$
R	Rezystancja	Ω
R_A	Rezystancja anody	Ω
R_{wew}	Rezystancja wewnętrzna układu	Ω
R_K	Rezystancja katody	Ω
R_{M+E}	Rezystancja sumy składników: oporów membrany i oporów elektrolitu	Ω
R_{zew}	Rezystancja zewnętrzna	Ω
ST	Napięcie powierzchniowe	mN/m
T	Temperatura	$^{\circ}C$
t	Czas	dni, tygodnie
U	Napięcie	V
V_{An}	Objętość anolitu	cm^3
V_R	Objętość robocza komory anodowej	cm^3
Z_{Im}	Impedancja urojona	Ω
Z_{Re}	Impedancja rzeczywista	Ω
$\Delta ChZT$	Zmiana stężenia ChZT	%

1. WSTĘP TEORETYCZNY

1.1. Wprowadzenie do problematyki

Zanieczyszczenie środowiska trudnodegradowalnymi substancjami organicznymi stanowi jedno z najistotniejszych wyzwań współczesnego społeczeństwa. Szczególnie problematyczne są zanieczyszczenia hydrofobowe. Do tej grupy zalicza się węglowodory aromatyczne i alifatyczne oraz ich mieszaniny: ropa naftowa czy olej napędowy z przemysłu petrochemicznego, a także posmażalnice oleje roślinne pochodzące z przemysłu spożywczego.

Zanieczyszczenia z przemysłu petrochemicznego charakteryzują się wysoką trwałością, toksycznością oraz zdolnością do akumulacji w glebie i osadach. [1]. Natomiast zużyte oleje roślinne, z powodu nieodpowiedniej utylizacji mogą powodować poważne problemy środowiskowe, poprzez blokowanie systemów kanalizacji oraz zanieczyszczając wodę oraz glebę [2]. Występowanie tych zanieczyszczeń nie tylko prowadzi do pogorszenia jakości środowiska naturalnego, lecz również generuje istotne zagrożenia zdrowotne i ekologiczne. W związku z tym kluczowe znaczenie nabiera rozwój efektywnych, zrównoważonych i ekologicznych metod ich usuwania.

Jednym z najczęściej stosowanych podejść w tym obszarze jest bioremediacja, czyli proces wykorzystujący organizmy żywe, takie jak: bakterie, grzyby i rośliny, do rozkładu i neutralizacji substancji szkodliwych. Technologia ta charakteryzuje się relatywnie niskim kosztem, minimalnym wpływem na środowisko oraz możliwością stosowania w szerokim zakresie warunków środowiskowych. Bioremediacja pozwala nie tylko usuwać zanieczyszczenia, ale także przywracać funkcje ekologiczne zdegradowanych obszarów [3].

Klasyczne metody bioremediacji bazują na procesach naturalnych lub kontrolowanych, w których organizmy przekształcają zanieczyszczenia w produkty nieszkodliwe, takie jak dwutlenek węgla, woda czy biomasa [4]. Procesy te mogą przebiegać w warunkach tlenowych i beztlenowych, przy czym dostępność tlenu w znacznym stopniu determinuje ich efektywność. W środowiskach tlenowych degradacja przebiega szybciej, ponieważ tlen jest efektywnym akceptorem elektronów dla mikroorganizmów [5]. Z kolei w warunkach beztlenowych, np. w glebie, osadach dennych czy wodach gruntowych, mikroorganizmy wykorzystują alternatywne akceptory elektronów, takie jak azotany, siarczany czy związki żelaza. To prowadzi do wolniejszej i bardziej selektywnej degradacji [6].

Efektywność klasycznej bioremediacji bywa ograniczona przez brak odpowiednich mikroorganizmów, niską biodostępność zanieczyszczeń, długi czas degradacji oraz konieczność dostarczenia zewnętrznego akceptora elektronów [7]. Alternatywę stanowi bioelektrochemicznie wspomagana bioremediacja, realizowana z wykorzystaniem układów bioelektrochemicznych (BES, ang. bioelectrochemical system),

w szczególności mikrobiologicznych ogniw paliwowych (MFC, ang. Microbial Fuel Cell). W układach tych mikroorganizmy anodowe utleniają związki organiczne i przekazują elektrony na elektrodę, co umożliwia jednoczesną degradację zanieczyszczeń oraz odzysk energii elektrycznej [8].

Obecność elektrody anodowej jako wydajnego, ciągłego akceptora elektronów pozwala na efektywne prowadzenie procesów degradacyjnych również w warunkach beztlenowych i sprzyja selekcji mikroorganizmów zdolnych do zewnątrzkomórkowego transferu elektronów. Wykazano, że środowisko anodowe MFC silnie stymuluje rozwój bakterii degradujących węglowodory, których liczebność w okolicy anody może wzrastać nawet o dwa rzędy wielkości, co intensyfikuje rozkład związków trudnodegradowalnych [9]. Zastosowanie MFC znacząco zwiększa skuteczność bioremediacji. W pracy Morris i in. [10] odnotowali wzrost efektywności beztlenowej biodegradacji oleju napędowego z 31 % do 82 %. Natomiast w pracy Kumar i in. [11] podsumowano badania wskazujące, że w MFC degradacja węglowodorów aromatycznych może przebiegać z wykorzystaniem elektrody jako końcowego akceptora elektronów. Co więcej, liczne prace potwierdzają, że technologia MFC może przewyższać klasyczne metody bioremediacji pod względem tempa i skuteczności rozkładu związków ropopochodnych [12], [13], [14].

Zastosowanie MFC w bioremediacji łączy zatem dwa kluczowe cele: oczyszczanie środowiska oraz pozyskiwanie energii elektrycznej w sposób zintegrowany i zrównoważony. Technologia ta sprzyja projektowaniu samowystarczalnych układów bioelektrochemicznych, zdolnych do efektywnej degradacji opornych zanieczyszczeń bez konieczności dostarczania zewnętrznych akceptorów elektronów. W niniejszej rozprawie dokonano analizy potencjału bioelektrochemicznie wspomaganiej bioremediacji, z wykorzystaniem technologii MFC, w odniesieniu do aktualnych potrzeb i wyzwań w ochronie środowiska.

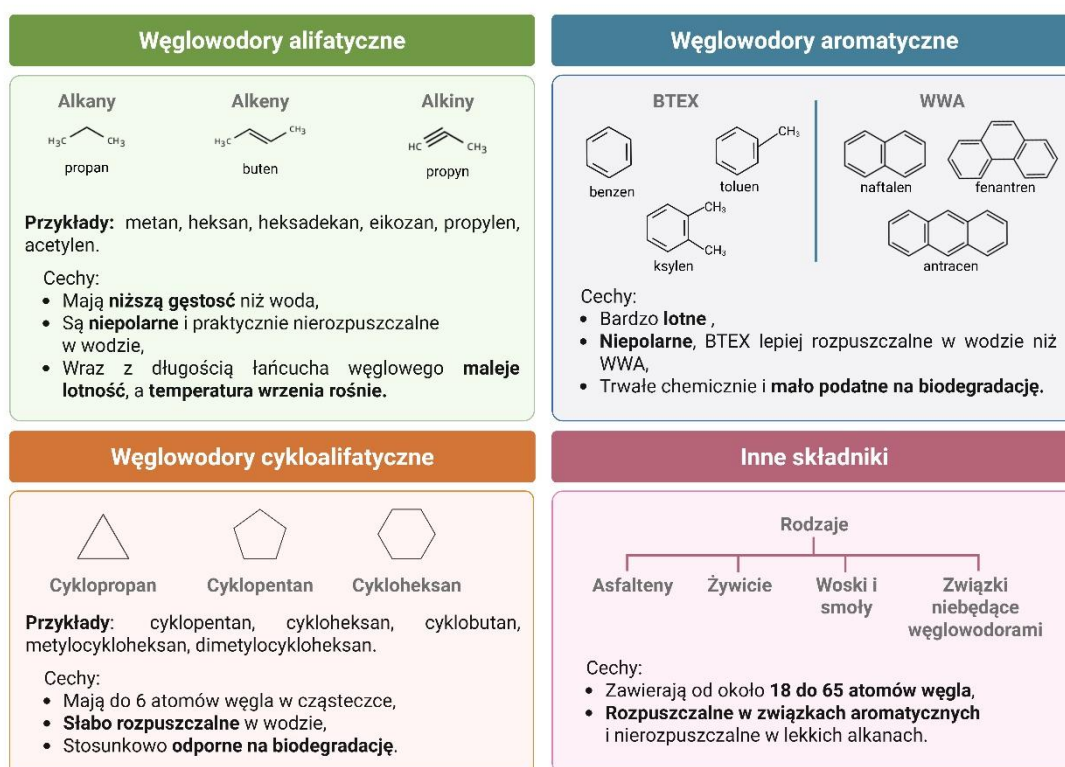
1.2. Źródło i charakterystyka związków trudnodegradowalnych

1.2.1. Zanieczyszczenia z przemysłu petrochemicznego

Przemysł petrochemiczny jest fundamentem światowej gospodarki, przekształcając surowce kopalne w produkty niezbędne w niemal wszystkich sektorach życia: od transportu po nowoczesne technologie. Wykorzystuje surowce, takie jak ropa naftowa i gaz ziemny, do produkcji paliw, tworzyw sztucznych, kauczuku, rozpuszczalników, nawozów sztucznych czy farmaceutyków [15], [16]. Intensywne wykorzystanie tych produktów w motoryzacji, budownictwie, rolnictwie oraz przemyśle chemicznym wiąże się jednak z masową emisją i uwalnianiem do biosfery szerokiej grupy związków określanych jako węglowodory ropopochodne (WR).

Ze względu na zróżnicowanie chemiczne, węglowodory ropopochodne klasyfikuje się zazwyczaj na podstawie ich budowy. Na tej podstawie wyróżnia się cztery główne grupy,

które przedstawiono na poniższym schemacie (**Rysunek 1**): (i) alifatyczne – alkany, alkeny i alkiny; (ii) cykloalifatyczne – np. cykloalkany; (iii) aromatyczne – w tym lotne związki BTEX (ang. BTEX – benzen, toluen, etylobenzen i ksylen) oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA); a także (iv) pozostałe frakcje, takie jak asfalteny, woski, smoła i żywice. Taki podział jest istotny z punktu widzenia ich toksyczności, mobilności oraz podatności na procesy degradacyjne, zarówno biologiczne, jak i fizykochemiczne [17].



Rysunek 1 Podział węglodorów ropopochodnych (WR) na główne grupy: alifatyczne, cykloalifatyczne, aromatyczne oraz pozostałe frakcje (asfalteny, woski, smoły, żywice).

Działalność sektora przemysłu petrochemicznego obejmuje wydobycie, przetwarzanie, dystrybucję i magazynowanie surowców, wiążąc się jednocześnie z istotnym ryzykiem ekologicznym [18]. Substancje te, uwalniane w wyniku procesów eksploatacyjnych oraz awarii, stanowią złożone mieszaniny węglodorów o właściwościach toksycznych, mutagennych i kancerogennych [19]. Ze względu na wysoką trwałość oraz niską podatność na naturalną biodegradację, wiele z nich zostało sklasyfikowanych przez amerykańską Agencję Ochrony Środowiska (EPA, ang. Environmental Protection Agency) jako zanieczyszczenia priorytetowe, stanowiących zagrożenie dla zdrowia ludzi oraz funkcjonowania ekosystemów [20]. Emisje i wycieki produktów ropopochodnych przyczyniają się do zanieczyszczeń gleb, wód i powietrza [1], [21]. Produkty takie jak paliwa, smary i inne produkty rafineryjne zawierają złożone mieszaniny węglodorów ropopochodnych, które wykazują działanie toksyczne, mutagenne i kancerogenne.

Zachowanie WR w środowisku uzależnione jest od wielu czynników, w tym rodzaju gleby, zawartości materii organicznej, zasolenia, dynamiki wód gruntowych oraz obecności współzanieczyszczeń. Parametry te wpływają na biodostępność i transport zanieczyszczeń, co w konsekwencji ogranicza efektywność samooczyszczania ekosystemów [22], [23]. Obecność WR pogarsza jakość wód i gleb, zaburza strukturę mikrobiomu oraz prowadzi do bioakumulacji w łańcuchach troficznych. Szczególne zagrożenie stanowią frakcje aromatyczne o działaniu neuro- i immunotoksycznym. Długotrwały kontakt z tymi związkami skutkuje przewlekłymi uszkodzeniami wielu narządów, w tym wątroby i nerek, a także zaburzeniami pracy układów: oddechowego, moczowego i hormonalnego [24].

W dalszej części rozdziału zostaną szczegółowo omówione trzy substancje modelowe, które reprezentują różne klasy WR: benzen jako toksyczny związek aromatyczny, ropa naftowa jako wieloskładnikowy surowiec naturalny oraz olej napędowy jako przykład mieszaniny średniołańcuchowych alkanów i aromatów.

1.2.1.1. Benzen

Jest to najprostszy węglowodór aromatyczny występujący jako bezbarwna, klarowna ciecz o słodkawym zapachu. Charakterystyczną cechą benzenu jest sześcioczłonowy pierścień aromatyczny, w którym elektrony są zdelokalizowane, co nadaje cząsteczce dużą stabilność. Wykazuje się wysoką lotnością, łatwopalnością oraz słabą rozpuszczalnością w wodzie (1,88 g/L przy 23,5 °C) [25]. Jego unikalna struktura i właściwości sprawiają, że znajduje szerokie zastosowanie w przemyśle chemicznym. Benzen jest cennym surowcem do syntezy związków organicznych, w tym aromatycznych węglowodorów, fenolu, nitrobenzenu, aniliny oraz szeregu pochodnych, które stanowią podstawę do produkcji tworzyw sztucznych, żywic, barwników, leków, detergentów i pestycydów. Ze względu na swoją zdolność do rozpuszczania wielu substancji organicznych, był stosowany jako rozpuszczalnik. Jednak z uwagi na swoją toksyczność, jego zastosowanie w tej roli zostało ograniczone. Benzen przedostaje się do środowiska głównie w wyniku działalności przemysłu takiej jak rafinacja ropy naftowej, spalanie paliw, składowanie odpadów czy wycieki produktów naftowych ze zbiorników magazynowych i rurociągów [26]. Benzen zawarty w dymie tytoniowym oraz spalinach samochodowych wpływa na wzrost zanieczyszczenia powietrza i wraz z opadami atmosferycznymi może trafiać do gleb i wód powierzchniowych [27]. Benzen jest klasyfikowany jako substancja rakotwórcza dla ludzi. Długotrwałe narażenie na działanie benzenu zwiększa ryzyko rozwoju nowotworów, zwłaszcza krwi [28].

1.2.1.2. Ropa naftowa

Ropa naftowa pokrywa około jednej trzeciej światowego zapotrzebowania na energię, co czyni ją jednym z kluczowych surowców we współczesnej gospodarce [29]. Służy również jako substrat do produkcji paliw, tworzyw sztucznych, olejów, rozpuszczalników i innych produktów petrochemicznych.

Jest to naturalnie występująca ciecz, składająca się głównie z węglowodorów o zróżnicowanych strukturach i długościach łańcucha oraz innych związków organicznych zawierających heteroatomy siarki, tlenu, azotu oraz metali takich jak żelazo, miedź, nikiel czy wanad. W mniejszym stopniu w jej skład wchodzi związkami nieorganiczne, takie jak woda, siarkowodor czy sole metali [30]. Mimo, że związki niewęglowodorowe stanowią niewielki procent składu ropy naftowej to mają decydujący wpływ na katalityczne przetwarzanie surowca. Skład ropy naftowej jest bardzo złożony i może zawierać setki różnych związków organicznych, głównie węglowodorów i związków siarki [31]. Jego szczegółowa charakterystyka jest unikalna dla każdego złoża i wynika z uwarunkowań geologicznych danego obszaru [32].

Właściwości fizyczne ropy naftowej, takie jak gęstość, lepkość i lotność, charakteryzują się dużą zmiennością. Kluczowym parametrem określającym ten surowiec jest indeks API (ang. American Petroleum Institute), stanowiący miarę gęstości ropy naftowej w stosunku do wody. Służy on do klasyfikacji ropy jako lekkiej, średniej lub ciężkiej. Im wyższa wartość API, tym lżejsza ropa naftowa. Ropa może przyjmować różne barwy, od bezbarwnej do czarnej, przy czym ropy o niższym indeksie API są zwykle ciemniejsze [30]. W zależności od dominującego rodzaju węglowodorów, ropy naftowe dzielimy na parafinowe (z przewagą alkanów), naftenowe (bogate w cykloalkany, aromaty) oraz mieszane [33].

Ze względu na obecność toksycznych frakcji, takich jak BTEX i WWA, ropa naftowa stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi oraz dla środowiska. Kwestie te zostały szczegółowo omówione we wprowadzeniu do niniejszego rozdziału. W przypadku wycieków do środowiska, zwłaszcza w rejonach wodnych i przybrzeżnych, ciężkie frakcje ropy wykazują tendencję do akumulacji w osadach dennych. W takich warunkach mogą utrzymywać się przez długi czas, wykazując niską podatność na biodegradację. Ograniczony dostęp do tlenu i światła znacząco spowalnia procesy rozkładu, co sprzyja ich długotrwałej obecności w środowisku [34]. Ponadto obecność ropy wpływa negatywnie na mikroorganizmy glebowe i wodne. Prowadzi to do zaburzenia równowagi biologicznej oraz zakłócenia procesów związanych z naturalnym obiegiem pierwiastków. [35].

1.2.1.3. Olej napędowy

Olej napędowy (diesel) to frakcja węglowodorowa otrzymywana w procesie destylacji ropy naftowej, należąca do grupy średnich destylatów. Ze względu na swoje właściwości energetyczne i łatwość transportu stanowi jedno z najczęściej stosowanych paliw ciekłych w transporcie drogowym, morskim i kolejowym, a także w sektorze przemysłowym i energetycznym.

Pod względem składu chemicznego olej napędowy to mieszanina węglowodorów alifatycznych o długości łańcucha od około C₉ do C₂₀, cykloalkanów, związków olefinowych oraz węglowodorów aromatycznych, w tym benzenu i WWA [36]. Oprócz

dominujących związków węglowodorowych, zawiera on również niewielkie ilości siarki, azotu i tlenu. W warunkach ciśnienia atmosferycznego temperatura wrzenia tej frakcji mieści się w zakresie od 160 do 380 °C w warunkach ciśnienia atmosferycznego [37]. Z uwagi na zbliżone temperatury wrzenia zanieczyszczeń siarkowych i frakcji olejowych, większość siarki koncentruje się w oleju napędowym w trakcie procesu rafinacji. Dlatego olej napędowy charakteryzuje się zawartością dużej ilości siarki (nawet do 5 % wag.), co ma bezpośredni wpływ na charakterystykę spalania tego paliwa i przyczynia się do emisji zanieczyszczeń, które stwarzają zagrożenie dla zdrowia, zwłaszcza względem układu oddechowego [38].

1.2.2. Zanieczyszczenia z przemysłu spożywczego

Działalność przemysłu spożywczego prowadzi do powstawania różnorodnych zanieczyszczeń. Ich źródłem są surowce, stosowane procesy technologiczne oraz powstające produkty uboczne i odpady. W szczególności procesy obróbki termicznej sprzyjają tworzeniu związków niepożądanych o podwyższonej reaktywności chemicznej i potencjalnej toksyczności. Niewłaściwe zagospodarowanie tych zanieczyszczeń stanowi istotny problem środowiskowy i technologiczny [39].

1.2.2.1. Posmażalnice oleje roślinne

Wśród zanieczyszczeń generowanych przez przemysł spożywczy szczególne znaczenie mają odpady powstające w wyniku procesów smażenia, w tym posmażalnice oleje roślinne. Do procesów smażenia powszechnie stosuje się oleje roślinne ze względu na ich właściwości, które różnią się w zależności od składu chemicznego i wpływają na temperaturę dymienia oraz stabilność termiczną. Głównymi składnikami olejów roślinnych są triacyloglicerole (zazwyczaj >95 %) oraz diacyloglicerole (<5 %). Są to estry glicerolu i kwasów tłuszczowych. Zawierają także niewielkie ilości tokoferoli i fitosteroli [40]. Oleje różnią się między sobą przede wszystkim rodzajami kwasów tłuszczowych, które zawierają. Te najczęściej występujące to kwasy tłuszczowe nasycone, jednonienasycone oraz wielonienasycone, zwykle o wysokiej liczbie atomów węgla w cząsteczce (C₁₂-C₂₂), jak np.: kwas oleinowy, palmitynowy, laurynowy czy linolowy [2]. Podczas smażenia, związki zawarte w oleju ulegają różnym reakcjom takim jak hydroliza, utlenianie czy polimeryzacja [41]. W wyniku pierwszego procesu, w obecności wody zawartej w smażonej żywności, dochodzi do rozpadu wiązań estrowych w cząsteczkach triacylogliceroli. Powstają wolne kwasy tłuszczowe, mono- i diacyloglicerole oraz cząsteczki glicerolu, które mogą podlegać kolejnym przemianom np. utlenianiu. W jego trakcie powstają utlenione trójglicerydy oraz związki lotne takie jak aldehydy czy ketony. Z kolei reakcja polimeryzacji zachodzi zwłaszcza w trakcie długotrwałego procesu smażenia w wysokiej temperaturze. W jej wyniku powstają polimery proste i cykliczne, które są uznawane za potencjalnie szkodliwe i sprawiają, że tłuszcz staje się bardziej lepki i ciemniejszy. Dodatkowo podczas smażenia do oleju dostają się także fragmenty pożywienia, co sprawia, że w zużytym oleju mogą znajdować się również białka czy cukry [42], [43].

Wyróżnia się dwa główne rodzaje oleju posmażalniczego: komercyjny, pochodzący z hoteli, restauracji i firm cateringowych oraz z gospodarstw domowych. Według danych z 2015 roku, w Europie w ciągu roku wygenerowano około 1,66 miliona ton zużytego oleju kuchennego. W samej Polsce ilość ta wyniosła 89 tysięcy ton, w tym 54 % zużytego oleju pochodziło z gospodarstw domowych [44]. Niewłaściwe postępowanie ze zużytym olejem spożywczym, w tym jego odprowadzanie do kanalizacji lub składowanie na wysypiskach, wywiera destrukcyjny wpływ na środowisko. Odprowadzanie oleju do kanalizacji może skutkować blokowaniem rur oraz prowadzi do problemów związanych ze wstępnym oczyszczaniem ścieków w oczyszczalniach. Natomiast składowanie na wysypiskach prowadzi do zanieczyszczeń wód oraz gleb. Jednym z rozwiązań na utylizację zużytego oleju jest produkcja biodiesla [45]. Jednakże zużyty olej roślinny może być także dobrym surowcem do syntezy biosurfaktantów w MFC [8], co zostanie szerzej omówione w części eksperymentalnej niniejszej pracy.

1.3. Układy bioelektrochemiczne

1.3.1. Typy układów bioelektrochemicznych

Układy bioelektrochemiczne (BES) to urządzenia, które wykorzystują mikroorganizmy do prowadzenia różnorodnych procesów elektrochemicznych. Podstawą każdego BES jest ogniwo, w którym mikroorganizmy pełnią rolę biokatalizatorów.

Początkowo BES były wykorzystywane głównie do produkcji energii elektrycznej i jednoczesnego oczyszczania ścieków [46]. W ciągu ostatnich dwóch dekad zakres ich zastosowań znacząco się poszerzył między innymi poprzez wykorzystanie ich w takich procesach jak: odsalanie wody [47], [48], produkcja wodoru [49], metanu [50] oraz zwiększenie efektywności i szybkości procesów biodegradacji zanieczyszczeń [51], [52]. Ta szeroka gama zastosowań, w połączeniu z relatywnie prostą konstrukcją BES, sprawia, że stanowią one interesujące narzędzie w obszarze biotechnologii środowiskowej.

W zależności od celu zastosowania układu bioelektrochemicznego, wyróżnia się kilka ich rodzajów. Do najczęściej opisywanych w literaturze układów należą:

- Mikrobiologiczne ogniwo paliwowe – podstawowy oraz najczęściej stosowany typ BES, w którym mikroorganizmy anodowe (najczęściej bakterie), utleniają substancje organiczne i przekształcają je w energię elektryczną [53].
- Mikrobiologiczne ogniwo do elektrosyntezy (MES, ang. Microbial Electrosynthesis Cell) – układ, w którym mikroorganizmy zasiedlające katodę wykorzystują dostarczoną z zewnątrz energię elektryczną do redukcji dwutlenku węgla lub lotnych kwasów tłuszczowych oraz syntezy wartościowych związków organicznych, takich jak kwasy karboksylowe, alkohole czy biopaliwa [54].
- Mikrobiologiczne ogniwo elektrolityczne (MEC, ang. Microbial Electrolysis Cell) – jest układem BES, w którym mikroorganizmy utleniają materię organiczną

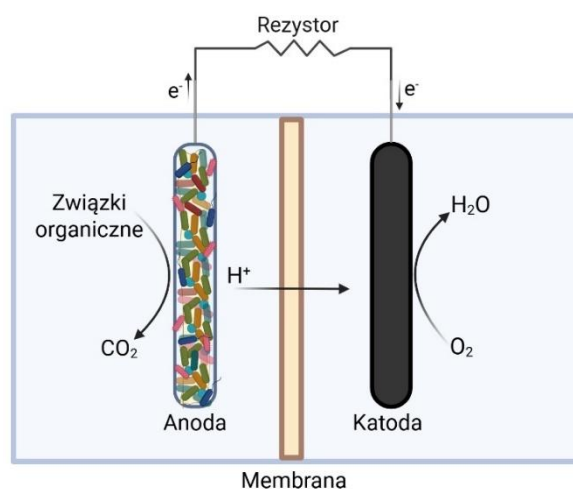
na anodzie. W odróżnieniu od MFC, proces ten jest wspomagany niewielkim dopływem energii elektrycznej, co umożliwia produkcję wodoru lub metanu na katodzie. [55].

- Mikrobiologiczne ogniwo odsalające (MDC, ang. Microbial Desalination Cell) – jest zmodyfikowaną formą MFC, gdzie pomiędzy anodą i katodą znajdują się komora ograniczona przez membrany: anionowymienną (AEM, ang. Anion Exchange Membrane) oraz kationowymienną (CEM, ang. Cation Exchange Membrane). Taka budowa ogniwa umożliwia częściowe lub całkowite odsalanie wody lub ścieków [56], [57].

Szczególnie interesującą grupą BES w kontekście biodegradacji związków ropopochodnych, posmażalnicych olejów roślinnych, a także syntezy związków powierzchniowo czynnych są mikrobiologiczne ogniwa paliwowe, które szerzej zostaną opisane w kolejnym rozdziale.

1.3.2. Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe

Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe stanowią najszerszej opisaną grupę układów bioelektrochemicznych w literaturze naukowej. Ze względu na budowę wyróżnia się ogniwa jedno- oraz dwukomorowe. Najczęściej stosowane w badaniach laboratoryjnych są układy dwukomorowe, których uproszczona budowa oraz mechanizm działania zostały przedstawione na **Rysunku 2**. Podstawę konstrukcji tego układu stanowią dwie komory: anodowa oraz katodowa, które są rozdzielone membraną. W ich wnętrzu znajdują się elektrody, odpowiednio: anoda i katoda, które połączone są ze sobą zewnętrznym obwodem elektrycznym. Mikroorganizmy anodowe utleniają związki organiczne, jednocześnie przekazując elektrony na anodę. Następnie elektrony transportowane są zewnętrznym obwodem elektrycznym do katody, gdzie następuje redukcja tlenu do wody. Powstająca między elektrodami różnica potencjałów generuje prąd elektryczny [58].



Rysunek 2 Schemat budowy dwukomorowego MFC.

Kluczowym ograniczeniem układów dwukomorowych jest wysoka rezystancja wewnętrzna, wynikająca ze znacznej odległości między anodą i katodą, co istotnie ogranicza uzyskiwaną gęstość mocy. Ponadto w dwukomorowych układach MFC obserwuje się niekorzystne nagromadzenie protonów w komorze anodowej, co prowadzi do zakwaszenia środowiska i obniża aktywność mikroorganizmów. Dodatkowo systemy te wymagają stałego napowietrzania elektrolitu komory katodowej w celu dostarczenia tlenu jako akceptora elektronów, a także stosowanie zewnętrznych utleniaczy chemicznych. To komplikuje ich skalowanie, obniża ogólną efektywność energetyczną procesu oraz zwiększa koszty eksploatacyjne [59].

W przeciwieństwie do nich, ogniwa jednokomorowe eliminują potrzebę stosowania oddzielnej komory katodowej poprzez zastosowanie tzw. katody powietrznej. Taka konstrukcja pozwala na bezpośrednie wykorzystanie tlenu z atmosfery, co redukuje koszty operacyjne i znacząco zwiększa gęstość mocy wyjściowej. Dodatkowo, układy te charakteryzują się niższymi oporami wewnętrznymi oraz niższymi kosztami konstrukcji [59].

Niezależnie od konfiguracji ogniwa, kluczowym elementem układów MFC są egzoelektrogeny. Są to drobnoustroje zdolne do zewnątrzkomórkowego transferu elektronów. Kolonizują one powierzchnię anody tworząc elektrogeny biofilm. Drobnoustroje zawarte w biofilmie odpowiadają za przeprowadzanie reakcji utleniania związków organicznych oraz transfer elektronów do powierzchni anody [59].

Wydajność mikrobiologicznych ogniw paliwowych jest silnie uzależniona od wielu czynników takich jak: konstrukcja urządzenia, rodzaj zastosowanych materiałów (anoda, katoda, membrana), a także warunków prowadzenia procesu, takich jak temperatura, skład chemiczny podłoża oraz rodzaj zastosowanych mikroorganizmów. Te trzy kluczowe elementy: anoda, katoda i membrana, odgrywają fundamentalną rolę w efektywności procesu wytwarzania energii elektrycznej w MFC oraz pochłaniają największą część kosztów budowy ogniwa.

1.3.2.1. Materiały anodowe

Wybór odpowiedniego materiału do konstrukcji anody w MFC ma kluczowe znaczenie dla wydajności całego układu. Idealny materiał anodowy powinien charakteryzować się wysoką przewodnością elektryczną, odpornością na działanie elektrolitu oraz biokompatybilnością. Powierzchnia anody powinna być przystosowana do kolonizacji przez egzoelektrogeny, tworząc stabilny biofilm. To właśnie biofilm umożliwia efektywny transfer elektronów z komórek bakteryjnych do elektrody. Właściwości takie jak chropowatość i skład chemiczny powierzchni anody mają bezpośredni wpływ na tempo wzrostu biofilmu i jego aktywność metaboliczną [60]. Biorąc pod uwagę powyższe parametry, do tworzenia anod wykorzystuje się głównie materiały węglowe, metale, tlenki metali, polimery przewodzące oraz ich kompozyty [61]. Największą popularność zyskały anody oparte o materiały węglowe, ze względu na ich względnie

niski koszt, wysoką stabilność mechaniczną oraz chemiczną oraz dobrą kinetykę transferu elektronów. Kluczowe znaczenie ma również ich struktura, która ułatwia osadzanie się mikroorganizmów i sprzyja tworzeniu stabilnego biofilmu [62]. Ponadto ze względu na długą żywność materiałów węglowych, są one wykorzystywane w eksperymentach długoterminowych [63]. Do takich materiałów zaliczamy np. tkaninę węglową, welon węglowy, filc grafitowy czy granulki grafitowe. W celu poprawy wydajności elektrod, materiały węglowe mogą być także poddawane modyfikacjom chemicznym oraz fizycznym [59], [64].

1.3.2.2. Materiały katodowe

Podobnie jak w przypadku anody, dobór właściwego materiału katodowego ma kluczowe znaczenie dla efektywności MFC. Materiał powinien być stabilny, wydajny i charakteryzować się dużą powierzchnią, co bezpośrednio wpływa na szybkość reakcji redukcji tlenu (ORR, ang. oxygen reduction reaction) [65]. Ze względu na konstrukcję katoda może pozostawać w bezpośrednim kontakcie z powietrzem lub znajdować się w komorze katodowej wypełnionej katolitem. Katody powietrzne mają bezpośredni dostęp do tlenu atmosferycznego, który pełni rolę ostatecznego akceptora elektronów. Mogą one zawierać katalizator (np. platynę) oraz odpowiednie materiały pomocnicze. Ich głównymi zaletami są niski koszt, prosta budowa oraz nieograniczony dostęp do tlenu. Z kolei katody zanurzone w elektrolicie wykorzystują tlen rozpuszczony w roztworze. Aby przyspieszyć reakcję ORR, w tym przypadku często stosuje się katalizatory dodawane bezpośrednio do elektrolitu. Rozwiązanie to wymaga jednak dodatkowego napowietrzania, a jego efektywność jest ograniczona niską rozpuszczalnością tlenu w cieczach. Oba rodzaje katod mogą być stosowane z katalizatorami lub bez, co istotnie wpływa na koszt konstrukcji ogniwa MFC. Najczęściej stosowane materiały przewodzące to tkanina węglowa, welon węglowy i siatka platynowa. Istotne są również spoiwa, takie jak poli(tetrafluoroetylen) (PTFE), które łączą katalizator z elektrodą. Zastosowanie katod z katalizatorami wiąże się z wysokim kosztem. Problem ten można rozwiązać, stosując materiały węglowe o dużej powierzchni, co zwiększa gęstość prądu. W tym celu wykorzystuje się różne materiały, takie jak grafit i węgiel aktywny, aby uzyskać wydajniejsze katody [66].

1.3.2.3. Rodzaje membran

Podstawowym zadaniem membrany jest oddzielenie środowiska anodowego od katodowego oraz ułatwienie transportu protonów. Materiały do budowy membran powinny charakteryzować się niską przepuszczalnością tlenu oraz innych związków chemicznych, które dyfundując pomiędzy elektrodami mogłyby wpłynąć na pogorszenie wydajności MFC [67]. Membrany powinny charakteryzować się niskim oporem wewnętrznym, wysoką przewodnością protonową, długotrwałą stabilnością oraz zapewniać efektywną wymianę masy pomiędzy tlenową katodą a beztlenowym środowiskiem anody. Spełnienie tych parametrów warunkuje efektywność membrany w kontekście zastosowań w układach MFC. W licznych przypadkach separatory

wykorzystywane w MFC są oparte na polimerach. Ważną klasą membran polimerowych są membrany jonowymienne, które w swojej strukturze posiadają grupy funkcyjne, warunkujące selektywny transport jonów o przeciwnym ładunku oraz blokadę jonów o podobnym ładunku. Wśród membran jonowymiennych wyróżnia się membrany anionowymienne (AEM) oraz kationowymienne (CEM) [68]. Najczęściej wykorzystywanymi separatorami w MFC są membrany CEM, które umożliwiają transport protonów lub innych specyficznych kationów z anody do katody. Najbardziej rozpowszechnioną membraną tego typu jest Nafion, jednak tańszą alternatywą, cieszącą się rosnącym zainteresowaniem w badaniach laboratoryjnych w ostatnich latach, jest membrana CMI-7000 [59].

1.3.3. Czynniki wpływające na efektywność BES

Efektywność działania układów bioelektrochemicznych zależy od wielu wzajemnie powiązanych ze sobą czynników, zarówno biologicznych, jak i fizykochemicznych. Optymalizacja tych parametrów jest kluczowa dla efektywnego usuwania zanieczyszczeń oraz dla uzyskania wysokiej wydajności konwersji energii chemicznej w energię elektryczną. W niniejszym podrozdziale omówione zostaną najistotniejsze z nich, w tym wpływ rodzaju i stężenia substratu, znaczenie źródła mikroorganizmów zastosowanego w układzie, zarówno w kontekście jej różnorodności, jak i właściwości metabolicznych, a także kluczowe parametry środowiskowe, takie jak pH, temperatura czy dostępność tlenu, które mają bezpośredni wpływ na aktywność biologiczną mikroorganizmów [69]. Zrozumienie wzajemnych zależności pomiędzy tymi czynnikami stanowi podstawę dla dalszego rozwoju i praktycznego zastosowania układów BES.

1.3.3.1. Substrat

Substrat odgrywa kluczową rolę w kształtowaniu efektywności układów BES, wpływając zarówno na aktywność mikroorganizmów, jak i na wydajność energetyczną układu, w tym gęstość mocy oraz efektywność kulombowską. Różnorodność rodzaju, struktury chemicznej, formy fizycznej oraz stężenia substratu może prowadzić do znacznych różnic w wydajności produkcji prądu oraz w stopniu biodegradacji zanieczyszczeń. Zastosowany substrat pełni funkcję źródła energii dla mikroorganizmów i bezpośrednio kształtuje ich aktywność metaboliczną oraz skład mikrobiomu anodowego [70], [71]. Substraty wykorzystywane w BES obejmują szeroki zakres związków organicznych, od łatwo biodegradowalnych (np. octan, glukoza, lotne kwasy tłuszczowe), po zanieczyszczenia przemysłowe, takie jak węglowodory ropopochodne, oleje posmażalnice czy ścieki [72]. Rodzaj zastosowanego substratu wpływa na skład mikrobiomu anodowego, determinując obecność określonych grup mikroorganizmów. Na anodach zasilanych niskocząsteczkowymi, łatwoprzyswajalnymi związkami węglowymi (np. octanem), dominują często drobnoustroje zdolne do przekazywania elektronów do anody, czyli egzoelektrogeny (np. *Geobacter sulfurreducens*). W przypadku złożonych substratów, takich jak zanieczyszczenia ropopochodne, następuje rozwój zróżnicowanych grup mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji

zawartych w nich węglowodorów. Produkty tej degradacji, w postaci prostszych związków organicznych, mogą następnie zostać wykorzystane przez egzoelektrogeneratory w procesie generowania energii elektrycznej [73].

W kontekście niskiej biodostępności lub ograniczonej różnorodności źródeł węgla, skuteczną strategią zwiększającą wydajność BES może być zastosowanie kosubstratów. Są to dodatkowe związki organiczne wprowadzane do układu obok głównego substratu, które mogą pełnić funkcję wspomagającą w procesie metabolicznym. Ich obecność może zwiększyć biodostępność głównego substratu, zwiększać aktywność enzymów szlaku zewnątrzkomórkowego przenoszenia elektronów oraz wpływać pozytywnie na proces formowania się biofilmu na anodzie [74]. Na przykład dodatek łatwo przyswajalnych związków, takich jak octan, do trudniej biodegradowalnych substratów, może zwiększyć produkcję prądu i przyspieszyć degradację zanieczyszczeń poprzez stymulację metabolizmu mikroorganizmów oraz efektywniejsze formowanie się biofilmu na anodzie [75].

Również stężenie substratu ma istotny wpływ na funkcjonowanie BES. W pracy Zhang i in. wykazano, że zarówno szybkość degradacji substratu, jak i generacja energii elektrycznej były promowane przy zwiększającym się stężeniu substratu w pewnym zakresie, ale oba te procesy były hamowane przy wysokich stężeniach substratu [76]. W przypadku bardzo wysokich stężeń substratów skuteczną strategią może być bioaugmentacja, czyli wprowadzenie wyselekcjonowanych szczepów mikroorganizmów, które zwiększają zdolność układu do pracy w warunkach wysokiego obciążenia związkami organicznymi. W innych pracach wykazano, że bioaugmentacja społeczności anodowej czystymi kulturami prowadziła do wyższego i bardziej stabilnego wytwarzania prądu oraz efektywniejszej degradacji substratu [77], [78].

Skuteczność BES w dużym stopniu zależy od odpowiedniego doboru substratu pod względem jego typu, stężenia, formy, biodostępności oraz ewentualnego wzbogacenia go o kosubstraty. Substraty nie tylko wpływają na tempo metabolizmu i rozwój określonych grup mikroorganizmów, ale także determinują efektywność degradacji zanieczyszczeń oraz poziom generowanej energii.

1.3.3.2. Źródło mikroorganizmów

Dobór odpowiedniego źródła mikroorganizmów wykorzystywanych do inokulacji BES ma kluczowe znaczenie dla ich wydajności. Inokulum może pochodzić zarówno z naturalnych środowisk (np. osady denne, gleby, ścieki), jak i być przygotowane laboratoryjnie z komercyjnie dostępnych szczepów bakteryjnych. Zastosowanie egzoelektrogennych szczepów bakteryjnych oraz innych określonych cechach, pozwala lepiej kontrolować procesy zachodzące w układzie na poziomie badań laboratoryjnych. Natomiast inokulaty pochodzenia środowiskowego (określane też jako naturalne konsorcja) są bardziej zróżnicowane i zdolne do adaptacji w warunkach rzeczywistych. Szczegółowe porównanie efektywności czystych i mieszanych kultur w MFC zostanie

omówione w osobnym podrozdziale nr 1.4.5.

Wybór inokulum powinien być dostosowany do warunków operacyjnych i rodzaju substratu, a także do oczekiwanych rezultatów pracy BES. W praktyce korzystne może być wykorzystanie anolitu oraz biomasy pobranej bezpośrednio z anody z działającego reaktora MFC, który zawiera już aktywne i przystosowane do danego środowiska mikroorganizmy, co może skrócić czas rozruchu i zwiększyć tempo degradacji określonego substratu [79], [80]. Wykorzystanie inokulum z terenów skażonych specyficznymi zanieczyszczeniami, które zawierają mikroorganizmy przystosowane do degradacji toksycznych związków, poprawia wydajność MFC. Przykładem jest praca Sharmy i in. [81], gdzie jako źródło mikroorganizmów zastosowano glebę pochodzącą z terenów skażonych produktami ropopochodnymi. Mikroorganizmy z tych terenów skutecznie degradowały węglowodory i generowały energię elektryczną, co poprawiło odporność mikroflory na toksyczność i zwiększyło wydajność układu.

1.3.3.3. Parametry środowiskowe: pH i temperatura

Temperatura i pH należą do kluczowych parametrów środowiskowych wpływających na funkcjonowanie BES. Oba te czynniki oddziałują bezpośrednio na aktywność metaboliczną mikroorganizmów, kinetykę reakcji elektrochemicznych oraz strukturę społeczności mikrobiologicznej. Wzrost temperatury w zakresie psychro- i mezofilnym (zazwyczaj do około 30-35 °C) zwiększa tempo procesów metabolicznych, co przekłada się na zwiększenie usunięcia ChZT oraz wzrost produkcji energii elektrycznej [82]. Temperaturo powyżej optymalnych wartości dla wzrostu określonych mikroorganizmów działają destabilizująco poprzez ograniczanie wzrostu mikroorganizmów, co w konsekwencji prowadzi do spadku wydajności całego układu [83]. Ustalenie optymalnej temperatury operacyjnej dla MFC zależy od wzajemnych interakcji takich czynników jak skład inokulum, typ zastosowanego substratu, a także konstrukcja elektrody oraz konfiguracja układu. Tylko właściwa kombinacja tych elementów umożliwia osiągnięcie maksymalnej produkcji energii bez pogorszenia ogólnej stabilności i efektywności układu.

Drugim istotnym parametrem operacyjnym jest pH. Wpływa ono nie tylko na aktywność mikroorganizmów, ale również na termodynamikę procesów elektrochemicznych. Optymalny zakres pH dla bakterii degradujących zanieczyszczenia (np. związki ropopochodne) oraz egzoelektrogenów mieści się zazwyczaj w granicach 6,0-8,0 [84]. W pracy Koolivand i in. [85] wraz ze wzrostem pH od 5,0 do 7,0 obserwowano intensyfikację zarówno tempa degradacji ropy naftowej, jak i wzrostu biomasy mikroorganizmów. Jednak dalsze podwyższanie pH poza zakres obojętny prowadziło do ograniczenia rozwoju populacji bakteryjnej. Zmiany pH mogą zaburzać strukturę i funkcjonowanie biologicznych makrocząsteczek (np. białek czy kwasów nukleinowych) oraz wpływać na potencjał błony komórkowej, zaburzając mechanizmy transportu jonów i składników odżywczych [86].

Jednak pH determinuje również potencjał elektrod zgodnie z równaniem Nernsta. Podczas pracy układu często dochodzi do niekorzystnego gradientu: zakwaszenia anody (przez gromadzące się protony) oraz alkalizacji katody. Wzrost pH w przedziale katodowym drastycznie obniża potencjał redukcji tlenu, co bezpośrednio redukuje napięcie ogniwa i generowaną moc. Dlatego utrzymanie stabilnego, neutralnego pH jest niezbędne nie tylko dla przeżywalności bakterii, ale przede wszystkim dla minimalizacji strat termodynamicznych na powierzchni elektrod [84].

1.3.4. Parametry oceny wydajności BES

Ocena wydajności układów bioelektrochemicznych opiera się na analizie zarówno zmiennych projektowych i operacyjnych, jak i parametrów wyjściowych, które obrazują efektywność działania układu (**Tabela 1**). Parametry projektowe są bezpośrednio związane z konstrukcją ogniwa. Są nimi powierzchnia zastosowanych elektrod: anody oraz katody oraz objętość robocza komory anodowej. Z kolei do najważniejszych parametrów operacyjnych należą pH i temperatura panujące w układzie, a także ilość i jakość materii organicznej i nieorganicznej dostępnej do przetworzenia przez mikroorganizmy, które jest określane jako chemiczne zapotrzebowanie na tlen (ChZT).

Natomiast do parametrów, za pomocą których można ocenić wydajność układu BES należą: stopień usunięcia ChZT, generowana moc wyjściowa oraz efektywność kulombowska (CE, ang. Coulombic efficiency). Skuteczność usuwania zanieczyszczeń organicznych, głównie w postaci ChZT oraz zdolność do generowania energii elektrycznej to parametry powiązane ze sobą. Produkcja energii w układzie zależy bezpośrednio od stopnia degradacji substratu organicznego oraz efektywności transferu elektronów do anody. Warto zaznaczyć, że chociaż usuwanie ChZT jest bezpośrednio związane z aktywnością mikrobiologiczną, to wydajność produkcji energii elektrycznej zależy również od oporu wewnętrznego układu, przewodnictwa materiałów elektrodowych oraz sprawności transportu jonów i elektronów [87]. Kolejnym ważnym parametrem służącym do oceny wydajności układu jest efektywność kulombowska, określająca stosunek ilości ładunku elektrycznego rzeczywiście odzyskanego w postaci prądu elektrycznego do teoretycznej ilości ładunku, jaki mógłby zostać wygenerowany w wyniku całkowitego utlenienia materii organicznej obecnej w komorze anodowej [58]. Im wyższa wartość CE, tym bardziej efektywna konwersja substratu na ładunek elektryczny, co wskazuje na ograniczenie strat elektronów oraz korzystne warunki dla działania egzoelektrogenów.

Te trzy wyżej opisane parametry do oceny wydajności BES są szeroko wykorzystywane w analizach porównawczych nad różnymi konfiguracjami układów, zwłaszcza w kontekście oceny wpływu konstrukcji ogniwa, rodzaju materiałów anodowych, ich modyfikacji oraz zastosowanych biokatalizatorów. Z tego względu, projektując efektywny układ BES, należy zadbać o zapewnienie odpowiedniego środowiska dla rozwoju mikroorganizmów, dobór materiałów wspierających tworzenie się biofilmu oraz ograniczenie strat energii wynikających z konstrukcji komory. Parametry takie jak

pH, temperatura, czas retencji hydraulicznej (HRT) czy opór zewnętrzny (R_{zew}) również istotnie wpływają na uzyskiwane wartości wydajnościowe [88].

Tabela 1 Najważniejsze zmienne: projektowe, operacyjne i wydajnościowe, stosowane w badaniach układów bioelektrochemicznych.

Zmienne projektowe	Skrót	Jednostka
Powierzchnia anody	A_{AN}	m^2
Powierzchnia katody	A_K	m^2
Objętość robocza komory anodowej	V_R	m^3
Zmienne operacyjne		
pH	pH	Brak jednostki
Temperatura	T	$^{\circ}C$
Ilość materii organicznej i nieorganicznej w komorze anodowej	ChZT	$\frac{mg}{L}$
Wskaźniki wydajności BES		
Usunięcie ChZT	$\Delta ChZT$	%
Gęstość mocy	PD	$\frac{W}{m^2}, \frac{W}{m^3}$
Efektywność kulombowska	CE	%

1.4. Mikrobiom anodowy

Mikroorganizmy kolonizujące komorę anodową MFC gromadzą się na elektrodzie w postaci zwartej struktury zwanej biofilmem i/lub występują w postaci planktonicznej w objętości roztworu anolitu. Różnorodność i skład społeczności mikroorganizmów anodowych są determinowane przez szereg czynników biotycznych i abiotycznych. Do czynników biotycznych należy skład mikrobiologiczny inkulum oraz rodzaj źródła węgla w pożywce. Czynniki abiotyczne obejmują typ BES (jedno- lub dwukomorowy) oraz rodzaj materiału anodowego [89], a także warunki eksperymentalne, takie jak temperatura, pH i potencjał anody [90]. W skład mikrobiomu anodowego wchodzi zarówno egzoelektrogeny, odpowiedzialne za transfer elektronów, jak i nieegzoelektrogeny, biorące udział w procesach towarzyszących. Do tych procesów należą m.in.: fermentacja, redukcja siarczanów, metanogeneza oraz denitryfikacja. Nieegzoelektrogeny są mniej zbadane w porównaniu z egzoelektrogenami. W BES nieegzoelektrogeny mogą odgrywać kluczową rolę w poprawie ogólnej wydajności układu [91]. Są one szczególnie ważne w przypadku złożonych substratów. W układach MFC istnieje złożona równowaga między egzoelektrogenami i nieegzoelektrogenami [92]. Syntroficzna współpraca między tymi dwiema grupami mikroorganizmów jest kluczowa dla biodegradacji złożonych związków organicznych oraz produkcji energii [93].

1.4.1. Egzoelektrogeny

Egzoelektrogeny to mikroorganizmy zdolne do zewnątrzkomórkowego transferu elektronów (EET, ang. extracellular electron transfer). Najczęściej występują wśród bakterii i archeonów, jednak istnieją dowody na ich obecność również u niektórych eukariotów [94]. Wśród bakterii dominują przedstawiciele *Proteobacteria*, *Firmicutes* i *Actinobacteria*. Większość szeroko opisanych w literaturze bakterii zdolnych do EET to organizmy Gram-ujemne (np. *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella putrefaciens*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*), jednak w ostatnich latach coraz częściej identyfikuje się także bakterie Gram-dodatnie jako egzoelektrogeny (np. *Bacillus subtilis*) [94], [95]. Zewnętrzny transfer elektronów, kluczowy dla funkcjonowania egzoelektrogenów, może zachodzić zarówno w biofilmie anodowym, jak i w komórkach planktonicznych, które zawieszono są w anodzie. Mikroorganizmy planktoniczne najczęściej przekazują elektrony w sposób pośredni za pomocą mediatorów egzogennych (np. *Alcaligenes faecalis* [96]) lub endogennych (np. *Pseudomonas aeruginosa* [97]). Z kolei bakterie tworzące biofilm na anodzie często wykorzystują bezpośredni transfer elektronów – poprzez cytochromy typu c lub przewodzące nanowłókna białkowe (np. *Geobacter spp.* oraz *Shewanella spp.*) [98].

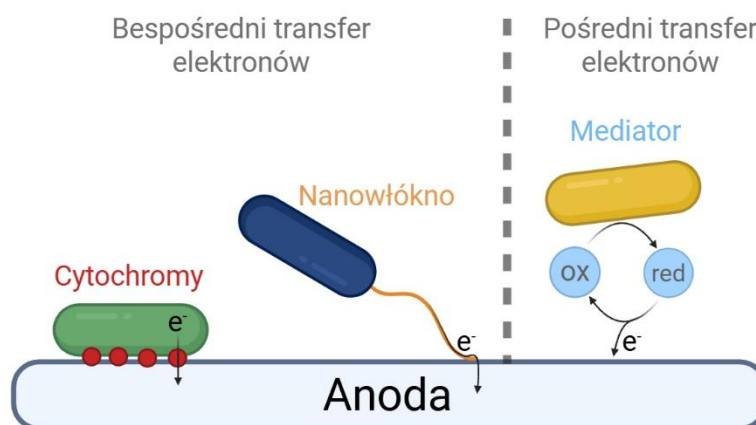
Egzoelektrogeny występują naturalnie w różnorodnych środowiskach, zwłaszcza tych bogatych w materię organiczną i ubogich w tlen, gdzie mikroorganizmy muszą wykorzystywać alternatywne mechanizmy oddychania. Do głównych siedlisk tych organizmów należą: gleby i osady dennie, tereny zanieczyszczone substancjami organicznymi (np. związkami ropopochodnymi) oraz metalami ciężkimi, siedliska ekstremalne takie jak słone jeziora czy gorące źródła oraz ścieki i osady ściekowe [99], [100]. Egzoelektrogeny charakteryzują się dużą różnorodnością metaboliczną, co pozwala im przystosować się do zmiennych warunków środowiskowych. Niektóre, jak *Shewanella oneidensis*, która jest względnie beztlenowcem, mogą przełączać się między oddychaniem tlenowym i beztlenowym, co zapewnia im większą elastyczność ekologiczną. Inne szczepy, jak *Geobacter sulfurreducens*, który jest aerotolerancyjny, preferuje środowiska o niskim potencjale redoks, gdzie może efektywnie wykorzystywać anodę lub tlenki metali jako akceptory elektronów [98]. Ważną cechą egzoelektrogenów, z perspektywy zastosowania w układach BES, jest zdolność do tworzenia elektrogenego biofilmu na powierzchni anody. Biofilm ten nie tylko umożliwia bezpośredni transfer elektronów do anody, ale także poprawia stabilność i przewodnictwo elektryczne układu [101].

1.4.2. Mechanizmy transportu elektronów

Mechanizm transportu elektronów jest procesem złożonym i ściśle związanym z oddychaniem komórkowym bakterii. Mikroorganizmy pobierają elektrony w trakcie utleniania cząsteczek organicznych lub nieorganicznych obecnych w ich środowisku. Następnie przekazują je poprzez białka przENOŚnikowe do terminalnego akceptora elektronów (TEA, ang. Terminal Electron Acceptor). Proces ten indukuje powstanie

transbłonowego gradientu jonów, który jest niezbędny do fosforylacji oksydacyjnej i syntezy energii w postaci ATP [102]. W zależności od panujących warunków, bakterie mogą wykorzystywać różne akceptory elektronów takie jak tlen, cząsteczki organiczne w przypadku fermentacji oraz cząsteczki nieorganiczne [103]. Dla większości mikroorganizmów w warunkach tlenowych naturalnym TEA będzie cząsteczka tlenu, która ma wysoki potencjał redoks i łatwo wchłania się do komórki [104]. Natomiast w warunkach beztlenowych mikroorganizmy są zmuszone do korzystania z alternatywnych TEA takich jak siarczany czy azotany. Jednak wiele środowisk beztlenowych nie posiada wystarczających rezerw tych związków. W takich przypadkach mikroorganizmy dostosowują swój metabolizm komórkowy do panujących warunków i transferują elektrony na zewnątrz błony komórkowej w poszukiwaniu ostatecznego akceptora elektronów. Zjawisko to nazywane jest zewnątrzkomórkowym transferem elektronów (EET) i wymaga specjalnych mechanizmów i struktur, które umożliwiają transfer elektronów poza błonę komórkową [105]. Bakterie zdolne do EET określane są jako egzoelektrogeneratory [106], elektrogeny [107] czy bakterie elektroaktywne [108] i to one pełnią główną rolę podczas produkcji prądu w układach bioelektrochemicznych.

Mechanizm EET może przebiegać na różne sposoby, z których najlepiej poznane i opisane w literaturze to: transfer bezpośredni (DET, ang. Direct Electron Transfer) oraz transport pośredni (IET, ang. Indirect Electron Transfer) (**Rysunek 3**).



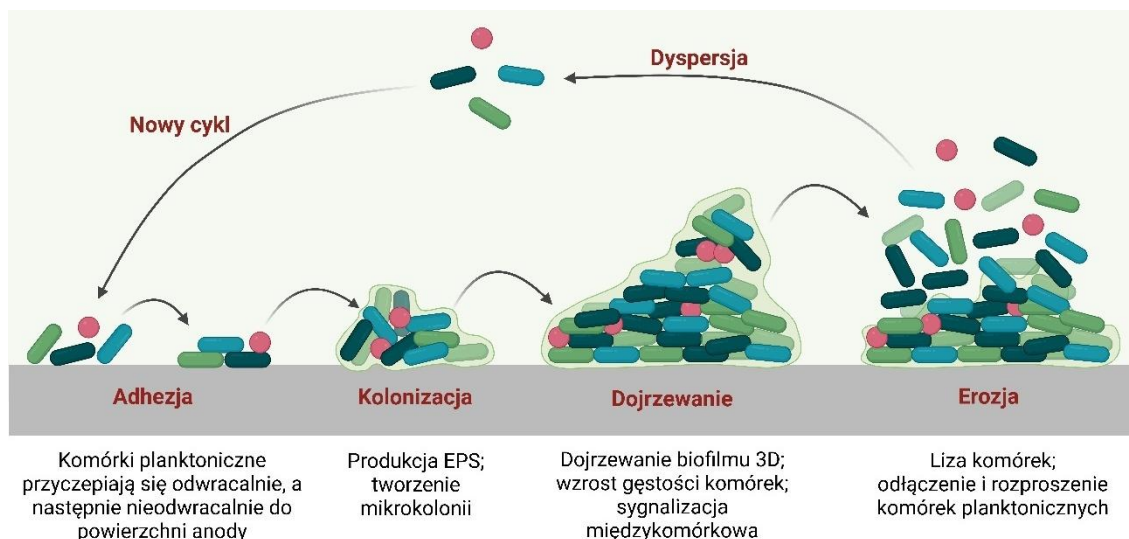
Rysunek 3 Mechanizmy zewnątrzkomórkowego transferu elektronów: bezpośredni poprzez cytochromy oraz nanowłókno oraz pośredni poprzez mediator.

Wyróżnia się dwa główne mechanizmy bezpośredniego transferu elektronów u egzoelektrogenów. Pierwszy z nich opiera się na transporcie ładunków z wewnętrznych układów redoks komórki na elektrodę poprzez cytochromy błony zewnętrznej lub membranowe enzymy redoks. Proces ten wymaga bezpośredniego kontaktu fizycznego między komórką mikroorganizmu a powierzchnią elektrody [109]. Drugim mechanizmem jest wykorzystanie przewodzących nanowłókien białkowych, które umożliwiają transfer elektronów na większe odległości. Struktury te tworzą stabilne połączenia zarówno z anodą, jak i sąsiednimi komórkami w obrębie biofilmu. Przykładem mikroorganizmu zdolnego do wytwarzania przewodzących nanowłókien jest *Geobacter sulfurreducens* [110].

Z kolei pośredni transfer elektronów odbywa się z wykorzystaniem rozpuszczalnych mediatorów, które mogą być pochodzenia endogennego lub egzogenego. Do związków endogennych, wydzielanych samoistnie przez mikroorganizmy należą chinony, flawiny oraz fenazy [111]. Przykładem takiego mediatora jest piocyjanina produkowana przez szczep *Pseudomonas aeruginosa*, która dyfunduje między mikroorganizmami a elektrodą, umożliwiając wielokrotny transport elektronów [112]. Egzogenne mediatory obejmują związki takie jak resazuryna, czerwień metylowa czy błękit metylenowy. Jednak ich zastosowanie jest ograniczone przez potencjalny negatywny wpływ na środowisko oraz potrzebę systematycznej suplementacji [111].

1.4.3. Biofilm anodowy

Na powierzchni anod w MFC mikroorganizmy tworzą biofilmy. Są to trójwymiarowe, złożone struktury stanowiące środowisko życia społeczności drobnoustrojów. Proces ich formowania przebiega etapowo i obejmuje pięć głównych faz, co zilustrowano na **Rysunku 4**. W początkowym etapie dochodzi do odwracalnej adhezji komórek do powierzchni anody, warunkowanej właściwościami fizykochemicznymi elektrody, takimi jak: chropowatość, ładunek, skład chemiczny czy zadany potencjał [113]. Kolejny etap obejmuje nieodwracalne przyłączenie komórek i tworzenie mikrokolonii, czemu towarzyszy rozpoczęcie syntezy macierzy zewnątrzkomórkowej (EPS, ang. extracellular polymeric substances). W kolejnych etapach biofilm dojrzewa, a wytwarzana macierz EPS zapewnia jego mechaniczną stabilność. Chroni komórki przed stresem środowiskowym oraz umożliwia komunikację między nimi, m.in. poprzez zjawisko quorum sensing [114], [115]. Jest to mechanizm komunikacji chemicznej między bakteriami, oparty na wydzielaniu i wykrywaniu cząsteczek sygnałowych zwanych autoinduktorami. Dzięki zjawisku quorum sensing bakterie regulują ekspresję genów odpowiedzialnych za ruchliwość, tworzenie biofilmów oraz produkcję czynników wirulencji u gatunków patogennych. EPS stanowi również środowisko przewodzące, które ułatwia dyfuzję substratów, metabolitów i elektronów, wspierając rozwój struktur przewodzących elektrony, takich jak cytochromy i nanowłókna bakteryjne. Ostatnia faza obejmuje erozję lub dyspersję biofilmu, podczas której część komórek odłącza się i może kolonizować kolejne powierzchnie rozpoczynając nowy cykl formowania się biofilmu.



Rysunek 4 Cykl formowania się biofilmu bakteryjnego na anodzie w mikrobiologicznym ogniwie paliwowym.

Biofilm anodowy składa się z egzoelektrogenów i nieegzoelektrogenów, które wspólnie tworzą złożoną sieć transferu elektronów, kluczową dla funkcjonowania ogniw MFC. Zewnętrzny transfer elektronów może przebiegać zarówno pośrednio, jak i bezpośrednio, w zależności od składu mikrobiologicznego oraz stopnia dojrzałości biofilmu. Struktura biofilmu i organizacja komórek mają istotny wpływ na efektywność tego procesu, ponieważ opór transferu elektronów rośnie wraz z odległością między komórkami a powierzchnią elektrody [113]. Na skuteczność działania biofilmu anodowego wpływa szereg czynników abiotycznych i operacyjnych, takich jak wydajność dyfuzji substratów i produktów, lokalne zmiany pH, prędkość przepływu medium, temperatura, skład inokulum oraz właściwości materiału elektrody. W pracy Pasternaka i in. [116] wykazano, że zastosowany opór zewnętrzny wywiera trwały wpływ elektrochemiczny na właściwości biofilmu, kształtując jego aktywność i strukturę w dłuższej perspektywie czasowej. Nadmierna grubość biofilmu może prowadzić do ograniczenia transportu masy i wzrostu oporu wewnętrznego, co obniża ogólną wydajność systemu. Natomiast biofilm anodowy o zoptymalizowanej strukturze i składzie mikrobiologicznym może pozostawać aktywny elektrochemicznie przez długi czas, zachowując wysoką stabilność i sprawność generowania prądu [117].

1.4.4. Mikroorganizmy syntroficzne i konkurencyjne w MFC

W społecznościach drobnoustrojów występujących w mikrobiologicznych ogniwach paliwowych obok klasycznych egzoelektrogenów, ważną rolę odgrywają także inne grupy mikroorganizmów, m.in. bakterie fermentacyjne, mikroorganizmy redukujące związki siarki i azotu oraz metanogeny. Należy podkreślić, że mikroorganizmy syntroficzne i konkurencyjne nie stanowią jednorodnej grupy funkcjonalnej i mogą obejmować zarówno mikroorganizmy nieegzoelektrogenne, jak i egzoelektrogenne. Ich rola oraz zdolność do przeprowadzania konkretnych procesów metabolicznych zależy przede wszystkim od warunków panujących w układzie, a ich aktywność w istotny

sposób wpływa na przebieg procesów bioelektrochemicznych. Część z nich wspiera egzoelektrogeny, rozkładając złożone związki organiczne na prostsze metabolity, które następnie są wykorzystywane do wytwarzania energii elektrycznej. W tym przypadku można mówić o interakcjach syntroficznych, które zwiększają wydajność układu. Inne mikroorganizmy konkurują jednak o te same donory elektronów lub alternatywne akceptory, co prowadzi do spadku produkcji prądu i obniżenia stabilności pracy MFC.

Mikroorganizmy fermentacyjne

Większość egzoelektrogenów potrafi bezpośrednio przekształcać proste kwasy organiczne w energię elektryczną. W przypadku cukrów konieczny jest jednak etap fermentacji, podczas którego związki organiczne (np. glukoza) ulegają rozkładowi do rozpuszczalnych metabolitów. Produkty tej fermentacji, takie jak krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (np. octan) lub alkohole, stanowią następnie substrat dla egzoelektrogenów [118]. W procesie tym istotne jest synergistyczne działanie egzoelektrogenów oraz bakterii fermentacyjnych, które katalizują rozkład złożonych substratów na łatwo dostępne donory elektronów. Bakterie fermentacyjne, takie jak *Clostridium spp.*, *Bacteroides spp.*, *Dysgonomonas spp.*, *Propionispora spp.*, *Petrimonas spp.*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Petrimonas spp.*, *Eubacterium spp.* są często identyfikowane w mikrobiomie anodowym MFC [92]. Środowisko beztlenowe w komorze anodowej oraz obecność złożonych substratów, w tym związków fermentatywnych, sprzyjają ich wzrostowi w BES. W kilku pracach wykazano, że współhodowla egzoelektrogenów z fermentorami zwiększa wydajność energetyczną z różnych substratów. Dzięki temu bakterie fermentacyjne wspomagają wstępną degradację materii organicznej, tworząc produkty, które mogą być wykorzystane przez egzoelektrogeny do generowania energii elektrycznej, zwiększając tym samym efektywność całego układu. Niemniej jednak, nadmierna proliferacja bakterii fermentacyjnych w biofilmie anodowym może prowadzić do akumulacji produktów fermentacji, co w konsekwencji negatywnie wpływa na wydajność ogniwa [92].

Bakterie redukujące związki siarki

Naturalnie obecne w substratach związki siarki i siarczanów mogą znacząco wpływać na skład mikrobiomu anodowego oraz na wydajność układu MFC. Jedną z kluczowych grup mikroorganizmów w tym kontekście są bakterie redukujące siarczany (SRB, ang. sulfate-reducing bacteria), które pod względem metabolicznym wykorzystują siarczan jako końcowy akceptor elektronów w procesach beztlenowych. W typowych warunkach anodowych, SRB utleniają związki organiczne (np. kwasy organiczne czy alkohole) jednocześnie redukując siarczany do siarczków [119]. Choć ich obecność może zwiększyć wydajność degradacji zanieczyszczeń i przyczynić się do eliminacji siarczanów z anolitu, nadmierna proliferacja SRB może ograniczać produkcję prądu, konkurując z egzoelektrogenami o dostępne donory elektronów. Z drugiej strony, wykazują również zdolność do zewnątrzkomórkowego transferu elektronów (EET), porównywalny z klasycznymi egzoelektrogenami, takimi jak *Geobacter* i *Shewanella*

[120], [121]. Istnieją dowody na to, że SRB mogą uczestniczyć w generowaniu prądu nie tylko pośrednio, poprzez produkcję siarczków, które są następnie utleniane na anodzie do siarki elementarnej, ale również bezpośrednio poprzez transfer elektronów na anodę [122]. Bakterie z rodzajów: *Alcaligenes*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Desulfuromonas* oraz *Desulfatirhabdium* to przykłady SRB najczęściej wykrywanych w środowiskach anodowych [92]. Ponadto, SRB wykazują wysoką zdolność do biodegradacji złożonych i toksycznych związków chemicznych, takich jak cykloheksan, naftalen, fenantren, czy związki nitroaromatyczne, np. 2,4,6-trinitrotoluen (TNT) oraz metale ciężkie [123]. Dlatego ich obecność w anodach MFC jest korzystna nie tylko ze względu na transformację siarczanów, lecz także w kontekście bioremediacji trudnych zanieczyszczeń przemysłowych.

Kluczowymi czynnikami wpływającymi na skład i aktywność bakterii SRB w MFC są m.in. typ elektrody, stosunek chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT) do stężenia siarczanów, jak również rodzaj zastosowanego konsorcjum mikroorganizmów [124]. Optymalizacja tych parametrów może umożliwić uzyskanie równowagi pomiędzy udziałem SRB a efektywną produkcją energii elektrycznej.

Bakterie redukujące związki azotu

Bakterie redukujące związki azotu są istotnym elementem społeczności anodowych w MFC. W warunkach ograniczonej ilości tlenu jakie panują przy anodzie, wykorzystują one azotany (NO_3^-) i azotyny (NO_2^-) jako końcowe akceptory elektronów, prowadząc do ich sekwencyjnej redukcji do azotu cząsteczkowego. Dzięki temu uczestniczą w usuwaniu związków biogenych i stabilizacji warunków redoks w biofilmie. Ich obecność może jednak wywoływać przeciwstawne efekty. Z jednej strony sprzyjają funkcjonowaniu MFC poprzez poprawę jakości anolitu i wspomaganie degradacji złożonych substratów. Z drugiej mogą konkurować z egzoelektrogenami o elektrony. W konsekwencji nadmierna aktywność denitryfikatorów może obniżać wydajność prądową o kilka procent [125], [126]. Kluczowym parametrem determinującym rolę denitryfikatorów jest stosunek C/N. Przy niskich wartościach ($<3,75$) dochodzi do akumulacji NO_3^- i NO_2^- oraz intensywnego rozwoju bakterii denitryfikujących, co ogranicza generację prądu [162-164]. Z kolei przy wyższych wartościach C/N możliwe jest osiągnięcie równowagi między aktywnością denitryfikacyjną i egzoelektrogenną, co pozwala łączyć usuwanie związków azotowych z produkcją energii [127], [128]. Do bakterii zdolnych zarówno do EET oraz redukcji związków azotu w MFC należą m.in. *Pseudomonas aeruginosa*, *Ochrobactrum anthropi*, *Shewanella oneidensis*, *Comamonas denitrificans*, *Thiobacillus sp.*, *Geobacter sp.*, *Thauera sp.* [92].

Denitryfikatory pełnią w MFC podwójną rolę: stabilizują warunki środowiskowe i usuwają związki azotowe, ale równocześnie mogą ograniczać wydajność elektrochemiczną poprzez konkurencję o elektrony. Optymalizacja stosunku C/N jest kluczowa dla zachowania równowagi między biodegradacją, denitryfikacją a produkcją energii elektrycznej.

Metanogeny

Metanogeny to beztlenowe archeony. Ich charakterystyczną cechą metaboliczną jest zdolność do przeprowadzania metanogenezy, czyli wytwarzania metanu jako końcowego produktu przemian energetycznych. Występują one powszechnie w środowiskach ubogich w akceptory elektronów, takich jak osady denne czy osady ściekowe [92].

W środowisku MFC metanogeny konkurują z egzoelektrogenami o wspólne donory elektronów, takie jak wodór, dwutlenek węgla i kwas mrówkowy [92]. Ich nadmierna aktywność przekierowuje elektrony w stronę metanogenezy, co prowadzi do obniżenia gęstości prądu i efektywności kulombowskiej. W pracy Ngoumelah i in. [129] wykazano, że obecność *Methanobacterium formicicum* powoduje spadek maksymalnej gęstości prądu o około 37 % w anodach zdominowanych przez *Geobacter sulfurreducens*. Z kolei wpływ *Methanosarcina barkeri* ma charakter przejściowy. Początkowo prowadzi do destabilizacji zewnętrznych warstw biofilmu anodowego, jednak w dalszych cyklach obserwuje się częściową regenerację i powrót parametrów elektrochemicznych do wartości zbliżonych do kontroli.

Nadmierny rozwój metanogenów można ograniczać za pomocą różnych strategii. Należą do nich kontrola dawki substratu, okresowe napowietrzanie, zwiększanie powierzchni elektrod, obróbka inokulum oraz stosowanie inhibitorów chemicznych [92]. Wykorzystywanie inhibitorów w praktyce nie jest jednak rozwiązaniem szczególnie korzystnym. Wynika to głównie z ich wysokiego kosztu oraz potencjalnych skutków ubocznych dla innych mikroorganizmów obecnych w układzie.

1.4.5. Czyste szczepy a mieszane społeczności mikrobiologiczne w MFC

W BES wykorzystuje się zarówno czyste kultury bakterii, jak i mieszane społeczności mikrobiologiczne jako inokulum do komory anodowej. Niemniej jednak, z uwagi na specyfikę chemiczną odpadowych substancji hydrofobowych, kultury mieszane wykazują znaczącą przewagę w zastosowaniach praktycznych. Czyste kultury bakterii egzoelektrogennych charakteryzują się wąską specyficnością substratową [130]. Przykładowo, *Geobacter spp.* wykorzystuje głównie kwasy organiczne, etanol i związki aromatyczne, podczas gdy *Pseudomonas spp.*, wykorzystujące glukozę jako główny substrat, nie przetwarzają produktów fermentacji (np. octanu) na energię. *Shewanella spp.* natomiast utlenia jedynie wybrane kwasy organiczne, np. mleczan, do octanu w warunkach beztlenowych. To ogranicza potencjał stosowania czystych kultur bakterii w produkcji prądu elektrycznego oraz degradacji związków hydrofobowych w środowiskach zanieczyszczonych [131]. Jednakże, dla pełnego zrozumienia mechanizmów elektrochemicznych zachodzących w BES, niezbędne są szczegółowe badania kinetyki i termodynamiki procesów zachodzących w czystych kulturach. Analiza tych procesów pozwala na identyfikację kluczowych reakcji transferu elektronów oraz metabolitów pośrednich, co jest niezbędne do racjonalnego projektowania i optymalizacji układów BES [132].

Kultury mieszane, poprzez synergistyczne działanie różnorodnych mikroorganizmów, w tym egzoelektrogenów i nieegzoelektrogenów, umożliwiają efektywne przetwarzanie szerokiego spektrum związków organicznych. Ponadto, wykazują one większą stabilność procesu w warunkach zmiennych parametrów chemicznych i fizykochemicznych, co jest kluczowe w kontekście potencjalnego zastosowania BES w usuwaniu zanieczyszczeń hydrofobowych. Obecność bakterii tlenowych w kulturach mieszanych ogranicza negatywne skutki dyfuzji tlenu przez membranę do komory anodowej. Wszystkie te cechy sprawiają, że układy oparte na mieszanych społecznościach mikrobiologicznych zwykle generują wyższe gęstości prądu w porównaniu z czystymi szczepami [130]. Jako źródło mieszanych społeczności mikrobiologicznych wykorzystuje się próbki pochodzące z naturalnych oraz przemysłowych środowisk, jak na przykład: osad czynny z oczyszczalni ścieków [133], glebę z terenów zanieczyszczonych [134], osady lub wodę ze zbiorników wodnych. Mieszane społeczności mikrobiologiczne zdolne do degradacji określonego substratu oraz symultanicznej produkcji prądu, mogą być uzyskiwane poprzez proces wzbogacania bezpośrednio w BES. Warunki te sprzyjają wzrostowi szczepów egzoelektrogennych, zdolnych do biodegradacji określonego substratu i przetrwania w warunkach anaerobowych lub mikroaerofilnych (tj. przy niskim stężeniu tlenu) panujących w komorze anodowej. Jednocześnie wspierają rozwój szczepów nieegzoelektrogennych, które przeprowadzają reakcje wspomagające degradację złożonych substratów lub ich mieszaniny, dostarczając tym samym substratów dla mikroorganizmów egzoelektrogennych. Badania nad ewolucją dominujących szczepów w kulturach mieszanych, z wykorzystaniem technik biologii molekularnej i analizy metabolomicznej, pozwalają na identyfikację czynników determinujących wydajność i stabilność procesu [130].

1.5. Biosurfaktanty

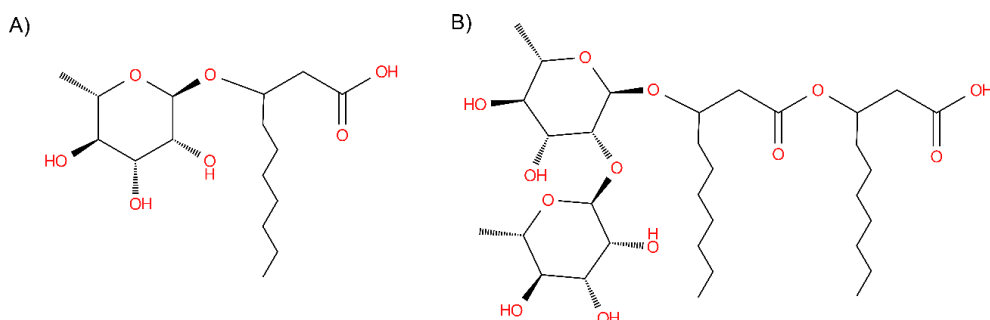
1.5.1. Właściwości i klasyfikacja

Biosurfaktanty to naturalne związki powierzchniowo czynne wytwarzane przez mikroorganizmy takie jak bakterie, grzyby czy drożdże. Są to metabolity wtórne produkowane zarówno na powierzchni komórek, jak i wydzielane do środowiska zewnętrznego. Biosurfaktanty posiadają amfifilową budowę, na którą składa się część hydrofilowa oraz hydrofobowa. Dzięki takiej strukturze wykazują one zdolność do kumulowania się na granicy faz o przeciwnej polarności, np. między wodą a olejem lub cieczą a powietrzem. Ich podstawową funkcją jest obniżanie napięcia powierzchniowego oraz międzyfazowego, co ułatwia rozpuszczanie i emulgowanie związków hydrofobowych, takich jak węglowodory czy oleje [135]. Tworząc cienką warstwę na powierzchni mikroorganizmów, wspomagają także procesy adhezji i desorpcji komórek, wspomagając formowanie się oraz stabilizację biofilmów bakteryjnych. Ponadto biorą udział w regulacji mechanizmów quorum sensing, wpływających na ruchliwość bakterii, komunikację komórkową oraz zachowania zbiorowe populacji drobnoustrojów [136]. W porównaniu do chemicznych środków powierzchniowo czynnych, biosurfaktanty wyróżniają się korzystniejszym profilem

środowiskowym. Są biodegradowalne, mniej toksyczne, wykazują wyższą selektywność oraz zachowują skuteczność w szerokim zakresie temperatur, pH i zasolenia. Dodatkowo charakteryzują się niższym krytycznym stężeniem micelizacji (CMC, ang. Critical Micelle Concentration), co oznacza, że osiągają efektywność w niższych stężeniach, co znacząco zwiększa ich potencjał aplikacyjny w biotechnologii i ochronie środowiska [137], [138].

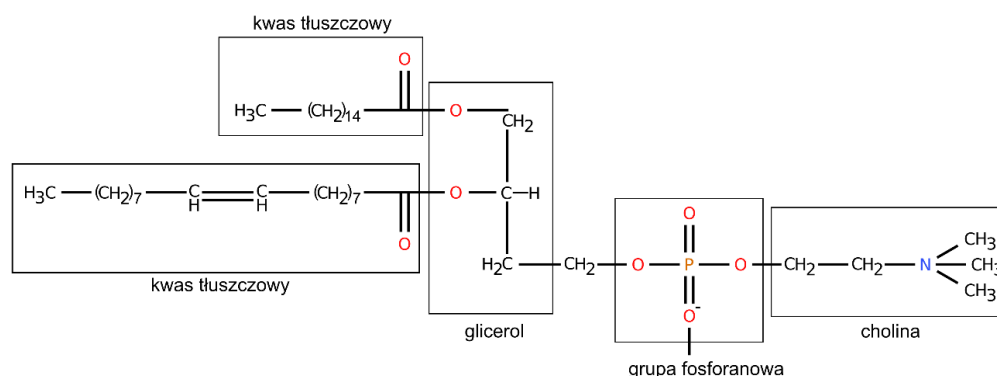
Biosurfaktanty dzieli się na pięć głównych grup w zależności od ich budowy chemicznej oraz właściwości fizykochemicznych: 1) glikolipidy, 2) fosfolipidy i kwasy tłuszczowe, 3) lipopeptydy i lipoproteiny, 4) biosurfaktanty polimerowe oraz 5) biosurfaktanty cząsteczkowe.

1) **Glikolipidy** należą do najczęściej spotykanych niskocząsteczkowych biosurfaktantów. Składają się z jednej lub kilku jednostek cukrowych (część hydrofilowa) oraz długołańcuchowego kwasu tłuszczowego (część hydrofobowa). Do najlepiej poznanych glikolipidów zalicza się ramnolipidy (**Rysunek 5A,B**) wytwarzane przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas* [139], soforolipidy syntezowane przez drożdże z rodzaju *Candida* [140], oraz trehalolipidy produkowane przez mikroorganizmy takie jak *Gordonia sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Mycobacterium sp.* oraz *Nocardia sp.* [141].



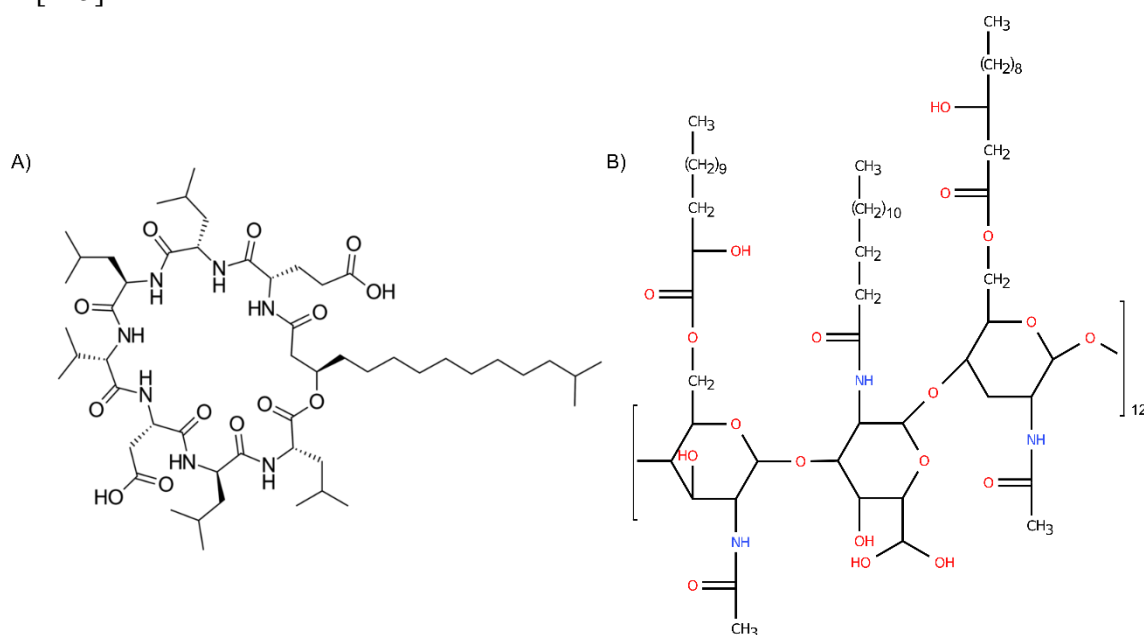
Rysunek 5 Przykładowe struktury chemiczne biosurfaktantów z grupy glikolipidów: A) monoramnolipid, B) diramnolipid.

2) **Fosfolipidy oraz wolne kwasy tłuszczowe**, wytwarzane przez niektóre mikroorganizmy rozkładające węglowodory, pełnią funkcję naturalnych biosurfaktantów. Fosfolipidy składają się z reszt fosforanowych, glicerolu, kwasów tłuszczowych oraz często z dodatkowych grup, takich jak cholina (**Rysunek 6**). Kwasy tłuszczowe stanowią podstawowy element lipidów błonowych, a w środowisku mogą istotnie wspierać proces emulgacji substancji hydrofobowych. Wiele bakterii i drożdży syntetyzuje takie związki w trakcie wzrostu na n-alkanach. Przykładowo, przedstawiciele rodzaju *Acinetobacter* [142] oraz szczepy *Rhodococcus erythropolis* [143] produkują fosfolipidy bogate w fosfatydyloetanoloaminę, które ułatwiają tworzenie stabilnych emulsji alkanów w wodzie.



Rysunek 6 Przykładowa struktura chemiczna biosurfaktantu fosfolipidowego: fosfolipidu.

- 3) **Lipopeptydy i lipoproteiny**, będące złożonymi cząsteczkami, składają się z części lipidowej i odpowiednio: peptydowej oraz białkowej. Klasycznym przykładem tej grupy związków jest surfaktyna, syntezowana przez bakterie z gatunku *Bacillus subtilis* (**Rysunek 7A**). Posiada strukturę cyklicznego peptydu złożonego z siedmiu aminokwasów, który jest sprzężony z łańcuchem kwasu tłuszczowego poprzez wiązanie laktonowe. Związek ten charakteryzuje się wyjątkowo silnym działaniem powierzchniowo czynnym oraz szerokim spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej [144].
- 4) **Biosurfaktanty polimerowe** to związki wielkocząsteczkowe, takie jak emulsan (**Rysunek 7B**) czy biodispersan. Charakteryzują się wysoką zdolnością do emulgowania różnych typów olejów i węglowodorów, prowadząc do powstawania stabilnych emulsji, a dodatkowo wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe [145].



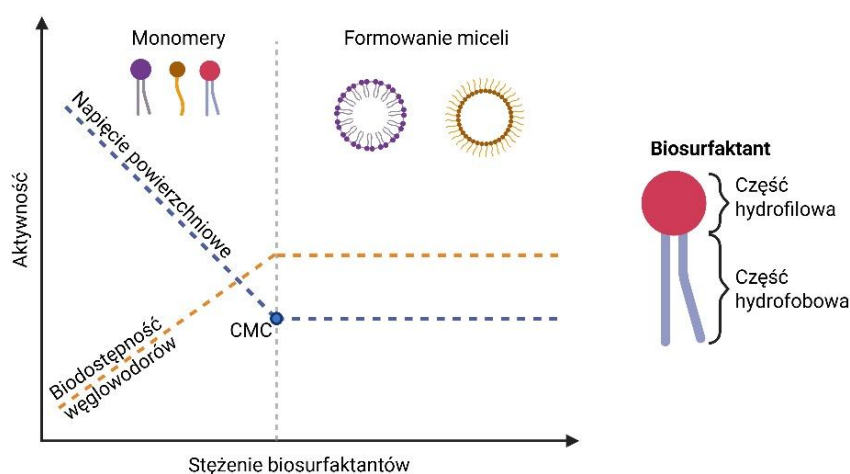
Rysunek 7 Struktury chemiczne przykładowych biosurfaktantów z grupy lipopeptydów: A) surfaktyna, oraz biosurfaktantów polimerowych: B) emulsan.

- 5) Do kategorii **biosurfaktantów cząsteczkowych** zalicza się zarówno pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, jak i całe komórki mikroorganizmów, które mogą aktywnie oddziaływać z hydrofobowymi zanieczyszczeniami. Pęcherzyki te, zbudowane głównie z białek, fosfolipidów i lipopolisacharydów, mogą akumulować się na powierzchni komórek podczas wzrostu na alkanach. Przykładowo, u przedstawicieli rodzaju *Acinetobacter* hodowanych na heksadekanie zaobserwowano powstawanie struktur o średnicy 20-50 nm, które stanowią istotny element mechanizmu emulgacji związków hydrofobowych [142].

1.5.2. Rola biosurfaktantów w degradacji zanieczyszczeń

Biosurfaktanty stanowią istotny element w procesach biodegradacji zanieczyszczeń hydrofobowych, takich jak węglowodory ropopochodne czy posmażalnicy oleje roślinne. Ich podstawową funkcją jest zwiększanie biodostępności trudnorozpuszczalnych związków organicznych. W zależności od rodzaju układu, hydrofilowe grupy biosurfaktantu mogą agregować się na granicy faz i być zwrócone do wewnątrz lub na zewnątrz układu. Efekt ten uzyskiwany jest poprzez obniżenie napięcia powierzchniowego i międzyfazowego oraz formowanie stabilnych emulsji i miceli. To umożliwia efektywne rozproszenie i pseudosolubilizację zanieczyszczeń w fazie wodnej.

Wraz ze wzrostem stężenia biosurfaktantów w roztworze obserwuje się obniżanie napięcia powierzchniowego oraz zwiększenie biodostępności zanieczyszczeń, co zilustrowano na **Rysunku 8**. Po osiągnięciu krytycznego stężenia micelizacji (CMC) dalszy wzrost stężenia nie wpływa już na napięcie powierzchniowe, lecz prowadzi do formowania miceli. Powstałe micelle stabilizują układ i zwiększają efektywność usuwania zanieczyszczeń hydrofobowych.



Rysunek 8 Zależność pomiędzy stężeniem biosurfaktantów w roztworze a napięciem powierzchniowym oraz biodostępnością węglowodorów.

Biosurfaktanty mogą także mobilizować zanieczyszczenia związane z matrycą stałą, taką jak gleba lub osady. Poprzez zmniejszenie sił adhezji między cząsteczkami zanieczyszczeń a powierzchnią podłoża ułatwiają ich oderwanie i przejście do roztworu wodnego, gdzie stają się dostępne dla mikroorganizmów [135]. Istotnym aspektem ich działania jest również modyfikacja właściwości powierzchniowych komórek mikroorganizmów. Biosurfaktanty zwiększają hydrofobowość powierzchni bakterii, co ułatwia ich adsorpcję na granicy faz ciecz-ciecz lub ciecz-ciało stałe. Dzięki temu możliwy jest bezpośredni kontakt mikroorganizmów z kroplami oleju lub cząstkami zanieczyszczeń, co przekłada się na szybszy i bardziej efektywny przebieg biodegradacji. Przykładowo, ramnolipidy zwiększają adhezję komórek *Pseudomonas putida* do powierzchni hydrofobowych [145].

Na poziomie komórkowym, biosurfaktanty mogą wpływać również na strukturę błon cytoplazmatycznych. Wykazano, że ramnolipidy mogą destabilizować zewnętrzne warstwy błony u *Pseudomonas aeruginosa*, usuwając lipopolisacharydy (LPS). W ten sposób zwiększają hydrofobowość powierzchni komórek bakteryjnych, co w efekcie ułatwia transport związków hydrofobowych do wnętrza komórki [146]. W innej pracy wykazano, że ramnolipidy mogą istotnie modyfikować strukturę osłon komórkowych bakterii z rodzaju *Bacillus*. Prowadzą do utraty białek błonowych, redukcji zawartości peptydoglikanu w ścianie komórkowej oraz formowania licznych kanałów transbłonowych. Efektem tych zmian jest zwiększona przepuszczalność osłon komórkowych, co bezpośrednio przekłada się na intensyfikację pobierania związków hydrofobowych oraz wzrost aktywności enzymów redoks wewnątrz komórek, wspierając tym samym procesy biodegradacji [147]. Wyniki tej pracy wskazują, że modyfikacja struktury powierzchniowej komórek stanowi istotny czynnik determinujący skuteczność degradacji zanieczyszczeń hydrofobowych.

W złożonych środowiskach naturalnych biosurfaktanty odgrywają również rolę regulatorów interakcji międzykomórkowych. Poza funkcją fizykochemiczną, wspierają tworzenie i stabilizację struktury biofilmu, co umożliwia mikroorganizmom przetrwanie w niekorzystnych warunkach oraz prowadzenie skutecznej degradacji w dłuższym czasie. Niektóre biosurfaktanty wpływają ponadto na mechanizmy quorum sensing, modulując ekspresję genów związanych z degradacją zanieczyszczeń oraz adaptacją metaboliczną mikroorganizmów [148].

Warto również podkreślić, że biosurfaktanty mogą być produkowane *in situ* przez mikroorganizmy uczestniczące w bioremediacji. W takich warunkach zaobserwowano skrócenie fazy adaptacyjnej drobnoustrojów do obecności zanieczyszczeń i tym samym przyspieszenie całego procesu oczyszczania [135]. Zdolność niektórych szczepów do jednoczesnej produkcji biosurfaktantów i degradacji związków organicznych sprawia, że mikroorganizmy te aktywnie modyfikują własne środowisko metaboliczne, zwiększając efektywność bioremediacji.

Liczne prace potwierdzają skuteczność takiego podejścia. Przykładowo, dodatek ramnolipidów do konsorcjum bakteryjnego degradującego mieszaninę oleju napędowego i biodiesla pozwolił osiągnąć około 77% usunięcia węglowodorów w ciągu 7 dni,

podczas gdy bez dodatku biosurfaktantu degradacja wyniosła 58 % [149]. Podobnie, zastosowanie biosurfaktantu glikolipidowego w układzie zanieczyszczonym ropą naftową zwiększyło efektywność degradacji o około 20 % [150]. W badaniach nad heksadekanem zaobserwowano wzrost stopnia usunięcia zanieczyszczenia z 78 % do 93 % po zastosowaniu ramnolipidów [151]. Biodegradacja zanieczyszczeń olejowych z udziałem konsorcjum *Pseudomonas aeruginosa* i *Rhodococcus sp.* również uległa przyspieszeniu po dodaniu biosurfaktantu, z 52 % do 98 % w ciągu 8 tygodni [152].

Podsumowując, przedstawione dane potwierdzają kluczową rolę biosurfaktantów we wspomaganiu biodegradacji zanieczyszczeń organicznych. Zwiększają biodostępność związków hydrofobowych i ułatwiają ich wykorzystanie przez mikroorganizmy. Wpływają również na procesy adhezji, desorpcji i transportu, a także na regulację metabolizmu komórek. W rezultacie przyczyniają się do zwiększenia stopnia rozkładu zanieczyszczeń oraz skrócenia czasu trwania procesu biodegradacji.

1.5.3. Znaczenie biosurfaktantów w układach BES

Biosurfaktanty mogą pełnić w układach bioelektrochemicznych szereg funkcji, które przekładają się zarówno na poprawę wydajności procesów elektrochemicznych, jak i na stabilność i długoterminową efektywność całego układu. Chociaż szczegółowe mechanizmy działania biosurfaktantów w układach bioelektrochemicznych nie zostały jeszcze poznane, dostępne prace wskazują, że ich obecność korzystnie wpływa na strukturę i przewodnictwo biofilmu anodowego, efektywność degradacji związków hydrofobowych oraz skuteczność wytwarzania energii [153].

Jednym z kluczowych efektów działania biosurfaktantów w BES jest zwiększenie przepuszczalności błon komórkowych egzoelektrogenów, co ułatwia transport mediatorów redoks i tym samym przyspiesza pośredni transfer elektronów. Efektem jest obniżenie oporu wewnętrznego układu (R_{wew}) i wzrost wydajności prądowej. Analizy wykazały, że zastosowanie ramnolipidów, soforolipidów czy trehalozylolipidów może prowadzić do spadku R_{wew} nawet o 40 %, przy jednoczesnym wzroście gęstości mocy o kilkadziesiąt do kilkuset procent w porównaniu do układów kontrolnych [153].

Istotną funkcją biosurfaktantów jest również wspieranie tworzenia biofilmu anodowego. Ułatwiają one przyleganie komórek do powierzchni elektrod, modyfikując ich właściwości powierzchniowe i sprzyjając kolonizacji. Zastosowanie ramnolipidów w odpowiednich stężeniach prowadziło do znacznego zwiększenia grubości biofilmu oraz liczebności egzoelektrogenów. Dodatkowo zaobserwowano także istotne zmiany w składzie taksonomicznym biofilmu. Obecność biosurfaktantów promuje rozwój takich rodzajów bakterii jak *Geobacter*, *Desulfovibrio* czy *Aeromonass*, zwiększając udział egzoelektrogenów i poprawiając przewodność biofilmu [154].

Na poziomie elektrody biosurfaktanty wpływają na właściwości powierzchni anod i katod. Mogą poprawiać zwilżalność anody, co zwiększa efektywność kolonizacji przez komórki drobnoustrojów oraz tworzenie i stabilizację biofilmu. Mogą także służyć jako środek do regeneracji zanieczyszczonych elektrod. Wykazano, że zastosowanie

mieszaniny niejonowego surfaktantu z roztworem zasadowym umożliwia skuteczne usuwanie biofilmu z powierzchni katody i przywrócenie jej pierwotnej aktywności elektrochemicznej, bez konieczności stosowania metod mechanicznych [155].

Biosurfaktanty wpływają również na szlaki metaboliczne mikroorganizmów, w tym na produkcję mediatorów elektronowych (np. fenazyń). U *Pseudomonas aeruginosa* wykazano współregulację szlaków biosyntezy ramnolipidów i piocyjaniny [156]. W innych pracach obserwowano, że jednoczesna obecność tych dwóch związków skutkuje synergistycznym zwiększeniem transferu elektronów, umożliwiając generowanie prądu, nawet u bakterii nieposiadających naturalnej zdolności do bezpośredniego przenoszenia elektronów na anodę [157].

Zastosowanie biosurfaktantów w BES może różnie wpływać na przebieg degradacji związków trudnorozpuszczalnych. Ich obecność często zwiększa biodostępność hydrofobowych zanieczyszczeń, co usprawnia ich rozkład przez mikroorganizmy i może prowadzić do wzrostu generowanej mocy. Efekt ten jest silnie zależny od rodzaju zastosowanego surfaktantu, jego stężenia oraz charakteru chemicznego (np. jonowego, niejonowego, amfoterycznego). W pracy Hwang i in. [158] wykazano, że dodatek anionowego surfaktantu SDS (dodecylosiarczan sodu) poprawił parametry elektrochemiczne oraz efektywność biodegradacji, podczas gdy surfaktant niejonowy Triton X-100 wywołał znaczący spadek wydajności układu. Obecność biosurfaktantów może wpływać także na strukturę taksonomiczną biofilmu anodowego poprzez selektywną stymulację wzrostu określonych grup mikroorganizmów oraz wykazywanie działania bakteriobójczego wobec wrażliwych taksonów, co prowadzi do przekształcenia składu społeczności mikrobiologicznej [159]. Z tego względu zastosowanie biosurfaktantów w systemach BES wymaga każdorazowo indywidualnej optymalizacji i oceny wpływu na mikroflorę oraz funkcjonowanie całego układu.

Coraz większe znaczenie zyskuje również możliwość biosyntezy biosurfaktantów bezpośrednio w układzie BES. Przykładem jest praca Zheng i in. [160], w której wykazano, że genetycznie modyfikowany szczep *Pseudomonas aeruginosa* nadprodukuje ramnolipidy generował ponad 2,5-krotnie wyższą moc w MFC, przy zastosowaniu glukozy jako jedyne źródła węgla. To podkreśla możliwy pozytywny wpływ produkcji biosurfaktantów *in situ* na elektrogenność biofilmu i wydajność układu.

Niemniej jednak, w literaturze dostępnych jest niewiele prac poświęconych produkcji biosurfaktantów w BES z substratami takimi jak węglowodory ropopochodne czy posmażalnice oleje roślinne. To wskazuje na potrzebę dalszych badań umożliwiających opracowanie wydajnych metod bioremediacji środowisk zanieczyszczonych związkami hydrofobowymi. Biosurfaktanty wytwarzane bezpośrednio w BES mogą przy tym ograniczyć koszty, zwiększyć efektywność procesów i stworzyć nowe możliwości integracji oczyszczania środowiska z odzyskiem energii.

2. CEL I ZAKRES PRACY

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej była analiza składu oraz funkcjonalności anodowych społeczności mikroorganizmów rozwijających się w MFC, ze szczególnym uwzględnieniem ich zdolności do biodegradacji węglowodorów, produkcji biosurfaktantów oraz wytwarzania energii elektrycznej. Przyjęto, że skuteczność degradacji i wydajność bioelektrochemiczna zależą od składu taksonomicznego mikrobiomu anodowego oraz warunków pracy układu, w tym odpowiedniej strategii inokulacji, zastosowania kosubstratów oraz potencjału anody. W eksperymentach zastosowano pięć różnych konstrukcji układów MFC oraz cztery typy substratów: benzen, ropę naftową, olej napędowy i olej posmażalniczy. Takie podejście pozwoliło uzyskać pełniejszy obraz zależności pomiędzy rodzajem zanieczyszczenia, strukturą i aktywnością społeczności mikroorganizmów a efektywnością procesów bioelektrochemicznych. Do rozwinięcia tych zagadnień zastosowano m.in. analizy elektrochemiczne, metagenomiczne oraz metabolomiczne, co umożliwiło kompleksową ocenę zarówno struktury, jak i funkcjonalności anodowych społeczności mikroorganizmów w układach bioelektrochemicznych. Aby osiągnąć cel główny wyznaczono pięć celów szczegółowych.

Cele szczegółowe:

1. Określenie wpływu benzenu na rozwój społeczności anodowych w MFC z dodatkiem glukozy jako kosubstratu, poprzez analizę składu taksonomicznego mikrobiomu oraz aktywności metabolicznej drobnoustrojów odpowiedzialnych za degradację benzenu, z uwzględnieniem oceny parametrów elektrochemicznych oraz wydajności ogniw.
2. Analiza wpływu przyłożonego potencjału anodowego na strukturę, bioróżnorodność i funkcjonalność mikrobiomów anodowych rozwijających się w MFC zasilanych olejem napędowym, ze szczególnym uwzględnieniem udziału mikroorganizmów zdolnych do zewnątrzkomórkowego transferu elektronów i degradacji węglowodorów.
3. Ocena wpływu pochodzenia inokulum i zastosowania kosubstratu na wydajność MFC oraz na skład taksonomiczny i potencjał funkcjonalny anodowych społeczności mikroorganizmów zaangażowanych w degradację węglowodorów, produkcję biosurfaktantów i transfer elektronów, z wykorzystaniem analiz elektrochemicznych i metagenomicznych.
4. Przeprowadzenie próby skalowania układów MFC oraz ocena stabilności elektrochemicznej i produkcji biosurfaktantów w czasie długotrwałej eksploatacji, wraz z identyfikacją kluczowych taksonów egzoelektrogennych, produkujących biosurfaktanty oraz degradujących związki ropopochodne.
5. Identyfikacja ramnolipidów z wykorzystaniem opracowanego protokołu analitycznego LC-MS/MS, dedykowanego dla MFC degradujących związki hydrofobowe oraz identyfikacja dominujących taksonów w mikrobiomie anodowym w procesie produkcji biosurfaktantów z oleju posmażalniczego.

3. METODYKA I MATERIAŁY

3.1. Projektowanie i konstrukcja MFC

Układy bioelektrochemiczne zastosowane w trakcie badań nad rozprawą doktorską zostały zaprojektowane w Laboratorium Mikrobiologicznych Układów Elektrochemicznych i dopasowane dla każdego z wykonanych eksperymentów. We wszystkich eksperymentach wykorzystano jednokomorowe mikrobiologiczne ogniwa paliwowe z katodą powietrzną, pracujące w trybie wsadowym. W pracy doktorskiej zastosowano różne materiały oraz technologie do budowy MFC. Poszczególne ogniwa zostały wykonane z polipropylenu (PP) przy użyciu technologii druku 3D (Prusa i3 MK3S, Prusa Research, Czechy); przy wykorzystaniu gotowych pojemników polipropylenowych; z płyt akrylowych (PMMA – polimetakrylan metylu) o grubości 3 mm, docinanych na wymiar przy pomocy plotera laserowego. Anody zostały wykonane z welonu węglowego o gramaturze 30 g/m² (PRF Composite Materials, Dorset, United Kingdom). Katody składały się z welonu węglowego, pasty węglowej (węgiel CWZ-22 zmieszany z wodą) i kolektora elektronów z siatki ze stali nierdzewnej. Zarówno anoda, jak i katoda były połączone drutem Ni-Cr (Ø 0,66 mm, ALBU, Polska) z rezystorem. Elektrody były oddzielone membraną kationowymienną (CMI-7000, Membranes International, USA). W zależności od zastosowanego materiału do budowy MFC, użyto innej metody do sterylizacji ogniw. W przypadku ogniw szklanych było to autoklawowanie (120 °C, 15 min) oraz sterylizacja roztworem do lizy zgodnie z metodyką opisaną w pracy Pasternak i in. [155]. Ogniwa wykonane z PP poddano trzykrotnej sterylizacji 70 % (v/v) roztworem etanolu w wodzie. Dla MFC wykonanych z PMMA w celu sterylizacji również zastosowano roztwór do lizy. Po zakończonym procesie sterylizacji w celu usunięcia pozostałości zastosowanych rozpuszczalników, MFC trzykrotnie przepłukano sterylną wodą dejonizowaną MiliQ. Szczegółowe dane dotyczące projektu i konstrukcji zastosowanych ogniw przedstawiono w **Tabeli 2**.

Tabela 2 Dane dotyczące konstrukcji i działania układów BES.

	Rozdział 4.1	Rozdział 4.2	Rozdział 4.3.1	Rozdział 4.3.2	Rozdział 4.4
Typ układu	Jednokomorowe ogniwo z katodą powietrzną				
Materiał do budowy BES	PP	PP	PP	PMMA	PP
Anoda	Welon węglowy o gramaturze 30 g/m ²				
Katoda	Welon węglowy, węgiel aktywny CWZ-22, kolektor z siatki ze stali nierdzewnej				
Membrana	Membrana kationowymienna (CEM)				
Objętość robocza reaktora	20 cm ³	150 cm ³	6 cm ³	25 cm ³	20 cm ³
Źródło węgla	Benzen i glukoza	Olej napędowy	Ropa naftowa i octan sodu	Ropa naftowa i octan sodu	Olej posmażalniczy

3.2. Materiał biologiczny

Materiał biologiczny wykorzystany w niniejszej rozprawie doktorskiej obejmował próbki gleb, wód i osadów oraz wyizolowane szczepy mikroorganizmów. Materiał ten pochodził z różnych regionów geograficznych i został zgromadzony w ramach wcześniejszych projektów badawczych w Laboratorium Mikrobiologicznych Układów Elektrochemicznych. Spis wszystkich zastosowanych próbek biologicznych zamieszczono w **Tabeli 3**.

Tabela 3 Charakterystyka materiału biologicznego wykorzystanego w eksperymentach.

Rodzaj materiału biologicznego	Źródło / Lokalizacja	Uwagi
Szczep bakteryjny: <i>Ochrobactrum anthropi 1</i>	Tereny zanieczyszczone związkami ropopochodnymi (Polska)	Mikroorganizmy wyizolowane z próbek gleby, w ramach wcześniejszych projektów badawczych
Szczep bakteryjny: <i>Ochrobactrum anthropi 2</i>		
Szczep bakteryjny: <i>Epilithonimonas hominis</i>		
Szczep bakteryjny: <i>Novosphingobium suppressis</i>		
Szczep bakteryjny: <i>Rhodococcus qingshengii</i>		
Gleba	Parking miejski (Wrocław, Polska)	Zanieczyszczone ropopochodnie
Gleba	Gleba tropikalna (Sri Lanka)	Środowisko naturalne
Gleba	Wulkan błotny (Azerbejdżan)	
Gleba / Osad	Kanał ściekowy przy stacji paliw (Wrocław, Polska)	Zanieczyszczone ropopochodnie
Gleba	Okolice skrzynki rozładunku paliw (Wielgie, Polska)	
Gleba / Osad	Separator substancji ropopochodnych (Wielgie, Polska)	
Osad czynny 1	Oczyszczalnia ścieków (Ścinawka Dolna, Polska)	Materiał z wcześniejszych badań prowadzonych w laboratorium
Osad czynny 2		
Woda / Osad	Jezioro pokopalniane (Rudawy Janowickie, Polska)	Środowiska górskie
Woda	Lodowiec (Engelberg, Austria)	
Woda / Osad	Rzeka polodowcowa (Engelberg, Austria)	

3.3. Pożywki mikrobiologiczne

Jako medium w komorach anodowych układów BES stosowano podłoże mineralne (MSM, ang. mineral salt medium) o określonym składzie: 0,5 - 1,5 g/L NH_4Cl (Chempur, Polska); 0,6 g/L Na_2HPO_4 (POCH, Polska); 0,1 g/L KCl (POCH, Polska); 2,5 g/L NaHCO_3 (Chempur, Polska); 10 mL/L roztworu pierwiastków śladowych według receptury określonej dla medium 141 przez DSMZ [161]. Odczyn pH MSM był równy 7,5. Wszystkie roztwory zostały przygotowane przy użyciu wody dejonizowanej Milli-Q i sterylizowane w autoklawie przed użyciem (121 °C, 20 min.).

3.4. Eksperymenty elektrochemiczne

3.4.1. Pomiar napięcia w czasie rzeczywistym (RTM)

We wszystkich wykonanych eksperymentach monitorowano napięcie generowane przez ogniwa. Dane zbierano za pomocą systemu akwizycji danych BenchVue Keysight DAQ970A (Keysight Technologies, USA). Napięcie generowane przez MFC było mierzone w czasie rzeczywistym i rejestrowane co 3 minuty. Gęstość mocy obliczono zgodnie z prawem Ohma w następujący sposób:

$$P = \frac{U^2}{R * A} \left[\frac{W}{m^2} \right]$$

gdzie U to napięcie [V], R to rezystancja [Ω], A to powierzchnia geometryczna anody [m^2].

3.4.2. Woltamperometria liniowa (LSV)

Eksperymenty LSV wykonywano w celu określenia maksymalnej gęstości mocy generowanej przez ogniwo, a także do wyznaczenia krzywych polaryzacji. Krzywe polaryzacyjne umożliwiają ogólną ocenę wydajności ogniwa w określonych warunkach pracy, co pozwala na analizę strat napięcia zachodzących podczas jego pracy, w szczególności strat aktywacyjnych, omowych oraz dyfuzyjnych (transportowych).

Eksperymenty polaryzacji przeprowadzono w dwóch wariantach konfiguracyjnych: dwu- oraz trójelektrodowym. W układzie dwuelektrodowym rolę elektrody pracującej pełniła anoda, natomiast katoda służyła jednocześnie jako przeciwelektroda i elektroda odniesienia. Z kolei w układzie trójelektrodowym funkcję elektrody pracującej również pełniła anoda, a katoda wykorzystywana była wyłącznie jako przeciwelektroda. W tej konfiguracji pomiar potencjału odbywał się względem nasyconej elektrody chlorosrebrowej (Ag/AgCl), umieszczonej w komorze anodowej jako elektroda odniesienia. Eksperymenty LSV (ang. Linear Sweep Voltammetry) przeprowadzono przy użyciu wielokanałowego potencjostatu (VSP, BioLogic) oraz potencjostatu MultiPalmSens4 (PalmSens BV, Holandia). Polaryzację przeprowadzono od potencjału obwodu otwartego (OCP ang. open circuit potential) do 0 V elektrody pracującej względem elektrody odniesienia, z szybkością skanowania 1 mV/s. Wszystkie dane

zostały znormalizowane do geometrycznej powierzchni elektrody anodowej. Uzyskane dane eksperymentalne pozwoliły na wyznaczenie istotnych parametrów operacyjnych układu bioelektrochemicznego: maksymalna gęstość mocy, gęstość prądu i optymalna rezystancja.

3.4.3. Chronoamperometria

Metodę chronoamperometrii zastosowano do oceny wpływu zadanego potencjału zewnętrznego na skład społeczności drobnoustrojów na anodzie oraz w anodzie. W zależności od przeprowadzanych eksperymentów, na anodę (elektrodę pracującą) aplikowano stały potencjał o różnych wartościach. Pomiary prowadzono w trójelektrodowym układzie elektrochemicznym, gdzie katoda pełniła funkcję przeciwelektrody, a elektroda referencyjna (Ag/AgCl) służyła do stabilizacji potencjału. Natężenie prądu było monitorowane co 3 minuty przy użyciu potencjostatu wielokanałowego MultiPalmSens4 (PalmSens, Holandia).

3.4.4. Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (EIS)

Do oceny wydajności poszczególnych elementów MFC zastosowano metodę elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS, ang. Electrochemical Impedance Spectroscopy). Pomiary EIS wykonano dla całego ogniwa w warunkach obwodu otwartego, przy czym anoda pełniła rolę elektrody roboczej, a katoda funkcję przeciwelektrody i elektrody odniesienia. W testach wykorzystano potencjostat MultiPalmSens4 (PalmSens BV, Holandia) oraz prąd przemienny o amplitudzie 10 mV i zakresie częstotliwości od 100 kHz do 10 mHz.

3.4.5. Woltamperometria cykliczna (CV)

Woltamperometria cykliczna (CV, ang. Cyclic Voltammetry) umożliwia analizę procesów redoks zachodzących na powierzchni elektrod. W niniejszej pracy, woltamperometrię cykliczną wykorzystano do analizy aktywności elektrochemicznej biofilmu na powierzchni anody. Pomiary przeprowadzono w konfiguracji dwuelektrodowej, w zakresie potencjałów od -600 do 600 mV względem katody jako elektrody odniesienia, przy szybkości skanowania 1 mV/s, w temperaturze 25 °C.

3.5. Analiza struktury i aktywności społeczności drobnoustrojów

3.5.1. Ekstrakcja DNA

Próbki do izolacji DNA zostały pobrane z anolitów lub powierzchni anody. Całkowite DNA ekstrahowano przy użyciu zestawu Bead-Beat Micro AX Gravity firmy A&A BIOTECHNOLOGY (Warszawa, Polska). Jakość i ilość ekstraktów DNA oceniono za pomocą pomiarów spektrofotometrycznych wykonanych na urządzeniu NanoDrop™ 2000/2000c firmy Thermo Fisher Scientific (USA).

3.5.2. Sekwencjonowanie regionu V3-V4 genu 16S rRNA

Sekwencjonowanie regionu V3-V4 genu 16S rRNA zostało przeprowadzone w Genomed S.A. (Warszawa) zgodnie z protokołem producenta. W celu identyfikacji i klasyfikacji bakterii oraz archeonów w badanych próbkach, zastosowano metodę metagenomiki opartej na sekwencjonowaniu amplikonów hiperzmiennego regionu V3-V4 genu 16S rRNA. Do amplifikacji PCR i przygotowania biblioteki wykorzystano specyficzne startery 341F i 785R [162]. Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix od New England BioLabs został użyty jako zestaw odczynników w reakcjach PCR, zgodnie z zalecanymi warunkami dostarczonymi przez producenta. Sekwencjonowanie parami przeprowadzono na urządzeniu MiSeq przy użyciu zestawu Illumina v3, uzyskując odczyty o długości 2x300nt. Automatyczna wstępna analiza danych, obejmująca demultiplekowanie próbek oraz generowanie plików fastq, została przeprowadzona na sekwenatorze MiSeq z wykorzystaniem oprogramowania MiSeq Reporter (MSR) v2.6.

3.5.3. Sekwencjonowanie pełnego metagenomu

Sekwencjonowanie metagenomiczne typu shotgun, oparte na technologii NGS (ang. next generation sequencing), pozwala na kompleksową analizę metagenomów. Dzięki temu możliwa jest identyfikacja i klasyfikacja organizmów wchodzących w skład danej społeczności (profilowanie taksonomiczne), identyfikacja genów obecnych w tych organizmach oraz określenie potencjalnych szlaków metabolicznych, które te społeczności mogą przeprowadzać. Sekwencjonowanie NGS zostało przeprowadzone w Genomed S.A. (Warszawa) zgodnie z protokołem producenta. W tym celu całkowite DNA metagenomowe poddano mechanicznej fragmentacji za pomocą sonikacji przy użyciu urządzenia Covaris E220 (Covaris), uzyskując fragmenty o długości 200-500 par zasad. Oczyszczanie pofragmentowanego DNA przeprowadzono z wykorzystaniem kulek magnetycznych AMPure XP (Beckman Coulter). Następnie, zgodnie z protokołem producenta, przygotowano biblioteki NGS do sekwencjonowania metodą ligacji, wykorzystując zestaw NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs). W celu weryfikacji poprawności przygotowanych bibliotek, przeprowadzono analizę ich rozmiaru za pomocą Bioanalyzer 2100 z chipem o wysokiej czułości (Agilent) oraz ilościowy pomiar za pomocą qPCR. Sekwencjonowanie metodą parzystą (150PE) przeprowadzono na platformie NovaSeq6000 (Illumina), generując 40 milionów odczytów na próbkę.

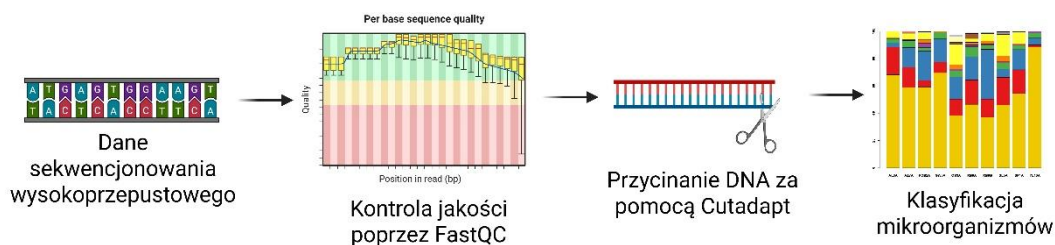
3.5.4. Analiza bioinformatyczna danych z sekwencjonowania 16S rRNA

Analizę bioinformatyczną przeprowadzono przy użyciu platformy QIIME 2 i pakietu DADA2. Wstępna analiza bioinformatyczna obejmowała kontrolę jakości i wstępne przetwarzanie sekwencji. Kontrola jakości obejmowała dynamiczne generowanie parametrów kontrolnych w oparciu o model błędu specyficznego dla każdej próbki przy użyciu narzędzia FIGARO. Ponadto przeprowadzono kontrolę jakości w celu zapewnienia, że maksymalne oczekiwane poziomy błędów dla każdej próbki zostały

spełnione. Uzyskane sekwencje zostały wstępnie przetworzone przy użyciu narzędzia Cutadapt. Następnie wyselekcjonowano unikalne sekwencje amplikonów (ASV, ang. amplicon sequence variants) przy użyciu pakietu DADA2. Klasyfikację taksonomiczną sekwencji ASV przeprowadzono przy użyciu referencyjnej bazy danych Silva 138 z dwuetapową metodą hybrydową. Najpierw przeprowadzono dokładne dopasowanie odczytów do referencyjnej bazy danych za pomocą narzędzia vsearch. Wszelkie odczyty, które nie zostały rozpoznane w poprzednim kroku, zostały sklasyfikowane przy użyciu metody opartej na uczeniu maszynowym (sklearn) dostępnej w module QIIME q2-feature-classifier [163].

3.5.5. Analiza bioinformatyczna danych z sekwencjonowania typu shotgun

Schemat analizy bioinformatycznej przedstawiono na **Rysunku 9**. Jakość surowych odczytów metagenomicznych oceniono za pomocą FastQC [164] (wersja 0.11.9). Odczyty krótsze niż 100 bp i/lub zawierające jednoznaczne nukleotydy zostały usunięte, a zasady z wynikiem jakości mniejszym niż 20 zostały przycięte za pomocą Cutadapt [165] (wersja 4.1). Kontrolę jakości dla przyciętych sekwencji przeprowadzono ponownie przy użyciu programu FastQC. Skład i strukturę społeczności bakterii i archeonów sklasyfikowano do poziomu gatunku za pomocą Kaiju [166] (v. 1.9.0; baza danych: NCBI-nr-10.03.2022). [168] Program MEGAHIT [167] (wersja 1.2.9) został użyty do złożenia odczytów o kontrolowanej jakości w kontigi (minimalna długość 1000 bp).

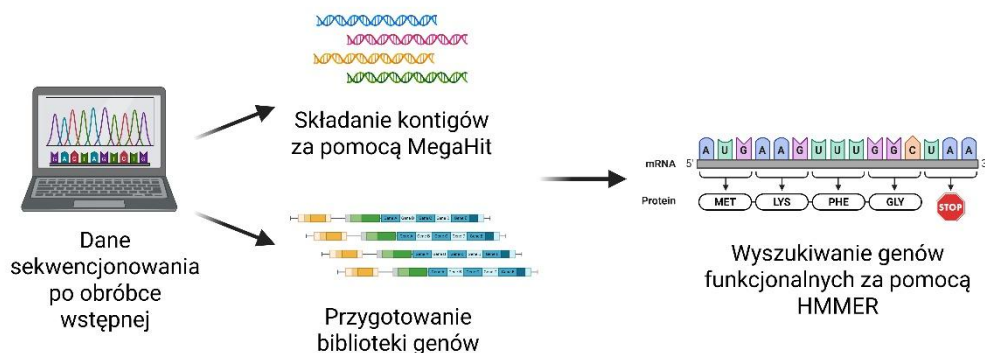


Rysunek 9 Schemat analizy bioinformatycznej danych sekwencjonowania wysokoprzepustowego typu shotgun.

3.5.6. Identyfikacja genów odpowiedzialnych za degradację węglowodorów

Schemat analizy genomowej przedstawiono na **Rysunku 10**. Kontigi wykorzystano do wykrycia 59 genów związanych z degradacją węglowodorów (HDG, ang. hydrocarbon degradation-related genes) za pomocą serwera HMMER [168] (wersja 3.3) przy użyciu profili KEGG KO [169] HMM (ukryty model Markowa) (zaktualizowany 25 grudnia 2019 r.). W celu wykrycia sekwencji *almA* związanych z degradacją długołańcuchowych alkanów z kontigów, profil HMM został zbudowany za pomocą HMMER (wersja 3.3) przy użyciu wyrównania parami ClustalW [170]. Listę docelowych genów wraz z kodowanymi enzymami podano w części eksperymentalnej w **Tabeli 13**. Liczby genów każdego metagenomu zostały znormalizowane przy użyciu

MicrobeCensus [171] (v. 1.1.1) w stosunku do odczytów na kilobazę na ekwiwalent genomu (RPKG, ang. reads per kilobase per genome).



Rysunek 10 Schemat analizy genomowej prowadzącej do identyfikacji genów funkcjonalnych związanych z degradacją węglowodorów.

3.5.7. Wizualizacja danych

Analiza struktury społeczności mikroorganizmów została przeprowadzona z wykorzystaniem platformy MicrobiomeAnalyst [172] oraz środowiska R (v.4.5.1) z zastosowaniem odpowiednich pakietów. Do analizy głównych składowych (PCA) użyto pakietu FactoMineR, a do wizualizacji map cieplnych oraz dendrogramów: pheatmap i gg dendro. Profilowanie taksonomiczne i wykresy słupkowe przedstawiające skład mikrobiomu na różnych poziomach taksonomicznych wykonano za pomocą pakietów phyloseq oraz ggplot2.

Przed analizą PCA oraz hierarchicznym grupowaniem próbek, dane dotyczące względnej liczebności taksonów zostały przekształcone za pomocą logarytmicznej transformacji wyśrodkowanej (centered log-ratio, CLR) w celu zminimalizowania wpływu danych zerowych i skali. Dla oceny różnic w strukturze mikrobiomu między grupami zastosowano permutacyjną analizę wariancji (PERMANOVA), wykorzystującą indeks Braya-Curtisa jako miarę niepodobieństwa (9 999 permutacji). Porównania liczebności i różnorodności mikroorganizmów pomiędzy próbkami przeprowadzono z użyciem sparowanego testu t.

Analiza alfa-różnorodności została przeprowadzona na poziomie rodzaju lub na poziomie unikalnych sekwencji (ASV), przy użyciu indeksu Chao1. Estymuje on rzeczywiste bogactwo taksonomiczne próbki, uwzględniając obecność rzadkich taksonów. Różnice w poziomie alfa-różnorodności pomiędzy grupami eksperymentalnymi oceniono za pomocą testu Welcha (Welch's t-test) lub jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). W przypadkach istotności statystycznej przeprowadzono dodatkowe porównania post-hoc (pairwise comparisons) w celu identyfikacji różnic między poszczególnymi grupami.

3.5.8. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (qPCR)

Do oceny liczby kopii genów bakteryjnych oraz archeonów wykorzystano ilościową reakcję łańcuchową polimerazy (qPCR, ang. quantitative Polymerase Chain Reaction). QPCR przeprowadzono przy użyciu systemu Rotor-Gene® Q real-time PCR (Qiagen, Foster City, CA, USA). Analizę przeprowadzono zgodnie z wcześniejszym opisem Tiirik i in. [173]. Następnie do procesu amplifikacji użyto odpowiedniego startera o stężeniu 0,6 μM oraz 10-krotnych rozcieńczeń próbek DNA. Dokładne parametry reakcji zostały zawarte w **Tabeli 4**.

Tabela 4 Charakterystyka starterów i programów qPCR.

Starter	Sekwencja 5'-3'	Gen docelowy	Rozmiar amplikonu (bp)	Program qPCR	LOQ ¹	Źródło	Wydajność amplifikacji (próbki) ²
A519F	CAGCCG CCGCGG TAA	Archeonowy 16S rRNA	395	50°C 2 min, 95°C 10 min; 35 cykli: 95°C 15 s; 56°C 30 s; 72°C 30 s	1000	[173]	1,95 ± 0,07
A915R	GTGCTC CCCCGC CAATTC CT						
B517F	GCCAGC AGCCGC GGTAA	Bakteryjny 16S rRNA	530	50°C 2 min, 95°C 10 min; 35 cykli: 95°C 30 s; 60°C 45 s; 72°C 45 s	1000	[174]	1,85 ± 0,05
B1028R	CGACAR CCATGC ASCACC T					[175]	

¹ LOQ – granica oznaczalności na reakcję qPCR (ang. limit of quantification);

² Wydajności amplifikacji uzyskane z programu LinRegPCR są przedstawione w zakresie od jednego do dwóch, gdzie jeden odpowiada brakowi amplifikacji (wydajność 0 %), a dwa odpowiada podwojeniu produktu amplifikacji w każdym cyklu (wydajność 100 %).

3.6. Techniki analityczne

3.6.1. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

Analizę NMR wykorzystano w celu identyfikacji produktów biodegradacji benzenu oraz glukozy w ogniwach. W tym celu próbki anolitu pobrano w końcowej fazie cyklu pracy ogniwa. Aby usunąć komórki bakteryjne próbki odwirowano (6 min, 6000 r.p.m.), następnie otrzymany supernatant poddano filtracji przez sterylny filtr strzykawkowy

o średnicy porów 0,22 μm . Tak przygotowane próbki anolitu były przechowywane w temperaturze $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do momentu przeprowadzenia analizy. W celu przygotowania próbek do analizy metodą spektroskopii NMR, 2 ml próbki anolitu przeniesiono do probówek Eppendorf i poddano procesowi odparowania w wirówce próżniowej w temperaturze $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 6 godzin (Eppendorf, Polska). Po odparowaniu, próbkę rozpuszczono w 600 μL buforu PBS (0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 10 % D_2O , $\text{pH} = 7,0$, $\text{TSP} = 0,3\text{ mM}$). Następnie, 550 μL roztworu przeniesiono do 5 mm probówek NMR (5SP, Armar Chemicals, Niemcy) w celu przeprowadzenia pomiarów.

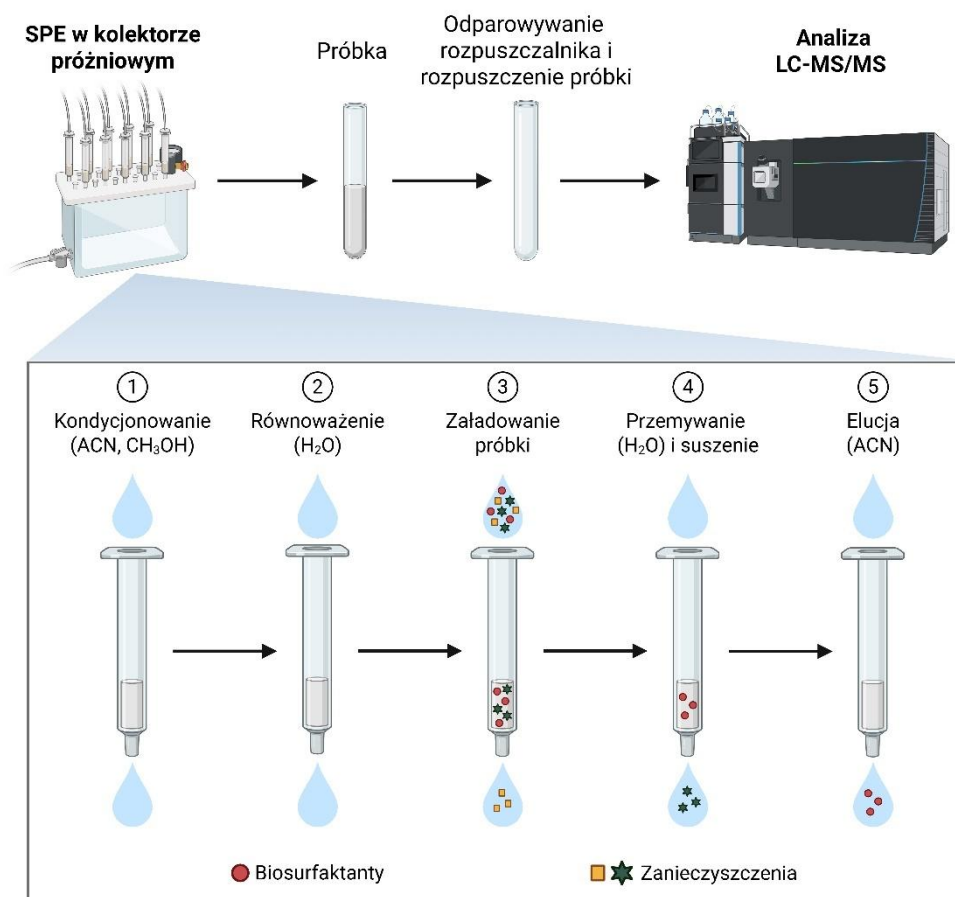
Widma ^1H NMR zarejestrowano na spektrometrze Bruker AVANCE II (600,58 MHz, 298 K) wyposażonym w 5-mm sondę TBO, zgodnie z ustawieniami opisanymi w pracy Mielko i in. [176]. Zastosowano sekwencję impulsów cpmgpr1d. Widma odniesiono do rezonansu TSP (0,0 ppm) i poddano ręcznej korekcji fazy i linii bazowej (MestReNova v. 11.0.3).

3.6.2. Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS/MS)

Analizę LC-MS/MS zastosowano do identyfikacji biosurfaktantów zsyntezowanych w ogniwach. W tym celu, pobrano próbki anolitu z MFC w momencie maksymalnej produkcji mocy, kiedy odnotowano również najniższe napięcie powierzchniowe, wskazujące na produkcję biosurfaktantów. W celu usunięcia komórek, próbki poddano wirowaniu (10 min, 6000 r.p.m.), a następnie supernatant przefiltrowano przez sterylny filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 μm . Ekstrakcję i oczyszczanie biosurfaktantów przeprowadzono metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE, ang. solid phase extraction), wykorzystując kolumny wypełnione złożem C18 (CHROMABOND; 3 ml objętości, 500 mg adsorbentu), zgodnie z procedurą przedstawioną na **Rysunku 11**. Kolumnę SPE kondycjonowano i zrównoważono, przepuszczając kolejno 15 ml acetonitrylu, 3 ml metanolu i 3 ml wody. Następnie, do tak przygotowanej kolumny załadowano 130 ml próbki anolitu. Po załadowaniu próbki, kolumnę przemyto 3 ml wody, a następnie suszono przez 10 minut. Produkt ekstrahowano z kolumny SPE, przepuszczając przez nią 3 ml acetonitrylu. Otrzymany roztwór rozpuszczalnika odparowano w temperaturze $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, uzyskując surowe biosurfaktanty. Wyekstrahowane biosurfaktanty rozpuszczono w 150 μl wodnego 5 mM buforu mrówczanu amonu/acetonitrylu 60/40 (v/v). Próbkę następnie rozcieńczono 100-krotnie i analizowano metodą LC-MS/MS.

Charakterystykę produktów biosyntezy przeprowadzono przy użyciu spektrometru mas Synapt G2 Si Q-TOF MS wyposażonego w źródło jonów typu elektrozpylac (ESI), w połączeniu z systemem chromatograficznym Acquity UPLC I-class = (Waters, USA). Do rozdzielania związków zastosowano chromatografię w fazie odwróconej na kolumnie ACQUITY UPLC® BEH Shield RP18 1,7 μm ($2,1 \times 100\text{ mm}$). Fazy ruchome składały się z 10 mM mrówczanu amonu w 5:95 ACN:woda (A) i 10 mM mrówczanu amonu w 95:5 ACN:woda (B). Natężenie przepływu ustawiono na 0,300 ml/min przy całkowitym czasie pracy wynoszącym 6,5 min. Elucję liniową przeprowadzono w następujący sposób: 1,00 min – 20 % B, 2,50 min – 90 % B, 4,50 min – 90 % B,

4,60 min – 20 % B, 6,50 min – 20 % B. Temperatury próbki i kolumny ustawiono odpowiednio na 10 °C i 45 °C. Objętość nastrzyku ustawiono na 2,00 µL. Akwizycję danych przeprowadzono przy użyciu oprogramowania MassLynx (wersja 4.1, SCN932, Waters, USA). Próbki badano w trybie jonów ujemnych. Parametry źródła jonów MS ustawiono następująco: napięcie kapilary, 2,50 kV; stożek próbkujący, 40 V; temperatura źródła, 130 °C; temperatura desolwatacji, 450 °C; przepływ gazu desolwatacyjnego, 800 L/h i przepływ gazu stożkowego, 60 L/h.



Rysunek 11 Schemat przedstawiający metodę ekstrakcji biosurfaktantów z anolitów pobranych z ogniw metodą SPE do analizy LC-MS/MS. Wyjaśnienia skrótów: ACN – acetonitryl, CH₃OH – metanol, H₂O – woda.

3.6.3. Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS)

Analizę GC-MS zastosowano w celu identyfikacji metabolitów biodegradacji związków hydrofobowych w MFC. Anolit odwirowano w celu pozbycia się biomasy komórkowej (15 min., 6000 r.p.m.), następnie supernatant ekstrahowano dwukrotnie roztworem dichlorometanu (DCM) w proporcji 4:1. Zebrano fazę organiczną i poddano analizie.

Analizę wykonano przy użyciu chromatografu gazowego HP6890 z detektorem masowo-selektywnym HP5973 oraz kolumną kapilarną DB-1701. Jako gaz nośny zastosowano hel. Kolumna pracowała w zakresie temperatur od 40 °C do 260 °C z szybkością

10 °C/min. Program temperaturowy poprzedzony był 4-minutowym okresem izotermicznym, a na koniec przeprowadzono stabilizację w temperaturze końcowej przez 20 minut. Temperatura wlotu została ustawiona na 250 °C. Spektrometr masowy pracował przy napięciu jonizującym 70 eV, w zakresie mas m/z 29 – 450. Identyfikację związków organicznych przeprowadzono poprzez porównanie uzyskanych widm masowych z biblioteką elektroniczną NIST oraz innymi źródłami referencyjnymi [177].

3.7. Pomiary fizykochemiczne

3.7.1. Chemiczne zapotrzebowanie na tlen (ChZT) i wydajność kulombowska (CE)

Próbki anolitu do określenia stopnia usunięcia ChZT pobrano z MFC pod koniec trwania cyklu. Próbki odwirowano (6 min. 6000 r.p.m.), a powstały supernatant użyto do analizy chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT) metodą utleniania dwuchromianem potasu, z wykorzystaniem gotowego zestawu ChZT (HACH, USA). Zdolność usuwania ChZT przedstawiono jako wartość procentową różnicy wartości ChZT na początku oraz na końcu pojedynczego cyklu MFC.

Wydajność kulombowską (CE) ogniwa określono na podstawie poniższego wzoru:

$$C_E = \frac{8 \int_0^{t_b} I dt}{F v_{An} \Delta COD}$$

Gdzie 8 jest wartością stałą używaną dla ChZT, F to stała Faradaya, V_{An} jest objętością anolitu w komorze anodowej, ΔCOD jest zmianą stężenia ChZT podczas cyklu pracy MFC.

3.7.2. Pomiary tlenu oraz pH

Pomiary stężenia tlenu wykonywano stosując galwaniczny czujnik tlenu ELMETRON COG-1 (ELMETRON, Polska), który skalibrowano w roztworze Na_2SO_3 (0 % nasycenia tlenem) oraz w powietrzu (100 % nasycenia). Pomiar pH przeprowadzono za pomocą elektrody IONODE IJ44A.

3.8. Ocena aktywności biosurfaktantów

3.8.1. Pomiar napięcia powierzchniowego

Pomiary napięcia powierzchniowego anolitów (ST, ang. surface tension) wykonywano, aby ocenić czy w komorze anodowej wytwarzane były związki powierzchniowo czynne. Pomiary wykonywano za pomocą mobilnego tensjometru ciśnienia pęcherzyka (KRUSS, Niemcy). Urządzenie było kalibrowane każdorazowo przed serią pomiarową. W zależności od eksperymentu, pomiar wykonywano bezpośrednio w ogniwie lub poprzez transfer próbki anolitu do próbówki typu Eppendorf.

3.8.2. Testy emulsyfikacji

Aby określić indeks emulsyfikacji (E_{24}), w probówce umieszczono 3 mL hydrofobowej substancji (ropa naftowa, olej napędowy, kwas oleinowy, olej roślinny lub heksadekan) oraz 3 mL supernatantu uzyskanego po odwirowaniu (10 min., 6000 r.p.m.) anolitu. Całość intensywnie wytrząsano przez 2 minuty, następnie pozostawiono w statywie na 24 h. Indeks E_{24} obliczono jako procent stosunku wysokości warstwy zemulgowanej do całkowitej wysokości kolumny cieczy [8].

3.8.3. Stabilność piany

Stabilność piany mierzono poprzez energiczne wytrząsanie supernatantu w probówce oraz pomiary wysokości piany bezpośrednio po wytrząsaniu oraz po 10 minutach. Wskaźniki obliczano według następujących równań:

$$\text{Stabilność piany} = \frac{h_{10}}{h_0}$$

gdzie h_0 to początkowa wysokość piany, h_{10} to wysokość piany po 10 minutach [178].

3.8.4. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Chromatografię cienkowarstwową (TLC, ang. thin layer chromatography) zastosowano w celu oceny obecności różnych klas biosurfaktantów (glikolipidów, lipopeptydów oraz lipidów). Obecność biosurfaktantów badano w produktach ekstrakcji anolitów metodą SPE, rozcieńczonych w czystym metanolu do analizy TLC. W tym celu użyto płytek TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Niemcy). Do wykrywania cukrów (heksoz i pentoz) zastosowano metodę orcynową [179]. Do wizualizacji peptydów i wolnych aminokwasów użyto testu ninhydrynowego [180], a do identyfikacji lipidów użyto barwienia jodem [181].

3.9. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

Zdjęcia SEM wykonano w celu wizualizacji biofilmu anodowego, który wykształcił się na powierzchni wybranych elektrod. W celu utrwalenia biofilmu anodowego, po zakończeniu eksperymentu, z elektrody wycięto fragment welonu węglowego (1 cm x 1cm), który następnie zanurzono w 2,5 % roztworze aldehydu glutarowego (Sigma Aldrich) w 0,1 M roztworu PBS (pH 7,3) przez 12h w 4 °C. Następnie fragment elektrody przemyto trzykrotnie 0,1 M roztworem PBS. W celu odwodnienia próbek, zanurzono je każdorazowo w roztworach etanolu o stężeniach: 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % i 100 %. Odwodnienie w 100 % roztworze etanolu powtórzono jeszcze dwukrotnie. Następnie próbkę zanurzono w czystym HMDS (heksametylodisilazan) (Sigma Aldrich) i suszono na powietrzu przez 10 minut. Tak przygotowane próbki analizowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego Helios NanoLabTM 600i [182].

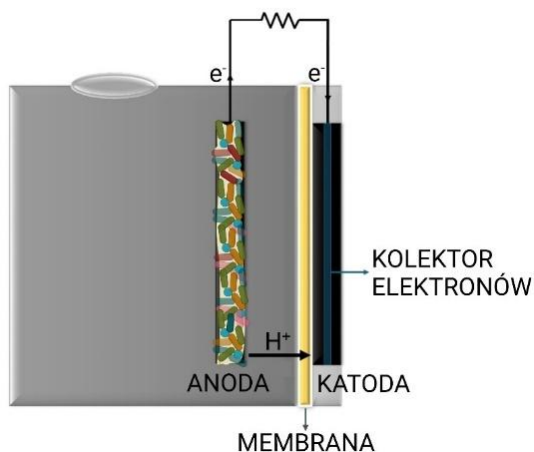
4. WYNIKI I DYSKUSJA

4.1. Biodegradacja benzenu w MFC

Eksperyment został przeprowadzony w ramach prac badawczych realizowanych w Laboratorium Mikrobiologicznych Układów Elektrochemicznych (LMES) oraz podczas stażu naukowego w Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej na Uniwersytecie w Tartu (Estonia). Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracy Tyszkiewicz i in. [26].

4.1.1. Inokulacja MFC oraz przebieg eksperymentu

Skonstruowano 10 jednokomorowych MFC z katodą powietrzną (**Rysunek 12**) według specyfikacji przedstawionych w rozdziale 3.1 niniejszej rozprawy. Powierzchnia geometryczna anody wynosiła 9 cm². Ogniwa pracowały w systemie wsadowym z częstością wymiany medium co trzy dni. MFC działały w stałej temperaturze pokojowej 25 °C i były monitorowane przez 160 dni. Ogniwa podzielono na dwie serie: A i B, zasilane różnymi substratami.



Rysunek 12 Schemat konstrukcji jednokomorowego MFC zastosowanego w eksperymencie.

Jako źródło węgla początkowo zastosowano dla serii A – 13,7 mM glicerolu, dla serii B – 10,7 mM benzenu. Ze względu na niskie wartości gęstości mocy, po 18 dniach działania, substraty zostały zastąpione glukozą (6,7 mM, 1,2 g/L) w serii A i benzenem wraz z glukozą (benzen: 10,5 mM, 0,6 g/L oraz glukoza: 6,7 mM, 1,2 g/L) w serii B. Do zaszczipienia ogniw początkowo użyto pięciu różnych szczepów bakterii wyizolowanych z gleb zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi, których przynależność taksonomiczną określono jako: szczep *Ochrobactrum anthropi* 1 (MFC 1), *Rhodococcus qingshengii* (MFC 2), *Epilithonimonas hominis* (MFC 3), *Novosphingobium suppressis* (MFC 4) oraz *Ochrobactrum anthropi* 2 (MFC 5). Inokulaty zawieszono w podłożu mineralnym (MSM), którego skład podano rozdziale 3.2. niniejszej pracy. Po 40 dniach działania MFC uzupełniono 10 µl osadu czynnego (0,05 % v/v). Osad czynny, będący zawiesiną mikroorganizmów stosowaną

w biologicznym oczyszczaniu ścieków, pochodził z lokalnej oczyszczalni ścieków w Ścinawce Dolnej (Polska). Dodanie minimalnej ilości osadu czynnego miało na celu wzbogacenie konsorcjum o minimalnej złożoności, zdolnego do biodegradacji benzenu i generacji prądu.

4.1.2. Wydajność MFC

Analiza wydajności energetycznej MFC w czasie rzeczywistym

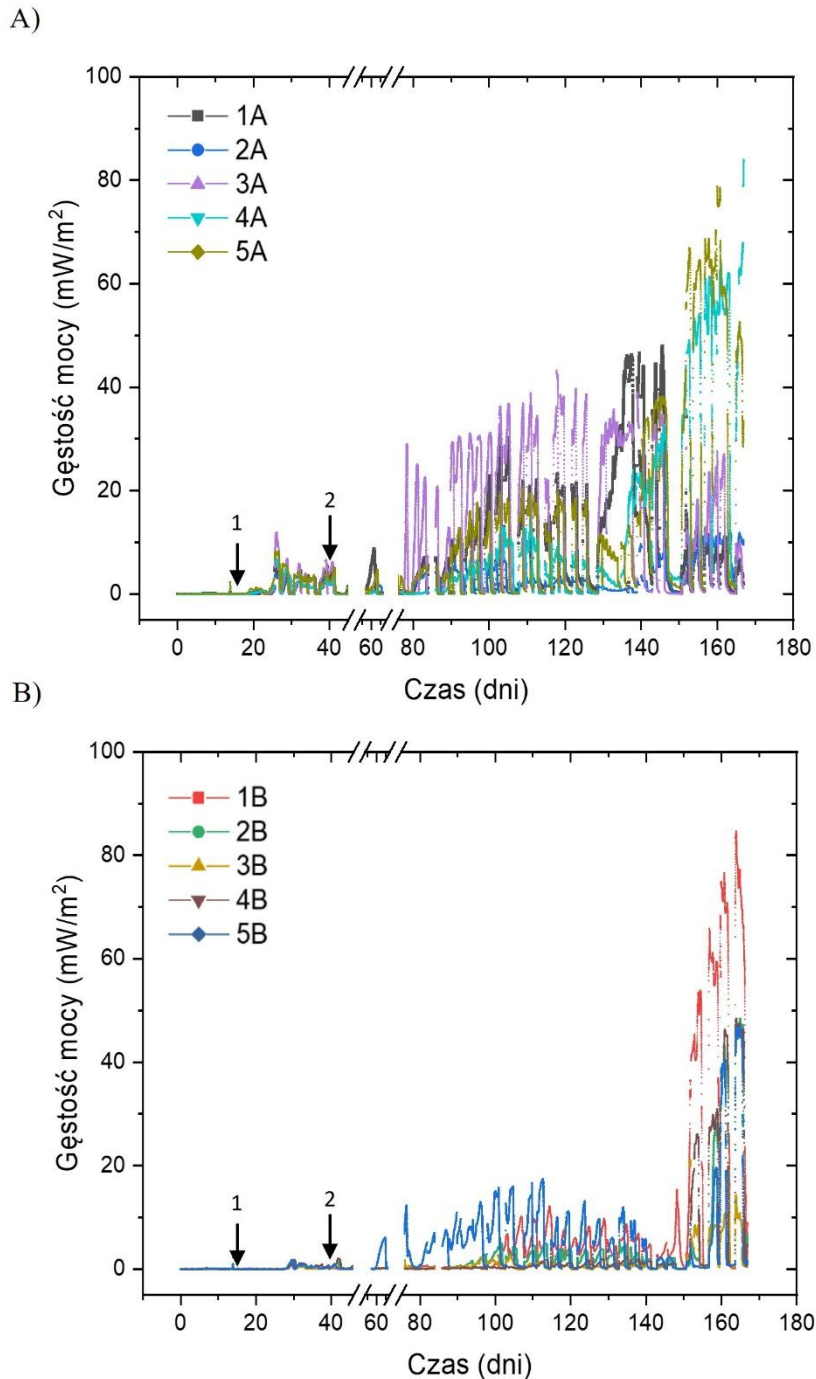
Zarejestrowane napięcie w mikrobiologicznych ogniwach paliwowych przeliczono zgodnie z prawem Ohma na gęstość mocy. Pozwoliło to na porównanie wyników z danymi dostępnymi w literaturze. Gęstość mocy była monitorowana w czasie rzeczywistym przez ponad 160 dni.

W początkowym etapie okresu eksperymentalnego, gdy jako źródła węgla zastosowano glicerol (seria A) oraz benzen (seria B), uzyskane wartości były bardzo niskie – poniżej 5 mW/m^2 . Po zmianie substratów w 18. dniu prowadzenia eksperymentu (na glukozę w serii A oraz mieszaninę glukozy i benzenu w serii B), zaobserwowano wzrost generowanej mocy. Maksymalne wartości wynosiły jednak jedynie 12 mW/m^2 dla serii A i 2 mW/m^2 dla serii B. Wyniki te sugerują ograniczoną zdolność pojedynczych szczepów do przekazywania elektronów na anodę. Dodatkowo wskazują na toksyczne działanie benzenu, który hamuje metabolizm mikroorganizmów i może obniżać ich liczebność.

W 40. dniu eksperymentu wprowadzono do układów złożoną społeczność mikroorganizmów w postaci osadu czynnego, mający na celu zwiększenie efektywności biodegradacji benzenu. Analiza zmian gęstości mocy w czasie (**Rysunek 13A, B**) wykazała wyraźny wzrost wartości tego parametru od około 60. dnia działania MFC. Porównanie przebiegu adaptacji poszczególnych MFC wskazało, że obecność benzenu wydłużała czas potrzebny mikroorganizmom na osiągnięcie pełnej aktywności elektrochemicznej. Najszybszą odpowiedź odnotowano w MFC 3A, zaszczepionym początkowo szczepem *Epilithonimonas hominis*, gdzie po około 40 dniach od wprowadzenia osadu, gęstość mocy wzrosła o 30 mW/m^2 . W przeciwieństwie do tego, MFC 3B, zasilany mieszaniną benzenu i glukozy, wykazał istotny wzrost wydajności dopiero po około 150 dniach. Tak długi czas adaptacji wskazuje na stopniowe przystosowywanie się społeczności mikroorganizmów do obecności toksycznego związku.

Odmienną charakterystykę wykazało MFC 1A, inokulowane szczepem *Ochrobactrum anthropi* (wariant 1). W tym układzie od początku obserwowano stabilny przyrost mocy, który po 140 dniach osiągnął wartość 40 mW/m^2 . Jeszcze lepsze rezultaty uzyskano w wariacie MFC 1B, gdzie zastosowano identyczne inokulum, ale w obecności benzenu. Gęstość mocy sięgnęła tam 85 mW/m^2 , co stanowiło najwyższy wynik spośród wszystkich testowanych ogniw i porównywalny z rezultatami osiąganymi w warunkach bez udziału benzenu (seria A).

W przypadku MFC 5A i 5B, również inokulowanych szczepem *Ochrobactrum anthropi* (wariant 2), przebieg generacji mocy był podobny w obu układach przez większość eksperymentu. Jednak po 140 dniach wyższe wartości odnotowano w układzie bez benzenu - odpowiednio 65 mW/m² dla MFC 5A i 45 mW/m² dla MFC 5B.



Rysunek 13 Wykresy zmian gęstości mocy generowanej przez ogniwa MFC w funkcji czasu: A) seria zasilana glukozą, B) seria zasilana benzenem oraz glukozą. Wyjaśnienie oznaczeń: 1 – zmiana substratów na glukozę oraz benzen i glukozę; 2 – wzbogacenie komór anodowych osadem czynnym.

W odniesieniu MFC 2A i 2B, których początkowe inokulum stanowił szczep *Rhodococcus qingshengii*, do dnia 150. obserwowano zbliżony poziom generowanej mocy. W późniejszym etapie MFC 2B, zasilane benzenem, wykazało wyraźnie wyższą gęstość mocy (45 mW/m^2) w porównaniu z MFC 2A bez dodatku benzenu, które osiągnęło jedynie 15 mW/m^2 . Wyniki te potwierdzają złożony wpływ rodzaju substratu na szybkość adaptacji oraz ostateczną wydajność mikrobiologicznych ogniw paliwowych.

Można założyć, że wydłużony czas potrzebny do osiągnięcia pełnej funkcjonalności układów MFC był związany z zastosowaniem czystych kultur drobnoustrojów jako inokulum. Tego rodzaju biofilmy, rozwijające się na anodzie, potrzebują więcej czasu na osiągnięcie stabilnej struktury mikrobiologicznej. Dojrzały biofilm anodowy wykazuje dużą stabilność oraz odporność na kolonizację przez obce szczepy bakteryjne [183]. Z tego względu utworzenie nowego, złożonego konsorcjum wymagało dłuższego okresu wzbogacania. Wpłynęło to na opóźnione osiągnięcie maksymalnej wydajności elektrochemicznej, co nastąpiło dopiero po około 140 dniach pracy układów.

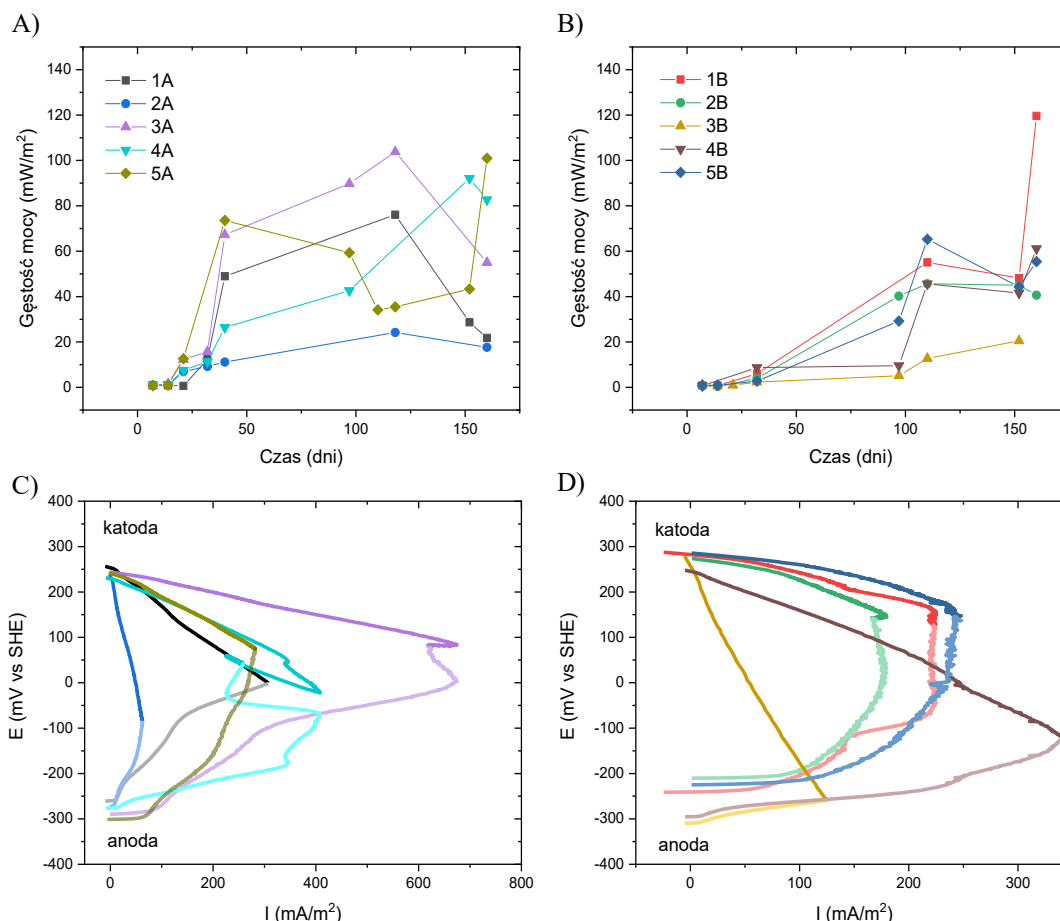
Analiza eksperymentów voltamperometrii liniowej (LSV)

Analiza wyników uzyskanych w eksperymentach LSV wykazała, że napięcie obwodu otwartego (OCV, ang. open circuit voltage) w MFC zasilanych glukozą mieściło się w zakresie od 0,49 V do 0,59 V. Najwyższą wartość odnotowano w przypadku MFC 3A, który jednocześnie osiągnął największą gęstość mocy spośród wszystkich badanych ogniw. W MFC zasilanych mieszaniną glukozy i benzenu napięcie OCV było nieco niższe i mieściło się w zakresie od 0,51 V do 0,54 V. Najwyższą wartość w tej grupie zarejestrowano dla MFC 2B.

Wykresy gęstości mocy uzyskane z testów polaryzacyjnych (**Rysunek 14A, B**) pokazują, że ogniwa zasilane wyłącznie glukozą osiągały wyższe wartości mocy oraz wykazywały większą stabilność w czasie. Z kolei w układach, w których obecny był benzen, obserwowano systematyczny wzrost wydajności energetycznej w miarę postępu eksperymentu. Pod koniec okresu badawczego gęstość mocy w tych MFC osiągnęła poziomy porównywalne do układów z grupy glukozowej. Najwyższą wartość gęstości mocy w grupie z benzenem odnotowano dla MFC 1B i wynosiła ona 120 mW/m^2 ($108 \mu\text{W}$). Najniższy wynik w tej serii uzyskano w MFC 3B – 21 mW/m^2 ($18 \mu\text{W}$). Dla porównania, w grupie zasilanej glukozą najwyższą wartość osiągnęło MFC 3A – 104 mW/m^2 ($93 \mu\text{W}$), a najniższą MFC 2A – 24 mW/m^2 ($22 \mu\text{W}$). Wyniki te potwierdzają, że obecność benzenu początkowo ograniczała wydajność, lecz w dłuższej perspektywie nie wykluczała osiągnięcia wysokiej generacji mocy.

Wydajność elektrochemiczna poszczególnych elektrod została zbadana pod koniec okresu eksperymentalnego. Uzyskane krzywe polaryzacji dla serii A i B wykazały istotne różnice, co sugeruje, że w obu przypadkach wydajność ogniw była ograniczana przez odmienne czynniki. Kształt krzywych polaryzacji można ogólnie podzielić na trzy

fragmenty odpowiadające różnym stratom napięcia: początkowy spadek napięcia spowodowany nadnapięciami reakcji elektrodowych (straty aktywacyjne), następnie stosunkowo liniowy spadek napięcia, w którym dominują straty omowe (związane m.in. z budową MFC, właściwościami elektrolitu i biofilmu), oraz zwykle gwałtowny spadek napięcia przy wyższych prądach, za który odpowiadają straty koncentracyjne (efekty transportu masy) [59].



Rysunek 14 Maksymalne wartości gęstości mocy uzyskane w testach LSV (A, B). Krzywe polaryzacji anod i katod ogniw MFC (C, D) w warunkach maksymalnej wydajności: 1A, 2A, 3A, 5A, 2B i 5B – dzień 120; 4A, 1B, 3B i 4B – dzień 150. Linie odpowiadające potencjałom anodowym oznaczono kolorami o niższym nasyceniu. Wyjaśnienie skrótu: SHE – standardowa elektroda wodorowa.

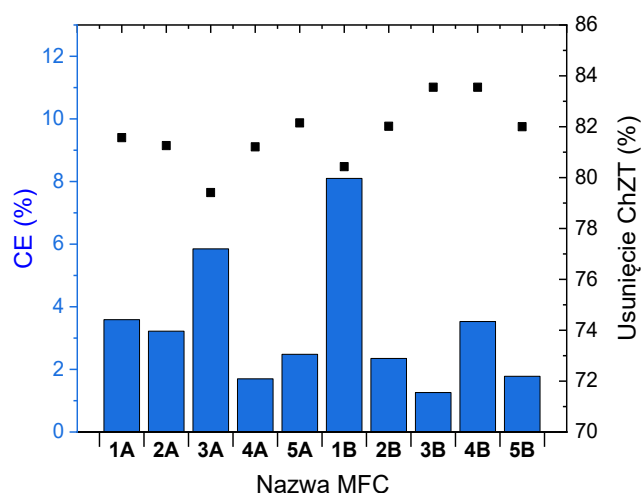
W serii A, zasilanej glukozą (**Rysunek 14C**), w układach 1A i 2A zaobserwowano wyraźne straty omowe, którym towarzyszył znaczny nadpotencjał anodowy. Z kolei w MFC 3A, 4A i 5A dominującym ograniczeniem były straty koncentracyjne na anodzie, wynikające z nieefektywnego transportu masy. W przypadku MFC 3A i 4A odnotowano zjawisko przeregulowania (overshoot phenomenon) na anodzie, czyli gwałtowny spadek napięcia wynikający z ograniczeń transportu elektronów w biofilmie, co mogło być skutkiem jego nadmiernej grubości. Taka struktura ogranicza dyfuzję substratów do głębszych warstw biofilmu, znajdujących się w bezpośrednim kontakcie z powierzchnią anody. W konsekwencji, przy wyższych natężeniach prądu, mikroorganizmy nie są w stanie sprostać rosnącemu zapotrzebowaniu na elektrony [184], [185]. Możliwe jest również, że na wczesnym etapie eksperymentu doszło

do zanieczyszczenia powierzchni elektrod przez nieaktywne komórki mikroorganizmów, co ograniczyło ich aktywną powierzchnię [113]. Zjawisko przeregulowania zaobserwowano także po stronie katody w MFC 3A oraz 4A. W przypadku katody zjawisko to mogło wynikać z ograniczonego dostępu tlenu do centrów aktywnych, spowodowanego procesami elektroosmozy i migracji soli nieorganicznych z anody. Prowadzi to do wytrącania się osadów solnych na powierzchni katody oraz niekontrolowanego wzrostu biofilmu katodowego, co fizycznie blokuje dyfuzję tlenu [133]. Jednocześnie niska aktywność anody mogła w istotny sposób wpływać na wydajność katody, potęgując obserwowane zaburzenia w pracy całego ogniwa.

Analiza krzywych polaryzacji dla układów z dodatkiem benzenu (**Rysunek 14D**) wykazała, że MFC 1B, 2B oraz 5B były ograniczane przez straty omowe oraz koncentracyjne (problemy z transportem masy na anodzie). Tego typu zachowanie można tłumaczyć niską biodostępnością benzenu oraz złożonością jego struktury chemicznej, co utrudnia jego efektywną degradację w warunkach beztlenowych [178]. W przypadku MFC 3B i 4B straty występowały we wszystkich obszarach krzywych katodowych, co sugeruje poważne ograniczenia również po stronie elektrody katodowej. Oprócz potencjalnego gromadzenia się osadów nieorganicznych, możliwe jest także występowanie zjawiska tzw. biofoulingu, czyli tworzenie się warstwy biologicznej na powierzchni katody. Mogło to negatywnie wpływać na aktywność katody oraz długoterminową stabilność układu [155].

Usuwanie ChZT oraz efektywność kulombowska

Wydajność kulombowska określa, jaka część elektronów powstających w wyniku przemian mikrobiologicznych jest efektywnie przekazywana na elektrodę w postaci prądu elektrycznego. W przeprowadzonym eksperymencie wartości CE (**Rysunek 15**) wahały się od 1 do 8 %, co sugeruje, że reakcje elektrochemiczne odpowiadały jedynie za niewielki udział w całkowitym usuwaniu ChZT. Jednak wartości CE były wyższe, gdy benzen i glukoza były używane razem jako źródła węgla w MFC. Najwyższe zaobserwowane wartości CE wynosiły 8,4 % w porównaniu do 5,9 %, gdy glukoza była stosowana jako pojedynczy substrat. Wyższe wartości CE uzyskano w MFC, w których jednocześnie stosowano benzen i glukozę jako źródła węgla. Najwyższy poziom wyniósł 8,4 %, w porównaniu do 5,9 % w układach zasilanych wyłącznie glukozą. Różnica ta może wynikać z odmiennego składu mikroflory odpowiadającej za degradację obu substratów. Połączenie benzenu i glukozy mogło stymulować aktywność różnych grup mikroorganizmów, co sprzyjało większemu uwalnianiu elektronów do anody. Taki efekt można tłumaczyć obecnością zróżnicowanych szlaków metabolicznych, reprezentowanych przez bardziej złożone konsorcja mikrobiologiczne. Mogło to wynikać z różnych strumieni metabolicznych reprezentowanych przez różne konsorcja drobnoustrojów, w szczególności obecności szlaków fermentacyjnych, które konkurują z oddychaniem anodowym [186].



Rysunek 15 Wartości efektywności kulombowskiej (CE) oraz stopnia usunięcia ChZT zmierzone po trzech miesiącach trwania eksperymentu.

Dane pochodzące z innych, porównywalnych badań wskazują, że wydajność kulombowska osiągnięta w niniejszym eksperymencie – 8,4 % przy zastosowaniu benzenu jako substratu – należy do najwyższych dotychczas udokumentowanych w literaturze naukowej. Dla porównania, w eksperymencie przeprowadzonym przez Adelaję i in. [187], gdzie do degradacji benzenu zastosowano beztlenowy przefermentowany osad ściekowy z dodatkiem glukozy jako kosubstratu, wartość CE wyniosła jedynie 1,04 %. W innym podejściu, wykorzystującym kokulturę *Shewanella oneidensis* oraz *Pseudomonas aeruginosa*, uzyskano jeszcze niższą wydajność – zaledwie 0,36 %. Luo i in. [188] zastosowali fenol jako główne źródło węgla, osiągając CE na poziomie 1,5 %. Dodatek glukozy w tym samym układzie poprawił wydajność do 2,7 %, co podkreśla znaczenie stosowania strategii kosubstratu w stymulowaniu egzoelektrogenności. Z kolei Adelaja i in. [189] odnotowali wartość CE równą 0,4 % w przypadku układów rozkładających fenantren w obecności glukozy. W analizowanym przypadku zaobserwowana wydajność kulombowska należała do najwyższych spośród wartości dotychczas opublikowanych dla biodegradacji benzenu w mikrobiologicznych ogniach paliwowych.

Zasadniczo glukoza, jako substrat preferencyjnie metabolizowany w drodze fermentacji, prowadzi do niższych wartości CE niż prostsze związki o mniejszej masie cząsteczkowej, takie jak octan. Substrat ten może być metabolizowany nie tylko przez egzoelektrogeny, ale również przez mikroorganizmy nieegzoelektrogenne, w tym fermentacyjne oraz metanogenne [190]. Mimo tych ograniczeń, glukoza pozostaje jednym z najczęściej stosowanych kosubstratów w badaniach nad biodegradacją związków organicznych [191]. W niniejszym eksperymencie jej obecność wyraźnie poprawiła wydajność kulombowską, co świadczy o skuteczności strategii kosubstratu w warunkach bioelektrochemicznych.

Pomimo uzyskania stosunkowo niskiej wydajności kulombowskiej, wysoki poziom usuwania ChZT, sięgający 80-90 %, wskazuje, że degradacja glukozy i benzenu zachodziła głównie na drodze metabolicznej niesprężonej z zewnątrzkomórkowym transferem elektronów na anodę. Oznacza to, że znaczna część ładunku zawartego w substratach nie została przekształcona w energię elektryczną, lecz została rozproszona w alternatywnych procesach, takich jak fermentacja lub oddychanie z wykorzystaniem innych akceptorów. Podobnie jak w przypadku uzyskanych wartości CE oraz maksymalnych gęstości mocy, także wyniki dotyczące redukcji ChZT należały do najwyższych spośród dotychczas raportowanych. W innych pracach parametr ten mieścił się zazwyczaj w przedziale od 26,3 % do 87,3 %.

Zestawienie z wynikami wcześniejszych prac potwierdza, że zastosowany układ MFC wykazywał większą efektywność przekazu elektronów, przy jednoczesnej skutecznej biodegradacji chemicznie trwałych i toksycznych związków aromatycznych, takich jak benzen.

4.1.3. Analiza metabolitów metodą NMR

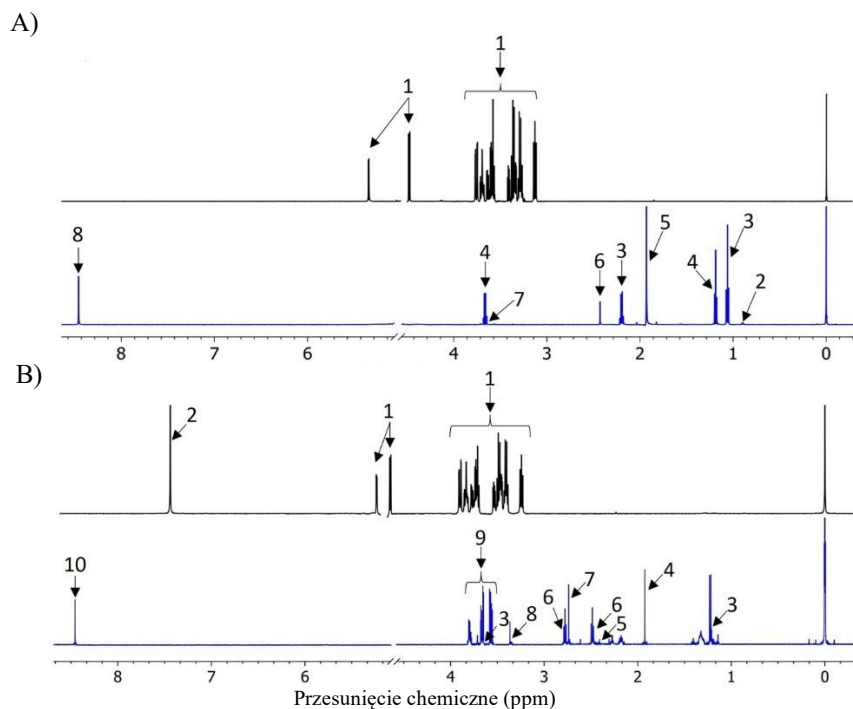
Analiza profilu metabolitów w anodzie w grupie A (zasilanej glukozą) wykazała obecność siedmiu różnych egzometabolitów (**Rysunek 16A**), natomiast w grupie B (zasilanej mieszaniną glukozy i benzenu) zidentyfikowano osiem egzometabolitów (**Rysunek 16B**). W obu przypadkach pięć metabolitów występowało wspólnie: etanol, octan, bursztynian, glicerol oraz mrówczan (**Tabela 5**). Obecność tych związków świadczy o aktywności szlaków fermentacyjnych, w tym acetogenezy, typowej dla środowisk beztlenowych.

Zidentyfikowane metabolity mogą pochodzić zarówno z fermentacyjnego rozkładu glukozy, jak i z mikroaerofilnej degradacji benzenu [192]. Stężenie tlenu w komorach anodowych utrzymywało się na niskim poziomie, około 0,2 % (v/v), co potwierdza, że w układzie panowały warunki mikroaerofilne i beztlenowe, umożliwiające zróżnicowaną biotransformację benzenu. Obecność resztkowego tlenu we wczesnej fazie cyklu wsadowego mogła umożliwić inicjację degradacji benzenu na drodze tlenowej. Po jego całkowitym zużyciu, proces ten prawdopodobnie przechodził na drogę beztlenową, sprzyjając dalszemu rozkładowi benzenu do prostszych związków.

Wśród zidentyfikowanych metabolitów szczególną uwagę zwracają kwasy karboksylowe, takie jak octan, mrówczan i propionian. Związki te są dobrze znane jako końcowe produkty zarówno tlenowych, jak i beztlenowych szlaków degradacji benzenu [193]. Ich obecność może również świadczyć o aktywności mikroorganizmów metanogennych, co potwierdziła analiza składu mikroflory oparta na sekwencjonowaniu genu 16S rRNA. Nie wykryto natomiast charakterystycznych metabolitów pośrednich, takich jak katechol czy benzoesan. Związki te są typowe dla klasycznych szlaków degradacji w warunkach tlenowych i beztlenowych. Ich brak może wynikać z momentu pobrania próbek, który przypadł na końcową fazę cyklu wsadowego, kiedy dominują

już produkty końcowe przemian metabolicznych.

W środowiskach metanogennych degradacja węglowodorów aromatycznych nie zachodzi na drodze aktywności pojedynczych gatunków, lecz w wyniku złożonych interakcji syntroficznych pomiędzy bakteriami fermentacyjnymi a archeonami metanogennymi. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, bakterie te rozkładają związki aromatyczne do metabolitów pośrednich, takich jak octan i propionian, które następnie są wykorzystywane przez archeony jako substraty do produkcji metanu [194].



Rysunek 16 Porównanie widm 1D ^1H NMR (sekwencja *cpmgpr1d*): A) pożywka MSM z glukozą (górne widmo) oraz reprezentatywna próbka z MFC 1A (dolne widmo); oznaczenia: 1 - glukoza, 2 - maślan, 3 - propionian, 4 - etanol, 5 - octan, 6 - bursztynian, 7 - glicerol, 8 - mrówczan; B) pożywka z benzenem i glukozą (górne widmo) oraz reprezentatywna próbka z MFC 4B (dolne widmo); oznaczenia: 1 - glukoza, 2 - benzen, 3 - etanol, 4 - octan, 5 - bursztynian, 6 - 5-aminolewulinian, 7 - dimetyloamina, 8 - metanol, 9 - glicerol, 10 - mrówczan.

Tabela 5 Przypisanie sygnałów ^1H NMR dla metabolitów zewnątrzkomórkowych zidentyfikowanych w anolitech pobranych z układów MFC.

L.p.	Metabolity	Numer KEGG	Przesunięcie chemiczne sygnałów reprezentatywnych [ppm]	
			Seria A	Seria B
1	Etanol	C00469	3,65 (m)	1,20 (t)
2	Octan	C00033	1,91 (s)	1,91 (s)
3	5-aminolewulinian	C00430	-	2,47 (m)
4	Bursztynian	C00042	2,39 (s)	2,39 (s)
5	Dimetyloamina	C00534	-	2,72 (s)
6	Metanol	C00132	-	3,35 (s)
7	Glicerol	C00116	3,55(dd)	3,65(dd)
8	Mrówczan	C00058	8,44 (s)	8,44 (s)
9	Maślan	C00246	1,54 (m)	-
10	Propionian	C00163	1,04 (t)	-

W warunkach tlenowych szlak biodegradacji benzenu rozpoczyna się od jego hydroksylacji do cis-benzeno-1,2-dihydrodiolu, który następnie ulega przekształceniu w katechol. Kolejnym etapem jest rozszczepienie pierścienia aromatycznego na drodze szlaku orto- lub meta-, prowadzące do powstania związków alifatycznych, takich jak pirogronian. Związek ten może być dalej metabolizowany do mrówczanu, octanu lub etanolu [195], co zostało potwierdzone również w wyniku niniejszej analizy.

W warunkach beztlenowych, zwłaszcza przy obecności siarczanów jako końcowych akceptorów elektronów, octan może stanowić końcowy produkt degradacji benzenu. Tego rodzaju procesy mogą zachodzić także w warunkach produkcji prądu elektrycznego w MFC. Alternatywna droga beztlenowego rozkładu obejmuje szereg reakcji transformacyjnych, takich jak metylacja, hydroksylacja i karboksylacja, prowadzących do powstania benzoilo-CoA – kluczowego pośredniego metabolitu. Związek ten może następnie ulegać redukcji z udziałem enzymów takich jak reduktazy benzoilo-CoA [194].

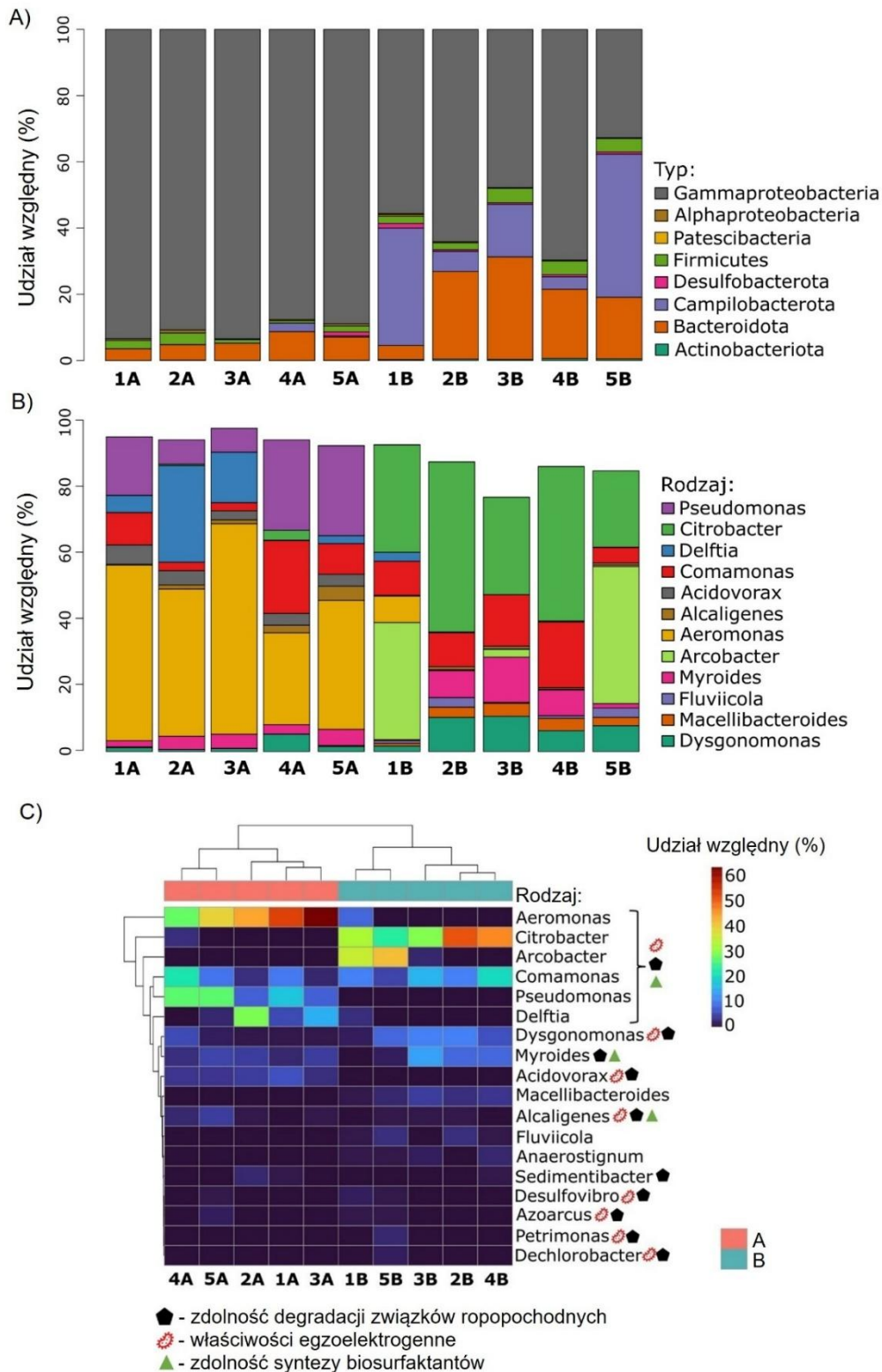
Stosunkowo niskie wartości wydajności kulombowskiej zaobserwowane w eksperymencie mogą być spowodowane konkurencją o źródło węgla pomiędzy egzoelektrogenami, a innymi grupami drobnoustrojów, w szczególności metanogenami. Bakterie te są zdolne do przekształcania benzenu w metan, co potwierdzono we wcześniejszych pracach [196]. To ogranicza efektywny przepływ elektronów do elektrody anodowej.

4.1.4. Analiza struktury i aktywności społeczności mikroorganizmów

Analizę społeczności mikroorganizmów przeprowadzono na podstawie sekwencjonowania regionu V3-V4 genu 16S rRNA. Uzyskane wyniki ujawniły wyraźne różnice w składzie taksonomicznym pomiędzy badanymi układami. Zaobserwowano, że skład mikrobiomów wyraźnie zależał od zastosowanego substratu, co sugeruje, że rodzaj źródła węgla istotnie wpływa na strukturę społeczności bakteryjnej. W porównaniu do układów zasilanych benzenem, mikrobiomy rozwijające się w obecności glukozy charakteryzowały się wyższym udziałem bakterii z typu *Proteobacteria*, w szczególności klasy *Gammaproteobacteria*. Z kolei w MFC zasilanych benzenem dominowały taksony należące do typów *Campylobacterota*, *Bacteriota* oraz *Actinobacteriota* (**Rysunek 17A**). Dodatkowo, w ogniwach 3B, 4B i 5B odnotowano zwiększoną liczebność bakterii z typu *Firmicutes*.

Na poziomie rodzaju (**Rysunek 17B**) społeczności mikroorganizmów w grupie A zdominowane były głównie przez *Aeromonas*, a w dalszej kolejności przez *Pseudomonas* oraz *Acidovorax*. **Rysunek 17C** prezentuje zestawienie rodzajów kluczowych z punktu widzenia aktywności egzoelektrogennej, zdolności do degradacji węglowodorów oraz produkcji biosurfaktantów. Rodzaj *Aeromonas* obejmuje Gram-ujemne fakultatywnie beztlenowe bakterie, spośród których niektóre szczepy, jak *Aeromonas hydrophila* wykazują aktywność egzoelektrogenną. Bakterie te posiadają zdolność redukcji azotanów i siarczanów przy wykorzystaniu różnych donorów elektronów, takich jak glukoza, glicerol czy pirogronian [190]. W ogniwach MFC 1A, 2A oraz 3A istotną rolę

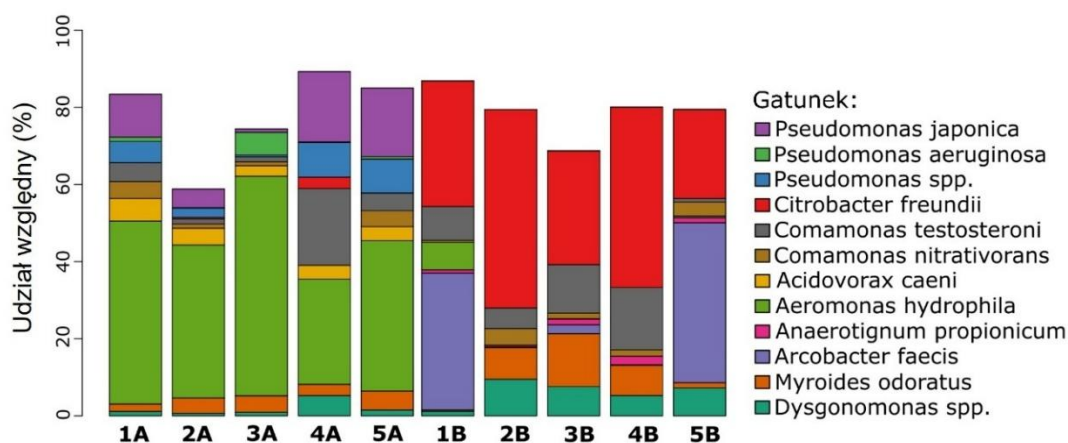
odgrywał również rodzaj *Delftia*, który znany jest ze swojej aktywności elektrochemicznej oraz zdolności adaptacyjnych w warunkach beztlenowych [197].



Rysunek 17 Analiza struktury społeczności mikroorganizmów w społecznościach anodowych degradujących glukozę (grupa A) oraz benzen i glukozę (grupa B): A) względny udział procentowy poszczególnych typów bakterii; B) względny udział procentowy poszczególnych rodzajów bakterii; C) mapa cieplna prezentująca najliczniej występujące rodzaje bakterii w badanych próbkach.

Spółeczności mikrobiologiczne rozwijające się w obecności benzenu były bardziej zróżnicowane pod względem taksonomicznym. W tych układach współdominowały takie rodzaje jak *Citrobacter*, *Arcobacter*, *Dysgonomonas*, *Myroides* oraz *Macellibacteroides*, co wskazuje na tworzenie się syntroficznych konsorcjów zdolnych do biodegradacji związków aromatycznych w warunkach ograniczonego dostępu do tlenu.

Na poziomie gatunkowym (**Rysunek 18**) MFC zasilane glukozą były zdominowane przez *Aeromonas hydrophila*. Największy udział tego gatunku odnotowano w MFC 3A (56,9 %) oraz 1A (47,5 %) – czyli w układach, które osiągnęły najwyższą gęstość mocy w całym eksperymencie. *A. hydrophila* wykazuje właściwości egzoelektrogenne, co sugeruje jej kluczową rolę w generowaniu prądu w tych układach [190]. W społecznościach rozwijających się na anodach zasilanych glukozą dominował również rodzaj *Pseudomonas*, reprezentowany przez *Pseudomonas japonica* i *Pseudomonas aeruginosa*. Obecność *P. japonica* jest typowa w środowiskach zawierających glukozę [198], jednak nie zaobserwowano jej wzbogacenia w układach, w których stosowano mieszaninę glukozy i benzenu. Z kolei *P. aeruginosa* jest znana z pośredniego transferu elektronów na zewnątrz komórki, m.in. dzięki produkcji mediatorów redoks, takich jak piocyjanina [199]. Najwyższy udział tego gatunku odnotowano w MFC 3A i wyniósł on 5,9 %.



Rysunek 18 Analiza struktury społeczności mikroorganizmów ukazująca względny udział procentowy określonego gatunku bakterii w społecznościach anodowych degradujących glukozę (grupa A) oraz benzen i glukozę (grupa B).

Podobnie *Acidovorax caeni*, wcześniej wykrywany w społecznościach anodowych [200], osiągnął maksymalny udział 5,8 % w MFC 1A. W społecznościach anodowych wykorzystujących glukozę istotną obecność wykazywały także inne gatunki, powszechnie występujące w osadach czynnych. Należały do nich: *Comamonas testosteroni* (do 19,9 % w MFC 4A), *Comamonas nitratorans* (4,4 % w MFC 1A), *Myroides odoratus* (4,9 % w MFC 5A) oraz *Alcaligenes faecalis* (4,3 % w MFC 5A). Ich obecność może świadczyć o aktywnej roli w rozkładzie glukozy i wspieraniu mikrobiologicznej aktywności elektrochemicznej.

W przypadku zastosowania mieszaniny benzenu i glukozy jako substratów, najliczniej reprezentowanym gatunkiem był *Citrobacter freundii*, którego udział w całkowitej

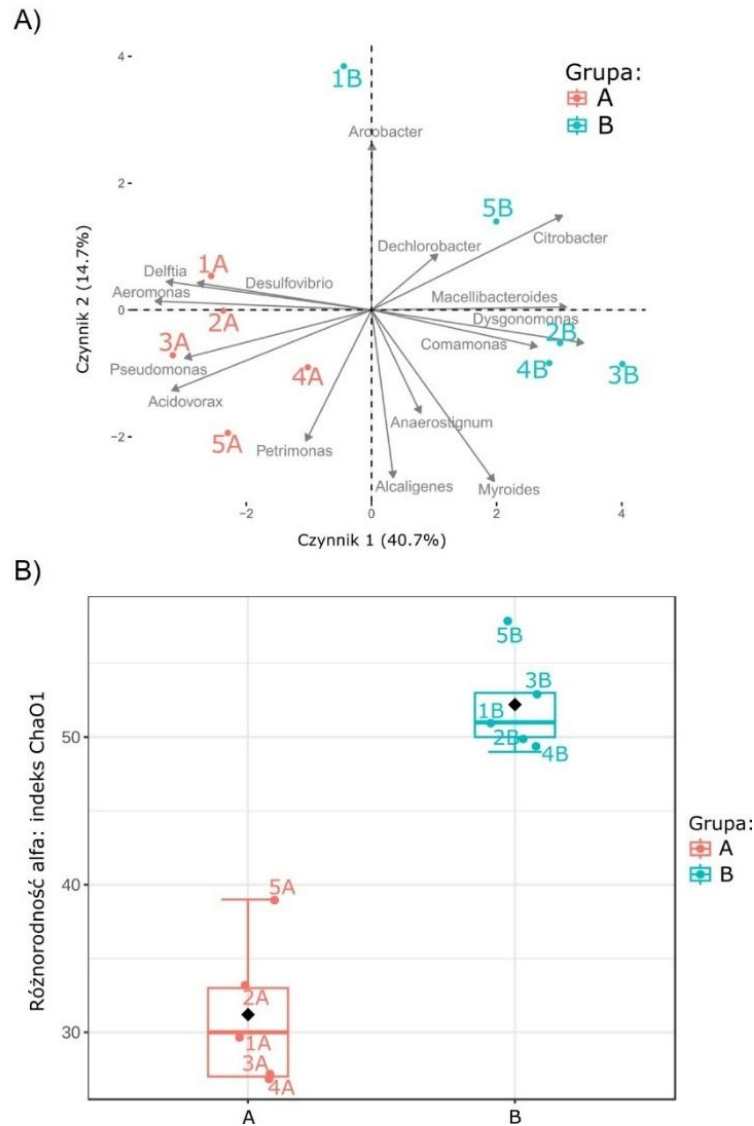
strukturze mikroflory wynosił od 23,1 % (MFC 5B) do 51,5 % (MFC 2B). Bakteria ta wykazuje właściwości egzoelektrogenne [201] i może uczestniczyć w beztlenowej degradacji benzenu [202]. Wysoka liczebność *C. freundii* w badanych ogniwach może wskazywać na jej istotną rolę w transferze elektronów na anodę. W MFC 5B oraz 1B dominującym gatunkiem był *Arcobacter faecis*, osiągając odpowiednio 41,5 % i 35,5 % udziału w strukturze mikrobiologicznej. Jak dotąd brak jest danych literaturowych dotyczących aktywności tego gatunku w mikrobiologicznych ogniwach paliwowych. Jednak inne przedstawiciele rodzaju *Arcobacter* są znane z właściwości egzoelektrogennych i zdolności do tworzenia biofilmów w warunkach mikroaerofilnych oraz beztlenowych [203]. W pozostałych MFC udział *A. faecis* był mniejszy i nie przekraczał 2 %.

W MFC zasilanych benzenem obecny był również szczep *Comamonas testosteroni*, sklasyfikowany jako szczep egzoelektrogeny [204]. Jego udział był istotny we wszystkich MFC z wyjątkiem ogniwa 5B i wahał się od 5,3 % (MFC 2B) do 16,2 % (MFC 4B). Gatunek ten należy do rzędu *Burkholderiales*, który powszechnie dominuje w kulturach wzbogaconych mikroorganizmami degradującymi benzen w warunkach beztlenowych. Przedstawiciele tego rzędu wykorzystują szlak metylacji jako mechanizm aktywacji benzenu w środowisku pozbawionym tlenu [205]. W konsorcjach odpowiedzialnych za degradację benzenu zidentyfikowano również inne charakterystyczne gatunki. *Myroides odoratus* osiągnął 13,7 % udziału w MFC 3B, *Aeromonas hydrophila* – 7,2 % w MFC 1B, *Comamonas nitrativorans* – 4,3 % w MFC 2B, natomiast *Anaerotignum propionicum* – 2,2 % w MFC 4B. Ponadto, we wszystkich ogniwach degradujących benzen obecne były *Alcaligenes faecalis*, *Arcobacter faecis* oraz *Desulfovibrio vulgaris*, choć ich udział nie przekraczał 1 %. Obecność tych gatunków może wskazywać na udział szerokiego spektrum drobnoustrojów syntroficznych wspomagających przekształcenie benzenu w warunkach beztlenowych.

Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi, rodzaj *Geobacter* był uznawany za kluczowy komponent konsorcjów mikroorganizmów uczestniczących w beztlenowej degradacji benzenu [206]. W niniejszym eksperymencie bakterie tego rodzaju zostały wykryte wyłącznie w MFC zasilanych benzenem, jednak ich udział nie przekraczał 0,2 %. Niska liczebność wskazuje raczej na pomocniczą rolę tych bakterii w obrębie całej społeczności mikrobiologicznej. Dodatkowo, w próbkach pochodzących z MFC wykorzystujących benzen zaobserwowano obecność rodzin taksonomicznych związanych z degradacją związków ropopochodnych, takich jak: *Arcobacteraceae*, *Enterobacteriaceae*, *Dysgonomonadaceae*, *Crocinitomicaceae*, *Oscillospirales*, *Nocardiaceae* oraz *Rikenellaceae* [207], [208]. Niektóre z ich przedstawicieli, m.in. *Citrobacter* oraz *Arcobacter*, występowały jako dominujące rodzaje w badanych ogniwach zasilanych benzenem. Ponadto, w społecznościach tych zidentyfikowano liczne gatunki producentów biosurfaktantów. Gatunki te to: tlenowce z rodziny *Sphingobacteriaceae*, beztlenowce z rodzin: *Paludibacteraceae*, *Anaerovoracaceae* i *Crocinitomicaceae* oraz obligatoryjne beztlenowce z rodziny *Oscillospirales*. Obecność tych mikroorganizmów ma istotne znaczenie w procesach biodegradacji benzenu [209].

Analiza głównych składowych (PCA, ang. Principal Component Analysis) (**Rysunek 19A**) ujawniła wyraźny podział próbek na dwa klastry. Mikroorganizmy rozwijające się przy obecności benzenu i glukozy grupowały się w jednym klastrze, natomiast mikrobiomy degradujące wyłącznie glukozę tworzyły drugi, oddzielny klaster. Oddzielne grupowanie próbek sugeruje, że rodzaj substratu znacząco wpływa na skład taksonomiczny mikrobiomu, prowadząc do wykształcenia zróżnicowanych społeczności mikroorganizmów anodowych. Z kolei próbki znajdujące się w tym samym klastrze charakteryzowały się podobnym składem taksonomicznym i funkcjonalnym, co wskazuje na spójność społeczności w odpowiedzi na te same warunki środowiskowe. W MFC zasilanych benzenem dominowały takie rodzaje jak *Citrobacter*, *Comamonas*, *Dysgonomonas* oraz *Arcobacter*. Zaobserwowano również, że MFC 2B, 3B i 4B są bardziej zbliżone do siebie na wykresie PCA, co wskazuje na większe podobieństwo profili taksonomicznych mikrobiomów anodowych. Z kolei w ogniwach zasilanych wyłącznie glukozą, skład społeczności mikrobiologicznej był kształtowany głównie przez takie rodzaje jak *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Acidovorax*, *Delftia*, *Desulfovibrio* oraz *Petrimonas*.

Wartość indeksu alfa-różnorodności Chao1 (**Rysunek 19B**), obliczonego na poziomie rodzaju, różniła się istotnie statystycznie (test t, $p < 0,01$) pomiędzy społecznością degradującą wyłącznie glukozę a społecznością prowadzącą jednoczesną biodegradację glukozy i benzenu. Mikrobiomy anodowe wzbogacone w obecności benzenu wykazały większą bioróżnorodność niż mikrobiomy rozwijające się wyłącznie na glukozie. Najwyższą wartość tego indeksu odnotowano dla MFC 5B – była ona 1,5 razy wyższa niż w przypadku MFC 5A, które osiągnęło najwyższą różnorodność w grupie A. Otrzymane wyniki sugerują, że obecność toksycznych i strukturalnie złożonych substratów, takich jak benzen, sprzyjała formowaniu bardziej zróżnicowanych społeczności mikroorganizmów w porównaniu do środowisk wykorzystujących prosty substrat organiczny, jakim jest glukoza. Ponadto uzyskane dane wskazują, że skuteczna degradacja toksycznych związków aromatycznych, takich jak benzen, wymaga obecności funkcjonalnie zróżnicowanego mikrobiomu, zdolnego do prowadzenia złożonych szlaków metabolicznych obejmujących wiele etapów przekształceń. Jednocześnie w społecznościach bogatych głównie w mikroorganizmy metabolizujące glukozę rozwijają się silne mechanizmy konkurencji wewnętrznej, które ograniczają ogólną różnorodność i potencjał funkcjonalny mikrobiomu. Wyniki wskazują również, że obecność glukozy, mimo jej udziału w metabolizmie, nie była wystarczająca do utrzymania niektórych istotnych grup egzoelektrogenów (np. *Pseudomonas*) w obrębie społeczności. Może to częściowo tłumaczyć wydłużony czas adaptacji i niskie wartości generowanej mocy w początkowej fazie eksperymentu.



Rysunek 19 Analiza struktury społeczności mikroorganizmów w społecznościach anodowych degradujących glukozę (grupa A) oraz benzen i glukozę (grupa B). A) Analiza głównych składowych w oparciu o najliczniejsze rodzaje bakterii; B) Wykresy pudełkowe obrazujące rozkład alfa-różnorodności mikroorganizmów (indeks Chaol) na poziomie taksonomicznym rodzaju.

Zgodnie z wynikami analizy qPCR (**Tabela 6**), całkowita liczba kopii DNA bakteryjnego w MFC zasilanych mieszaniną benzenu i glukozy była nieznacznie wyższa niż w układach zawierających wyłącznie glukozę. W przypadku archeonów liczba kopii DNA była o rząd wielkości wyższa w układach zasilanych benzenem, co wskazuje, że warunki te były bardziej sprzyjające dla ich rozwoju.

Tabela 6 Liczba kopii DNA bakterii i archeonów w społecznościach mikroorganizmów komór anodowych MFC zasilanych glukozą (grupa A) oraz mieszaniną benzenu i glukozy (grupa B), oznaczona metodą qPCR.

MFC	Substrat	Bakteryjne DNA (ilość kopii/mL)	DNA archeonów (ilość kopii/mL)
1A	Glukoza	3,07E+10	2,38E+01
2A		3,38E+10	1,07E+02
3A		4,03E+10	1,17E+02
4A		3,28E+10	4,11E+02
5A		7,70E+09	4,93E+01
1B	Benzen + Glukoza	4,40E+10	1,80E+02
2B		3,85E+10	1,18E+03
3B		3,58E+10	5,62E+03
4B		6,58E+10	2,27E+03
5B		3,46E+10	6,34E+02

Wyniki te potwierdzają, że złożoność warunków środowiskowych, w jakich zachodzi biodegradacja, stanowi istotny czynnik determinujący strukturę i różnorodność mikroflory. Dane z wcześniejszych badań dostarczają jednak sprzecznych obserwacji. Związki ropopochodne w niektórych przypadkach prowadziły do wzrostu, w innych zaś do spadku alfa-różnorodności [210], [211], [212], [213]. Przyczyną takich rozbieżności mogą być różnice w zastosowanej metodyce oraz wybór odmiennych wskaźników różnorodności alfa. W związku z tym złożoność dynamiki konsorcjów mikroorganizmów, wraz z ich sieciami metabolicznymi w obecności związków trudno biodegradowalnych w bioelektrochemicznych układach, może różnić się od tej obserwowanej w innych środowiskach. Wynika to z faktu, że środowisko takie jest wysoce dynamiczne i w czasie rzeczywistym dostosowuje się do panujących warunków, generowanych przez samo konsorcjum elektroaktywne, na przykład poprzez zmiany parametrów elektrochemicznych reaktorów [116].

4.1.5. Podsumowanie i wnioski

W niniejszym eksperymencie oceniono możliwość wykorzystania MFC do biodegradacji benzenu jako modelowego związku aromatycznego oraz wpływ glukozy jako kosubstratu na rozwój anodowych społeczności mikroorganizmów. Zastosowanie strategii inokulacji obejmującej początkowe użycie czystych szczepów, a następnie ich wzbogacenie osadem czynnym, umożliwiło ukształtowanie funkcjonalnych biofilmów anodowych. Wyniki zestawione w Tabeli 7 wskazują, że najwyższą gęstość mocy w całym eksperymencie uzyskano w ogniwie MFC 1B, zasilanym benzenem i glukozą, która wyniosła 119,6 mW/m² (5,4 W/m³). Uzyskana gęstość mocy była około 18-krotnie wyższa niż wartości dotychczas raportowane w literaturze dla MFC wykorzystujących benzen [187], [214], co podkreśla potencjał optymalizacji układów MFC poprzez odpowiedni dobór

kosubstratów oraz składu mikrobiomu anodowego. W ogniwach zasilanych wyłącznie glukozą najwyższą gęstość mocy odnotowano w MFC 3A, osiągając 103,8 mW/m² (4,7 W/m³). Wydajność kulombowska osiągnęła 8,4 % w MFC 1B, co należy do najwyższych wartości opisanych w literaturze; dla porównania, w badaniach wykorzystujących beztlenowy osad ściekowy z glukozą wartość CE dla degradacji benzenu wynosiła zaledwie 1,04 % [187].

Spółeczności mikroorganizmów anodowych rozwijające się w obecności benzenu i glukozy charakteryzowały się wyższą bioróżnorodnością niż społeczności degradujące wyłącznie glukozę. Najwyższą wartość indeksu alfa-różnorodności Chao1 odnotowano w MFC 5B – była ona 1,5-krotnie wyższa niż w MFC 5A, które osiągnęło najwyższą różnorodność w grupie A. Wyniki te wskazują, że obecność toksycznych i strukturalnie złożonych substratów, takich jak benzen, sprzyja tworzeniu funkcjonalnie zróżnicowanego mikrobiomu, niezbędnego do efektywnej degradacji aromatycznych związków i prowadzenia złożonych szlaków metabolicznych. Jednocześnie w społecznościach zdominowanych przez mikroorganizmy metabolizujące wyłącznie glukozę mogą rozwijać się mechanizmy konkurencji wewnętrznej, ograniczające ogólną różnorodność i potencjał funkcjonalny mikrobiomu.

Analiza PCA wykazała, że mikrobiomy anodowe grupowały się w dwa osobne klastry. Społeczności rozwijające się w obecności benzenu i glukozy odróżniały się od mikrobiomów degradujących wyłącznie glukozę, co wskazuje, że rodzaj substratu determinuje strukturę i funkcjonalność anodowych konsorcjów. Społeczności te charakteryzowały się większą liczebnością przedstawicieli rodzaju *Geobacter* oraz obecnością gatunków takich jak *Citrobacter freundii*, *Arcobacter faecis*, *Comamonas testosteroni*, *Myroides odoratus* i *Dysgonomonas sp.*, które mogą stanowić kluczowe elementy inokulum w systemach MFC ukierunkowanych na biodegradację związków aromatycznych. Dzięki temu konsorcja anodowe były zdolne do całkowitego usunięcia benzenu, co potwierdzono analizą metabolomiczną metodą NMR.

Podsumowując, zastosowanie benzenu w połączeniu z glukozą zwiększa zarówno różnorodność, jak i funkcjonalność anodowych mikrobiomów, co w układach z tym substratem przekłada się na wyjątkowo wysokie wartości gęstości mocy i efektywność kulombowską. Społeczności mikroorganizmów wzbogacone w obecności benzenu wykazują potencjał do degradacji toksycznych związków aromatycznych oraz efektywnego transferu elektronów, co potwierdza możliwość zastosowania zidentyfikowanych drobnoustrojów w bioremediacji związków aromatycznych.

Tabela 7 Zestawienie wartości maksymalnych mocy, maksymalnych gęstości mocy, usunięcia chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT) oraz efektywności kulombowskiej (CE) z całego eksperymentu dla poszczególnych ogniw.

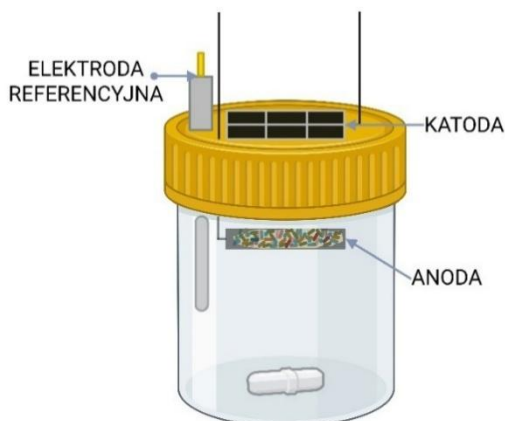
MFC	Substrat	Maksymalna gęstość mocy (W/m ³)	Maksymalna gęstość mocy (mW/m ²)	ChZT (%)	CE (%)	Wartość alfa-różnorodności (indeks Chao1)	Dominujące gatunki bakterii (udział względny (%))
1A	Glukoza	3,5	77,1	81,6	3,4	30	<i>Aeromonas hydrophila</i> (47,5) <i>Pseudomonas japonica</i> (11,1)
2A		2,3	50,1	81,3	3,0	33	<i>Aeromonas hydrophila</i> (39,7)
3A		4,7	103,8	79,4	5,5	27	<i>Aeromonas hydrophila</i> (56,9) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (5,9)
4A		4,1	92,1	81,2	1,6	27	<i>Aeromonas hydrophila</i> (27,3) <i>Comamonas testosteroni</i> (9,9)
5A		4,5	101,0	82,2	2,3	39	<i>Aeromonas hydrophila</i> (39,0) <i>Pseudomonas japonica</i> (17,8)
1B	Benzen + Glukoza	5,4	119,6	80,4	8,4	51	<i>Arcobacter faecis</i> (35,5) <i>Citrobacter freundii</i> (32,6)
2B		2,1	45,7	82,0	2,4	50	<i>Citrobacter freundii</i> (51,5) <i>Myroides odoratus</i> (8,2)
3B		0,9	20,5	83,6	1,3	53	<i>Citrobacter freundii</i> (29,5) <i>Myroides odoratus</i> (13,7)
4B		2,8	61,1	83,6	3,5	49	<i>Citrobacter freundii</i> (46,8) <i>Comamonas testosteroni</i> (16,2)
5B		2,9	65,3	82,0	1,8	58	<i>Arcobacter faecis</i> (41,5) <i>Citrobacter freundii</i> (23,1)

4.2. Biodegradacja oleju napędowego w MFC – wpływ potencjału anody na dynamikę rozwoju mikroorganizmów

Eksperyment został przeprowadzony w ramach współpracy wewnętrznej w zespole Laboratorium Mikrobiologicznych Układów Elektrochemicznych (LMES). Pełne dane eksperymentalne, obejmujące charakterystykę elektrochemiczną oraz parametry pracy MFC, zostały opublikowane w pracy Widery i in. [134]. W niniejszym opracowaniu przedstawiono wyniki z eksperymentów elektrochemicznych istotne z punktu widzenia analizy dynamiki rozwoju społeczności mikroorganizmów w komorze anodowej w warunkach zróżnicowanego potencjału anodowego.

4.2.1. Inokulacja MFC oraz przebieg eksperymentu

W eksperymencie zastosowano trzy mikrobiologiczne ogniwa paliwowe w konfiguracji trójelektrodowej, zbudowane z polipropylenowych pojemników o objętości roboczej 150 cm³ (**Rysunek 20**). Konstrukcja reaktorów była zgodna ze specyfikacją przedstawioną w **Tabeli 2** w rozdziale 3.1. Powierzchnia geometryczna anody wynosiła 9 cm². Jako elektrody odniesienia zastosowano elektrody Ag/AgCl typu RE-1B (ALS Co., Japonia). Początkowo zastosowano opór zewnętrzny (R_{zew}) o wartości 2 k Ω , który w dalszym przebiegu eksperymentu był regulowany na podstawie wyników uzyskiwanych podczas cyklicznych testów polaryzacyjnych. W celu zapewnienia jednorodnego rozprowadzenia hydrofobowego substratu w objętości elektrolitu, reaktory wyposażono w mieszadła magnetyczne. MFC działały w stałej temperaturze pokojowej 25 °C i były monitorowane przez 126 dni (18 tygodni).



Rysunek 20 Schemat konstrukcji jednokomorowego MFC zastosowanego w eksperymencie.

Jako źródło mikroorganizmów wykorzystano glebę pobraną z terenu miejskiego w pobliżu publicznego parkingu we Wrocławiu (51,114069 °N, 17,071237 °E). Gleba została przesiana w celu usunięcia kamieni. Do inokulacji ogniw wykorzystano 10 % (w/v) zawiesinę gleby w podłożu mineralnym (MSM), zawierającym 1,5 g/L NH₄Cl (dalej zgodnie ze składem opisanym w rozdziale 3.3.). Jako substrat energetyczny przez cały czas trwania eksperymentu wykorzystywano komercyjnie dostępny olej napędowy

w stężeniu 0,1 % (v/v). Skład chemiczny paliwa obejmował około 75 % węglowodorów alifatycznych ($C_{10}H_{20}$ - $C_{15}H_{28}$) oraz około 25 % związków aromatycznych, takich jak benzen i toluen.

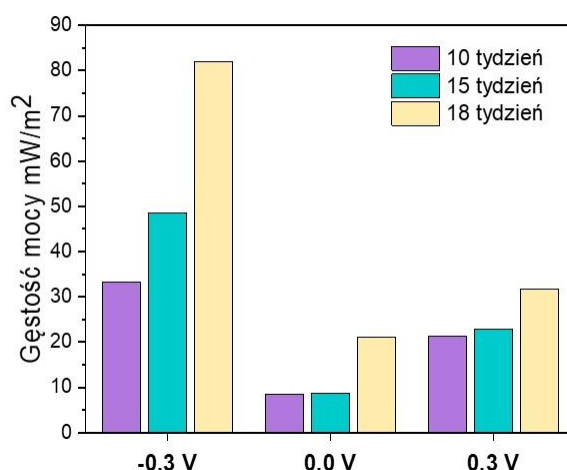
W celu prowadzenia elektrochemicznego wzbogacania biofilmu anodowego metodą chronoamperometrii, każdy z reaktorów był przez cały czas trwania doświadczenia podłączony do potencjostatu MultiPalmSens4. Zadawane potencjały anody wynosiły odpowiednio -0,3 V oraz 0,3 V względem elektrody odniesienia Ag/AgCl. Dodatkowo zastosowano kontrolę, w której potencjał anody utrzymywano na poziomie 0,0 V, co pozwoliło na ocenę wpływu potencjału elektrody na rozwój społeczności egzoelektrogenów.

Eksperyment prowadzono w trybie wsadowym, opartym na powtarzalnych cyklach wymiany anolitu. Temperaturę utrzymywano na poziomie 25 °C. Po zakończeniu pierwszego cyklu zasilania (etapu inokulacji) całą zawartość komory anodowej, w tym glebę, usunięto i zastąpiono świeżym medium MSM z dodatkiem oleju napędowego o identycznym stężeniu. Zawartość komory wymieniano średnio raz w tygodniu lub w momencie zaobserwowanego spadku generowanego prądu, co wskazywało na zużycie substratu.

Prądy generowane przez biofilmy w warunkach zadanych potencjałów monitorowano w czasie rzeczywistym metodą chronoamperometrii, z wykorzystaniem potencjostatu wielokanałowego, przy interwale pomiarowym wynoszącym 3 minuty. Eksperyment prowadzono w trybie wsadowym. Po zakończeniu pierwszego cyklu zasilania (etapu inokulacji) całą zawartość komory anodowej, w tym glebę, usunięto i zastąpiono świeżym medium MSM z olejem napędowym o tym samym stężeniu. Wymiana zawartości komory była przeprowadzana średnio raz w tygodniu lub w momencie zaobserwowanego spadku generowanego prądu.

4.2.2. Wydajność MFC

W trakcie trwania eksperymentu zaobserwowano wyraźną tendencję wzrostową generowanej mocy (**Rysunek 21**). W kolejnych tygodniach pracy układów następował stopniowy rozwój biofilmów elektrogennych, co skutkowało sukcesywnym zwiększaniem się wartości gęstości mocy. W przeprowadzonych testach polaryzacyjnych najwyższą gęstość mocy uzyskano w 18. tygodniu pracy układu, osiągając wartość 83,2 mW/m² przy potencjale anody równym -0,3 V. Wartość ta przewyższała wyniki uzyskane w pozostałych wariantach eksperymentalnych oraz w innych konfiguracjach MFC opisanych w literaturze, w których jako inokulum stosowano próbki środowiskowe lub osad czynny [215], [216]. Drugą co do wielkości gęstością mocy była wartość 31,6 mW/m², zarejestrowana dla biofilmu rozwiniętego przy potencjale 0,3 V, co stanowiło wynik wyższy niż dla kontrolnego MFC z elektrodą przy potencjale 0,0 V (20,9 mW/m²), lecz istotnie niższy niż dla MFC pracującego przy potencjale -0,3 V.



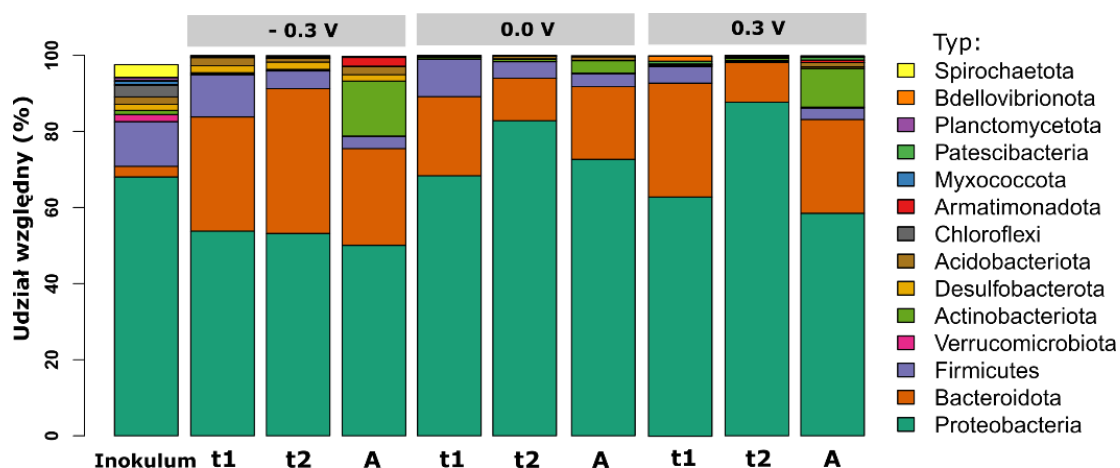
Rysunek 21 Wykres słupkowy przedstawiający maksymalne gęstości mocy uzyskane w testach voltamperometrii liniowej (LSV) w 10., 15. oraz 18. tygodniu trwania eksperymentu.

4.2.3. Analiza struktury i dynamiki wzrostu mikroorganizmów

Do analiz mikrobiologicznych pobrano próbki zarówno z elektrolitu z komory anodowej (bakterie planktoniczne), jak i z powierzchni anody (biofilm anodowy). Próbki planktoniczne pobrano dwukrotnie: po 10 tygodniach pracy układu (t1) oraz po 15 tygodniach (t2). Próbki biofilmu anodowego (oznaczone jako A) zebrano pod koniec eksperymentu, w 18. tygodniu, w celu oceny w pełni ukształtowanej społeczności anodowej.

Sekwencjonowanie amplikonów genu 16S rRNA pozwoliło uzyskać łącznie 1 285 100 odczytów, które pogrupowano w 1238 wariantów sekwencji amplikonów (ASV). Uzyskane wyniki wskazują na istotne różnice w składzie taksonomicznym społeczności bakteryjnych na poziomie typu, w porównaniu do pierwotnego inokulum (**Rysunek 22**).

We wszystkich badanych próbkach, w tym w inokulum pierwotnym, grupą dominującą były *Proteobacteria*. Są one kluczowe dla działania ogni, ponieważ typ ten obejmuje liczne gatunki o zdolnościach egzoelektrogennych [106]. W pierwotnym inokulum obecne były również *Spirochaetota*, *Chloroflexi* oraz *Verrucomicrobiota*, jednak po procesie wzbogacania w układzie MFC ich liczebność istotnie spadła. Zupełnie inną tendencję odnotowano dla typów *Bacteroidota* i *Actinobacteriota*, których udział zwiększył się w społecznościach biofilmu anodowego, co może wskazywać na ich aktywny udział w procesie generowania prądu. Największy udział względny *Bacteroidota* zaobserwowano w próbkach pochodzących z potencjału -0,3 V, gdzie wynosił on 38 %. Z kolei wzrost udziału *Actinobacteriota* był związany ze zwiększoną produkcją gęstości mocy. Przy potencjale -0,3 V ich względny udział wynosił 15 %, podczas gdy w pozostałych warunkach był znacznie niższy. Co istotne, najniższą gęstość mocy oraz najniższy udział tego typu bakterii odnotowano dla biofilmu anodowego przy potencjale 0,0 V (spadek do 3 %).



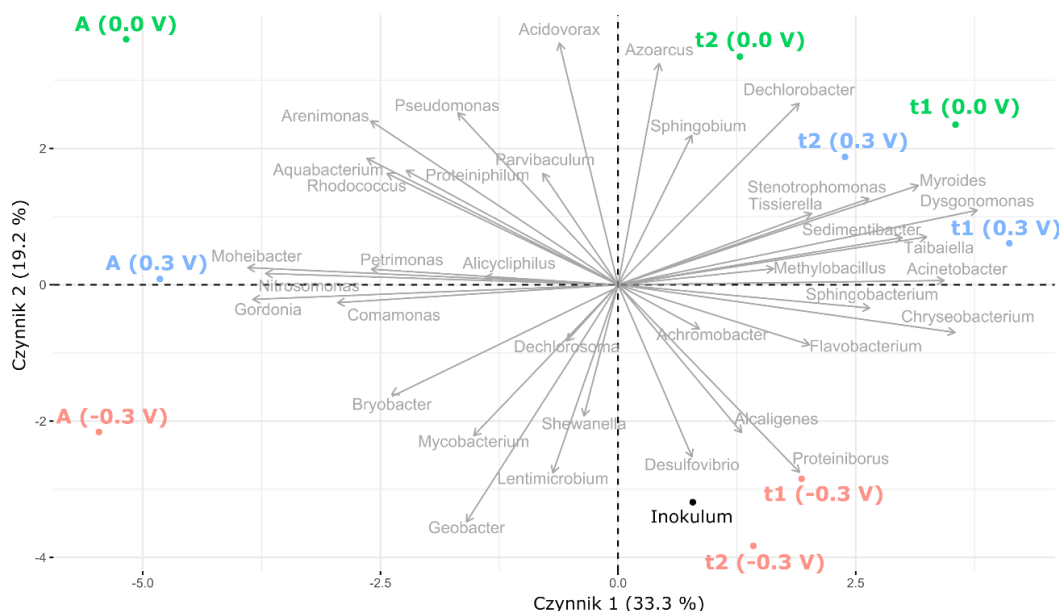
Rysunek 22 Analiza struktury społeczności mikroorganizmów przedstawiające wykresy słupkowe względnej liczebności taksonów na poziomie typu w próbkach planktonicznych i biofilmu anodowego z MFC oraz w próbce inokulum pierwotnego. Wyjaśnienia symboli: Inokulum – mikrobiom początkowy; t1 – mikrobiom planktoniczny zebrany po 10. tygodniach pracy układu; t2 – mikrobiom planktoniczny zebrany po 15. tygodniach pracy układu; A – mikrobiom anodowy zebrany w 18. tygodniu, pod koniec eksperymentu.

Przy najniższym potencjale (-0,3 V) zaobserwowano najbardziej unikalną kompozycję biofilmu anodowego. W przeciwieństwie do układów o wyższych potencjałach (0,0 V oraz 0,3 V), w których struktura biofilmu ulegała uproszczeniu na rzecz dominacji *Proteobacteria*, w układzie -0,3 V odnotowano znaczący udział innych grup. Zwiększył się tu udział przede wszystkim typów: *Bacteroidota* oraz *Actinobacteriota*, ale zaobserwowano również wyraźny wzrost liczebności *Desulfobacterota* i *Armatimonadota*. Sugeruje to wytworzenie się wydajnej sieci metabolicznej, w której te grupy bakterii wspomagają rozkład złożonych zanieczyszczeń do prostszych związków, łatwiej przyswajalnych dla egzoelektrogenów.

Wyniki te sugerują, że bakterie z typu *Actinobacteriota* mogą odgrywać kluczową rolę w transferze elektronów podczas biodegradacji zanieczyszczeń w układzie MFC. Dominacja *Actinobacteriota* w społecznościach anodowych była już wcześniej wiązana z wysoką wydajnością systemów wykorzystujących różnorodne substraty: od ścieków z glukozą i barwnikami tekstylnymi [217], po mieszaniny mikroplastiku z octanem sodu pełniącym funkcję kosubstratu [218]. Zauważono, że wraz ze wzrostem potencjału do 0,3 V, różnorodność biofilmu malała, co mogło ograniczać szybkość dostarczania prostych substratów do anody i tym samym skutkować niższą wydajnością energetyczną całego układu.

Zróznicowanie składu taksonomicznego badanych społeczności potwierdziła analiza głównych składowych (PCA), której dwie pierwsze osie wyjaśniały łącznie 52,5 % zmienności (Rysunek 23). Na wykresie PCA można zaobserwować wyraźną separację społeczności zasiedlających powierzchnię anody od prób planktonicznych wzdłuż pierwszej osi (czynnik 1). Wskazuje to, że skład biofilmu anodowego różnił się od składu mikrobiomu obecnego w fazie ciekłej. Dodatkowo, społeczności anodowe przy potencjałach 0,0 V i 0,3 V wykazywały większe wzajemne podobieństwo niż w zestawieniu z układem pracującym przy -0,3 V. Druga oś (czynnik 2) odzwierciedlała zmiany w składzie mikroorganizmów wynikające bezpośrednio

z zastosowanego potencjału anody. Próbkę planktoniczną (t1 i t2) z układów 0,0 V oraz 0,3 V tworzyły wspólne skupienie, wyraźnie odizolowane od planktonu z układu -0,3 V. Co więcej, dynamika zmian mikroflory w czasie była porównywalna dla potencjałów 0,0 V i 0,3 V, co odróżniało te układy od wariantu -0,3 V.

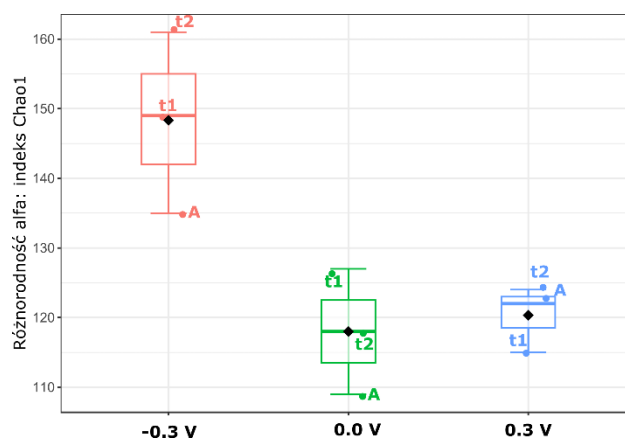


Rysunek 23 Analiza struktury społeczności mikroorganizmów przedstawiona na wykresie PCA, opracowanym na podstawie względnego udziału taksonów na poziomie rodzaju. Wyjaśnienia symboli: Inokulum – mikrobiom początkowy; t1 – mikrobiom planktoniczny zebrany po 10. tygodniach pracy układu; t2 – mikrobiom planktoniczny zebrany po 15. tygodniach pracy układu; A – mikrobiom anodowy zebrany w 18. tygodniu, pod koniec eksperymentu.

Przy potencjałach 0,0 V i 0,3 V mikrobiomy anodowe różnicowały się głównie ze względu na rodzaje *Moheibacter* i *Arenimonas*. Natomiast przy potencjale -0,3 V dominującym czynnikiem różnicującym były rodzaje *Gordonia*, *Geobacter* oraz *Bryobacter*. W próbkach planktonicznych (t1 i t2) skład społeczności również zmieniał się w zależności od przyłożonego potencjału. Mikrobiomy przy potencjałach 0,0 V i 0,3 V różnicowały się głównie przez rodzaje *Dechlorobacter*, *Myroides* oraz *Dysgonomonas*, natomiast mikrobiomy planktoniczne przy potencjale -0,3 V były różnicowane przez rodzaje *Proteiniborus*, *Desulfovibrio* i *Alcaligenes*.

Indeks alfa-różnorodności Chao1, wyznaczony na podstawie liczby wariantów sekwencji ampikonów (ASV) wykazał, że największym bogactwem taksonomicznym charakteryzowały się próbki z układów utrzymywanych przy potencjale -0,3 V. Najniższe wartości tego indeksu odnotowano dla próbek przy potencjale 0,0 V (Rysunek 24). Zgodnie z wynikami analizy wariancji (ANOVA), wpływ przyłożonego potencjału na wartości indeksu Chao1 był statystycznie istotny ($p < 0,05$). Przeprowadzona następnie szczegółowa analiza testem post-hoc Tukeya (HSD) potwierdziła, że układ przy potencjale -0,3 V wykazywał istotnie wyższe bogactwo taksonomiczne w porównaniu do obu pozostałych wariantów, tj. 0,0 V oraz 0,3 V (Tabela 8). Jednocześnie test Tukeya

wykazał, że różnice między układami 0,0 V i 0,3 V pozostawały statystycznie nieistotne ($p > 0,05$). Uzyskane wyniki wskazują na pozytywny związek pomiędzy bogactwem gatunkowym społeczności bakteryjnej a efektywnością pracy ogniów MFC. Wyższy poziom różnorodności był związany z lepszymi parametrami funkcjonalnymi układu, co potwierdzono poprzez analizę relacji między wartościami generowanej mocy a indeksem różnorodności w fazie planktonicznej (t1, t2) oraz w biofilmie anodowym [134].



Rysunek 24 Analiza struktury społeczności mikroorganizmów przedstawiająca wykresy pudełkowe obrazujące rozkład alfa-różnorodności mikroorganizmów (indeks Chao1) na poziomie taksonomicznym gatunku w trzech grupach doświadczalnych. Wyjaśnienia symboli: t1 – mikrobiom planktoniczny zebrany po 10. tygodniach pracy układu; t2 – mikrobiom planktoniczny zebrany po 15. tygodniach pracy układu A – mikrobiom anodowy zebrany w 18. tygodniu, pod koniec eksperymentu.

Tabela 8 Wyniki testu istotności różnic Tukeya HSD przeprowadzonego na podstawie wartości alfa-różnorodności (indeks Chao1) na poziomie gatunku. Wyjaśnienia: *różnica istotna statystycznie; ** różnica nieistotna statystycznie.

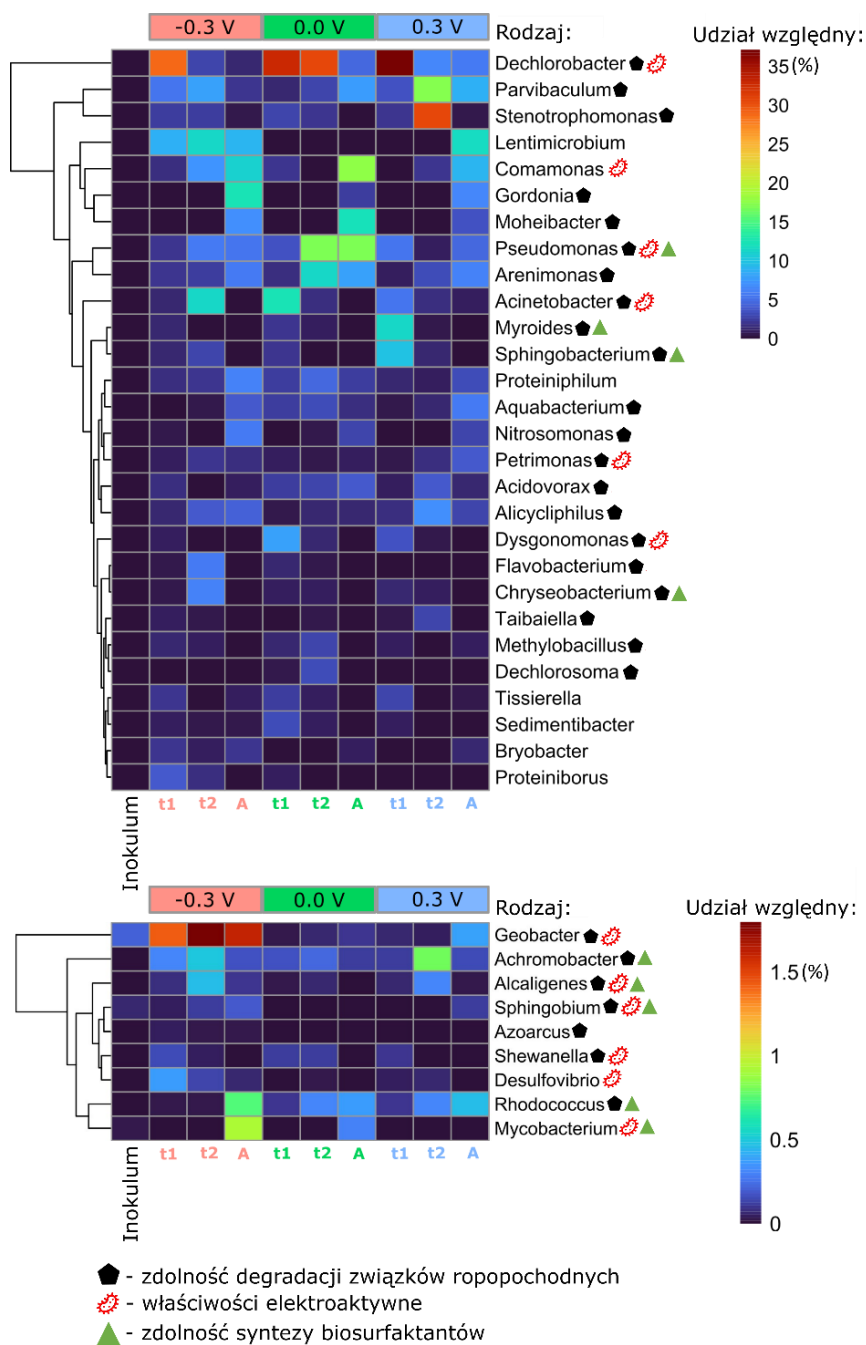
Porównywane grupy	Statystyka Q testu Tukeya HSD	p-value testu Tukeya HSD	Wnioskowanie metodą Tukeya HSD
-0,3 V vs 0,0 V	5,51	0,02	* $p < 0,05$
-0,3 V vs 0,3 V	5,09	0,03	* $p < 0,05$
0,0 V vs 0,3 V	0,42	0,90	** $p > 0,05$

Na poziomie rodzaju, społeczności mikroorganizmów zasiedlających powierzchnię anody wykazywały wyraźnie odmienny skład taksonomiczny w porównaniu do społeczności planktonicznych (**Rysunek 25A**). Ogniwo, którego anoda działa w ujemnym potencjale, charakteryzowało się większym udziałem mikroorganizmów zdolnych do efektywnej degradacji oleju napędowego (**Rysunek 25A, B**), co przekładało się na lepszą wydajność tego układu, m.in. dzięki zwiększonemu wykorzystaniu substratu, co potwierdzono w analizach usuwania ChZT [134].

Na powierzchniach anodowych dominującymi rodzajami we wszystkich wariantach potencjałów były *Comamonas*, *Moheibacter*, *Pseudomonas* oraz *Arenimonas*. Dodatkowo, w zależności od zastosowanego potencjału, stwierdzono obecność następujących rodzajów: *Gordonia* i *Lentimicrobium* (dla -0,3 i 0,3 V), *Dechlorobacter* i *Parvibaculum* (dla 0,0 i 0,3 V), *Proteiniphilum* i *Nitrosomonas* (dla -0,3 V) oraz *Aquabacterium* (dla 0,3 V). Warto zaznaczyć, że *Dechlorobacter* nie został wykryty w inokulum, natomiast jego liczebność była bardzo wysoka w planktonicznej społeczności po 10 tygodniach pracy układu (t1). Sugeruje to, że ten rodzaj mógł odgrywać istotną rolę w początkowych etapach formowania się biofilmu anodowego.

Zróźnicowanie społeczności bakteryjnych pomiędzy próbkami pochodzącymi z różnych potencjałów dotyczy przede wszystkim grup rodzajów charakteryzujących się właściwościami egzoelektrogennymi, zdolnością do syntezy biosurfaktantów oraz aktywnością w rozkładzie węglowodorów. Są to zazwyczaj rzadkie taksony, których udział względny w próbkach nie przekraczał 2 %. W zakresie niskiej liczebności (<2 %), dla próbek z potencjału -0,3 V, najczęściej identyfikowanymi rodzajami były *Geobacter*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Desulfovibrio*, *Alcaligenes* oraz *Achromobacter*, obserwowane w różnych punktach czasowych. W próbkach uzyskanych przy potencjale 0,0 V nie zaobserwowano istotnego wzrostu liczebności tych mikroorganizmów. Obecność przewodzących nanowłókien białkowych u takich rodzajów jak *Geobacter*, *Desulfovibrio* i *Mycobacterium* ułatwia przekazywanie elektronów do anody, co stanowi potencjalne wyjaśnienie wyższej wydajności układów pracujących przy potencjale -0,3 V [106], [219], [220]. Ponadto, szczepy z rodzajów *Rhodococcus*, *Desulfovibrio* oraz *Geobacter* są zdolne do wykorzystania węglowodorów jako źródła energii [221], [222], [223].

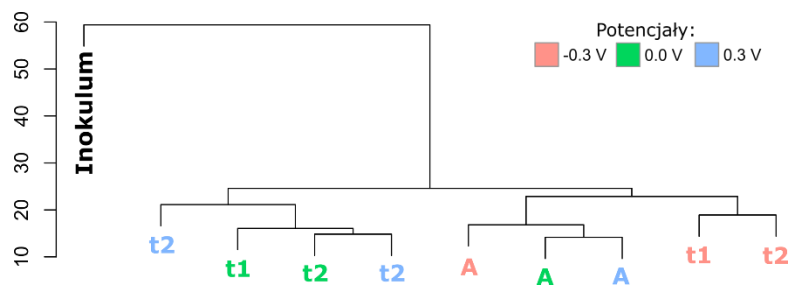
Zastosowanie oleju napędowego jako substratu mogło zostać dodatkowo wspomagane przez obecność biosurfaktantów produkowanych zarówno przez taksony o niskiej, jak i wysokiej liczebności, takie jak *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Desulfovibrio*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Comamonas* i *Pseudomonas*. W próbkach pochodzących z układów pracujących przy potencjale 0,3 V odnotowano wyższy udział *Achromobacter*, znanego z właściwości biodegradacyjnych oraz zdolności do syntezy biosurfaktantów [224]. W próbkach tych obecne były również *Geobacter* i *Rhodococcus*, jednak ich udział był niższy niż w przypadku potencjału -0,3 V.



Rysunek 25 Analiza struktury społeczności mikroorganizmów przedstawiająca: A) mapę cieplną względnej liczebności dziesięciu najliczniej reprezentowanych rodzajów bakterii w próbkach planktonicznych oraz biofilmu anodowego z MFC; B) mapę cieplną względnej liczebności rodzajów bakterii egzoelektrogennych, zdolnych do biodegradacji związków ropopochodnych oraz syntezy biosurfaktantów (na podstawie danych literaturowych) w tych samych typach próbek. Wyjaśnienia symboli: Inokulum – mikrobiom początkowy; t1 – mikrobiom planktoniczny zebrany po 10. tygodniach pracy układu; t2 – mikrobiom planktoniczny zebrany po 15. tygodniach pracy układu; A – mikrobiom anodowy zebrany w 18. tygodniu, pod koniec eksperymentu.

Na podstawie analizy wyników można stwierdzić, że obecność i liczebność egzoelektrogenów, zdolnych do degradacji węglowodorów oraz produkcji biosurfaktantów, miała istotny wpływ na wydajność układów MFC. Najwyższą efektywność uzyskano w ogniwach których anoda pracowała przy potencjale -0,3 V, natomiast najniższą przy 0,0 V.

Dendrogram przedstawiony na **Rysunku 26** obrazuje wyraźne różnice między analizowanymi próbkami, z wyodrębnionymi grupami próbek o zbliżonym składzie mikroflory bakteryjnej na poziomie rodzaju. Próbki pochodzące z układów MFC tworzą wyraźnie oddzielony klaster względem inokulum. Społeczności biofilmu anodowego grupują się wspólnie z próbkami planktonicznymi z warunków -0,3 V, natomiast próbki planktoniczne z potencjału 0,0 V oraz z próbkami pobranymi w t1 przy 0,3 V tworzą odrębną grupę, co pozostaje zgodne z obserwacjami wynikającymi z analizy PCA.



Rysunek 26 Analiza społeczności mikroorganizmów: dendrogram przedstawiający wyniki analizy skupień hierarchicznych próbek planktonicznych oraz biofilmu anodowego z MFC, opracowanej na podstawie względnej liczebności bakterii na poziomie rodzaju. Wyjaśnienia symboli: Inokulum – mikrobiom początkowy; t1 – mikrobiom planktoniczny zebrany po 10. tygodniach pracy układu; t2 – mikrobiom planktoniczny zebrany po 15. tygodniach pracy układu; A – mikrobiom anodowy zebrany w 18. tygodniu, pod koniec eksperymentu.

4.2.4. Podsumowanie i wnioski

W niniejszej pracy po raz pierwszy w literaturze zastosowano różne wartości potencjałów anody w MFC w celu selektywnego wzbogacenia społeczności egzoelektrogennych ukierunkowanych na degradację oleju napędowego. Analiza obejmowała obserwację dynamiki zmian w strukturze społeczności mikroorganizmów zarówno w biofilmie anodowym, jak i we frakcji planktonicznej w kolejnych punktach czasowych.

Wyniki eksperymentu dotyczące wpływu potencjału anody na wydajność elektrochemiczną, bioróżnorodność oraz skład społeczności mikroorganizmów anodowych zestawiono w **Tabeli 9**. Analiza przedstawionych danych wykazała pozytywną zależność pomiędzy alfa-różnorodnością społeczności mikroorganizmów anodowych a wydajnością elektrochemiczną MFC. Wyższe wartości indeksu Chao1 odpowiadały większej maksymalnej gęstości mocy, co wskazuje, że bogatsze taksonomicznie społeczności sprzyjają efektywniejszemu przekazywaniu elektronów na anodę. Społeczności o wyższej bioróżnorodności zawierały jednocześnie szersze spektrum mikroorganizmów funkcjonalnych: zdolnych do produkcji energii elektrycznej, degradacji węglowodorów i syntezy biosurfaktantów, co podkreśla rolę zróżnicowanego mikrobiomu w optymalizacji działania MFC.

Analiza składu taksonomicznego biofilmów anodowych wykazała, że potencjał -0,3 V sprzyjał tworzeniu najbardziej zróżnicowanej i funkcjonalnej społeczności mikroorganizmów. Analiza 16S rRNA wykazała, że głównymi typami bakteryjnymi

obecnymi w biofilmie przy tym potencjale były *Proteobacteria* (50 %), *Bacteroidota* (38 %) oraz *Actinobacteriota* (15 %), co było związane z najwyższą wydajnością układu. W biofilmie przy -0,3 V dominowały rodzaje *Gordonia*, *Comamonas*, *Moheibacter*, *Proteiniphilum*, *Arenimonas*, *Nitrosomonas* i *Pseudomonas*, które wykazują zarówno zdolność do biodegradacji węglowodorów, jak i transferu elektronów. Jednocześnie obecne były mikroorganizmy zdolne do produkcji biosurfaktantów (*Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Sphingobium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*). Nawet rodzaje występujące w niskiej obfitości, takie jak *Geobacter*, mogły istotnie przyczynić się do elektrogenności biofilmu. Wzrost potencjału anody do 0,0 lub 0,3 V wiązał się ze spadkiem udziału kluczowych taksonów i niższą gęstością mocy, co potwierdza selekcyjny wpływ elektrody na strukturę mikrobiomu anodowego.

Tabela 9 Zestawienie parametrów elektrochemicznych, bioróżnorodności oraz funkcjonalnego składu anodowych społeczności mikroorganizmów w MFC w zależności od potencjału anody.

Potencjał anody	-0,3 V	0,0 V	0,3 V
Maksymalna gęstość mocy (mW/m ²)	83,2	20,9	31,6
Średnia wartość alfa-różnorodności (Chao1)	137	111	113
Egzoelektrogeny	<i>Dechlorobacter</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Geobacter</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Sphingobium</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Mycobacterium</i>	<i>Dechlorobacter</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Dysgonomonas</i> , <i>Mycobacterium</i>	<i>Dechlorobacter</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Petrimonas</i>
Rodzaje zdolne do produkcji biosurfaktantów	<i>Pseudomonas</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Sphingobium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Mycobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i>	<i>Pseudomonas</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Rhodococcus</i>
Rodzaje zdolne do degradacji związków ropopochodnych	<i>Dechlorobacter</i> , <i>Parvibaculum</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Nitrosomonas</i> , <i>Sphingobium</i> , <i>Moheibacter</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Gordonia</i>	<i>Pseudomonas</i> , <i>Parvibaculum</i> , <i>Arenimonas</i> , <i>Moheibacter</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Rhodococcus</i>	<i>Stenotrophomonas</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Parvibaculum</i> , <i>Gordonia</i> , <i>Rhodococcus</i>

Przeprowadzone analizy wskazują, że odpowiedni dobór potencjału anody ma fundamentalne znaczenie dla optymalizacji działania MFC, szczególnie w warunkach obecności złożonych, hydrofobowych zanieczyszczeń, takich jak olej napędowy. Ujemna polaryzacja anody sprzyja tworzeniu wysoce funkcjonalnych, syntroficznych i egzoelektrogennych społeczności mikroorganizmów, co przekłada się na zwiększoną produkcję energii elektrycznej.

4.3. Biodegradacja ropy naftowej w MFC

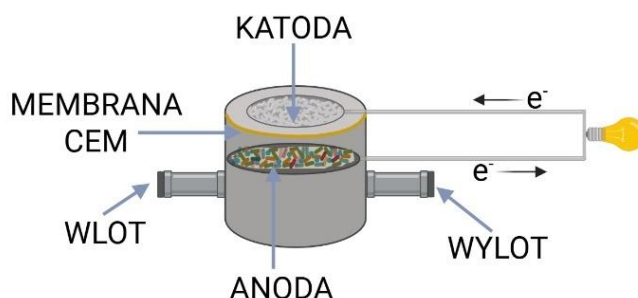
Eksperyment został przeprowadzony w ramach współpracy wewnętrznej w zespole Laboratorium Mikrobiologicznych Układów Elektrochemicznych (LMES). Analiza danych metagenomicznych została przeprowadzona podczas stażu naukowego w Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej na Uniwersytecie w Tartu w Estonii.

4.3.1. Porównanie różnych społeczności mikroorganizmów w MFC

Celem eksperymentu była ocena wpływu pochodzenia inokulum oraz zastosowania kosubstratu na wydajność mikrobiologicznych ogniw paliwowych oraz na strukturę i potencjał genetyczny anodowych społeczności drobnoustrojów zaangażowanych w biodegradację węglowodorów i przekazywanie elektronów na anodę. W pracy przedstawiono zmiany generowanej mocy w czasie oraz skład społeczności prokariotycznych rozwiniętych na anodach. Analizowano wpływ dodatku octanu sodu jako kosubstratu oraz potencjał genetyczny degradacji węglowodorów z wykorzystaniem podejścia metagenomicznego, umożliwiającego jednoczesną charakterystykę taksonomiczną i funkcjonalną badanych społeczności. W eksperymencie zastosowano inokula pochodzące z różnych środowisk naturalnych i skażonych, co pozwoliło ocenić wpływ pochodzenia mikroflory na adaptację i selekcję mikroorganizmów zdolnych do degradacji złożonych związków ropopochodnych, pozakomórkowego przekazywania elektronów oraz produkcji biosurfaktantów w warunkach pracy MFC.

4.3.1.1. Inokulacja MFC oraz przebieg eksperymentu

W eksperymencie zastosowano 18 mikrobiologicznych ogniw paliwowych w konfiguracji horyzontalnej, jednokomorowej, z katodą powietrzną (**Rysunek 27**). Układy zostały wykonane z polipropylenu metodą druku 3D, zgodnie ze specyfikacjami przedstawionymi w **Tabeli 2** w rozdziale 3.1. Objętość robocza komory anodowej wynosiła 6 cm^3 , a powierzchnia anody wynosiła 3 cm^2 .



Rysunek 27 Konstrukcja horyzontalnego, jednokomorowego MFC z katodą powietrzną zastosowanego w eksperymencie.

Do inokulacji wykorzystano próbki środowiskowe pochodzące z dziewięciu lokalizacji, których charakterystyka została przedstawiona w **Tabeli 10**. Materiał inokulacyjny

przygotowano w postaci zawiesiny i wprowadzono do komór anodowych w ilości odpowiadającej 10 % (w/v) objętości roboczej. Faza inokulacji trwała 7 dni w warunkach beztlenowych, co umożliwiło adhezję mikroorganizmów do powierzchni anody i rozpoczęcie formowania biofilmu. Początkowo w obwodzie zewnętrznym zastosowano rezystor (R_{zew}) o wartości 2 k Ω , którego wartość była później dostosowywana na podstawie wyników cyklicznych testów polaryzacyjnych. Po zakończeniu fazy inokulacji zawartość komór anodowych została zastąpiona podłożem mineralnym (MSM), zawierającym 0,5 g/L NH_4Cl (skład medium opisano szczegółowo w rozdziale 3.3.).

Tabela 10 Rodzaje, miejsce pozyskania i typ inokulatów zastosowanych w eksperymencie biodegradacji ropy naftowej.

Rodzaj próbki	Miejsce pozyskania	Typ inokulum	Numer MFC
Próbki wód ze środowisk górskich	Jezioro pokopalniane (Rudawy Janowickie, Polska)	Woda i osad	MFC 1
	Lodowiec (Engelberg, Austria)	Woda	MFC 2
	Rzeka polodowcowa (Engelberg, Austria)	Woda i osad	MFC 3
Gleby azjatyckie	Gleba tropikalna (Sri Lanka)	Gleba	MFC 4
	Wulkan błotny (Azerbejdżan)	Gleba	MFC 5
Próbki środowiskowe zanieczyszczone związkami ropopochodnymi	Kanał ściekowy w okolicy stacji paliw (Wrocław, Polska)	Gleba i osad	MFC 6
	Okolice skrzynki rozładunku paliw na stacji paliw (Wielgie, Polska)	Gleba	MFC 7
	Separator substancji ropopochodnych na stacji paliw (Wielgie, Polska)	Osad i gleba	MFC 8
	Parking miejski (Wrocław, Polska)	Gleba	MFC 9

Ogniwa podzielono na dwie serie eksperymentalne różniące się substratem:

- Seria A: mieszanina ropy naftowej (0,07 % v/v) i octanu sodu (0,1 % w/v, 7,4 mM),
- Seria B: ropa naftowa (0,07 % v/v).

Ropa naftowa zastosowana w eksperymencie pochodziła z odwiertów wykonanych w Muzeum Przemysłu Naftowego i Gazowniczego im. Ignacego Łukasiewicza w Bóbrce. Jej gęstość wynosiła 0,930 g/cm³, a analiza składu wykazała dominację węglowodorów alifatycznych (dekan, dodekan, tetradekan, heksadekan, heptadekan i ich pochodne rozgałęzione) oraz obecność związków aromatycznych (naftalen, fenantren, piren). Stwierdzono również śladowe ilości kwasów karboksylowych, takich jak kwas propionowy, piroglutaminowy i bursztynowy.

Eksperyment prowadzono w temperaturze 25 °C przez 120 dni. W tym okresie monitorowano w trybie ciągłym parametry elektrochemiczne, wykonywano okresowe

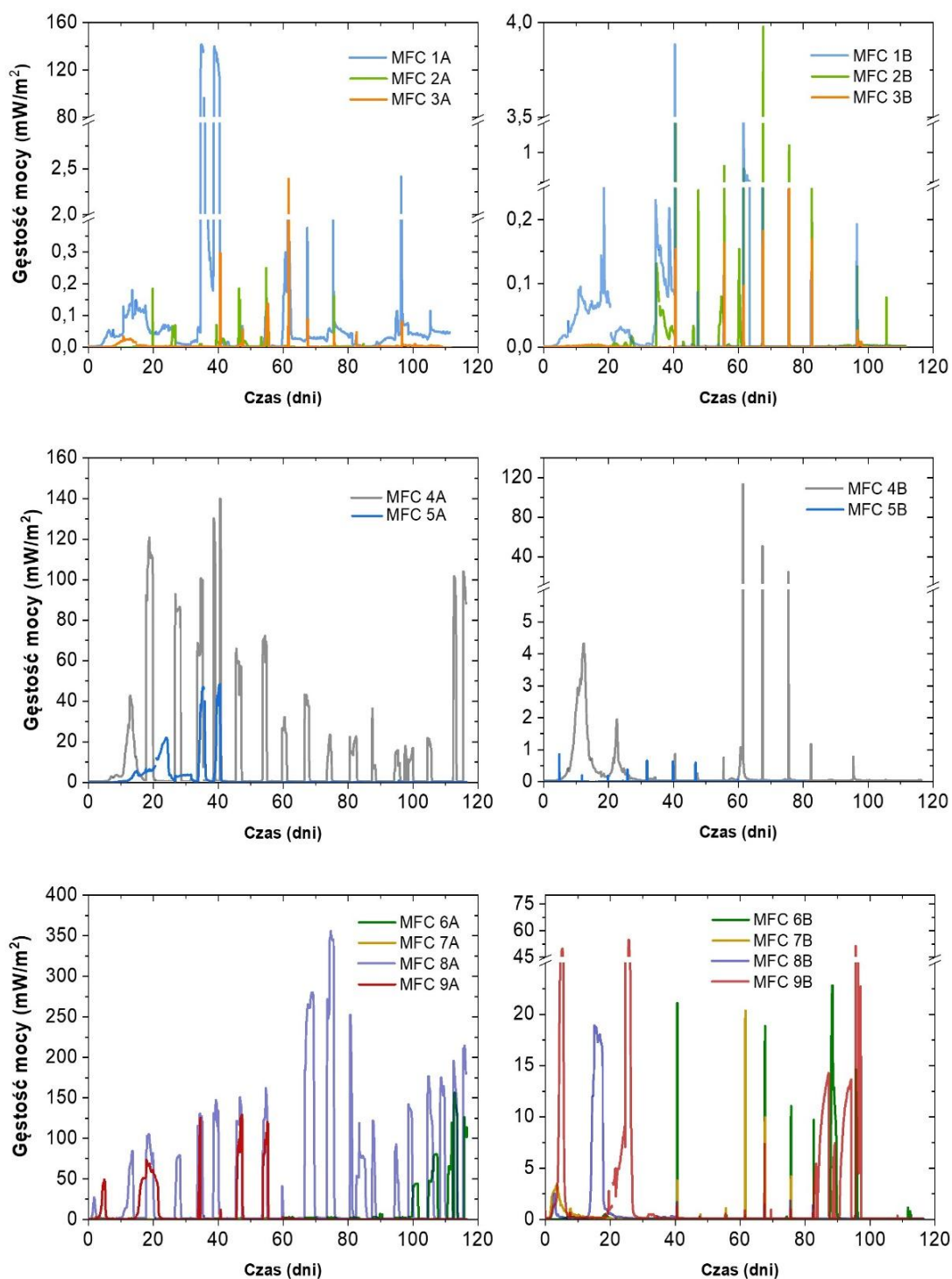
pomiary charakterystyk polaryzacyjnych metodą LSV. Próbkę anolitów do analiz metagenomicznych pobierano w fazie ustabilizowanej pracy ogniwa, po osiągnięciu maksymalnej aktywności elektrochemicznej.

4.3.1.2. Wydajność MFC

Analiza wydajności energetycznej MFC w czasie rzeczywistym

Na **Rysunku 28** przedstawiono zmiany gęstości mocy generowanej przez mikrobiologiczne ogniwa paliwowe w czasie rzeczywistym w dwóch wariantach zasilania: w serii A stosowano mieszaninę ropy naftowej i octanu sodu pełniącego rolę kosubstratu, natomiast w serii B wyłącznie ropę naftową. Pomiar prowadzono przez 120 dni, co pozwoliło ocenić dynamikę pracy układów w zależności od pochodzenia inokulum.

W przypadku próbek wód ze środowisk górskich (MFC 1-3) obserwowano zróżnicowaną reakcję na obecność kosubstratu. W MFC 1 (jezioro pokopalniane) w serii A zarejestrowano sygnał o wysokim poziomie mocy, szczególnie w początkowej fazie eksperymentu, sięgające około 140 mW/m^2 ($7,3 \text{ W/m}^3$) co było wyraźnie wyższą wartością niż w serii B, gdzie maksima wynosiły ok. $4,0 \text{ mW/m}^2$ ($0,2 \text{ W/m}^3$). W MFC 2 (lodowiec) oraz MFC 3 (rzeka polodowcowa) w obu wariantach aktywność była niska. Pojedyncze sygnały osiągały maksymalnie około 2 mW/m^2 ($0,1 \text{ W/m}^3$) dla MFC 2A i około 4 mW/m^2 ($0,2 \text{ W/m}^3$) dla MFC 2B. W MFC 3A maksymalne wartości z pomiarów rzeczywistych nie przekraczały $2,5 \text{ mW/m}^2$ ($0,13 \text{ W/m}^3$), a w przypadku MFC 3B: 1 mW/m^2 ($0,05 \text{ W/m}^3$). Wyniki te wskazują, że w MFC 1 dodatek kosubstratu w postaci octanu sodu wyraźnie zwiększył aktywność egzoelektrogeną, generując częste i gwałtowne wzrosty generowanej mocy w początkowej fazie eksperymentu. W przypadku MFC 2 i MFC 3 nie zaobserwowano takiego efektu. Aktywność pozostawała niska niezależnie od dodatku kosubstratu, co może świadczyć o ograniczonym potencjale egzoelektrogenym tych społeczności lub braku szybkiej adaptacji do warunków pracy MFC.



Rysunek 28 Wykresy przedstawiające zmiany gęstości mocy w czasie trwania eksperymentu dla ogni w zasilanych ropą naftową i octanem (seria A) oraz wyłącznie ropą naftową (seria B). Oznaczenie próbek: MFC 1 – Jezioro pokopalniane, MFC 2 – Lodowiec, MFC 3 – Rzeka polodowcowa, MFC 4 – Gleba tropikalna, MFC 5 – Wulkan błotny, MFC 6 – Kanał ściekowy w okolicy stacji paliw, MFC 7 – Okolice skrzynki rozładunku paliw na stacji paliw, MFC 8 – Separator substancji ropopochodnych na stacji paliw, MFC 9 – Parking miejski.

W grupie MFC inokulowanych materiałem z gleb azjatyckich (MFC 4-5) obecność kosubstratu wpływała na zwiększenie mocy i stabilności pracy ogniów, jednak skala tego efektu była zróżnicowana. W MFC 4 (gleba tropikalna) w serii A przez cały okres eksperymentu obserwowano liczne, wysokie sygnały sięgające do 140 mW/m^2 ($7,3 \text{ W/m}^3$) (w 40. dniu eksperymentu), a w serii B wartości maksymalne były nieco niższe, na poziomie około 120 mW/m^2 ($6,3 \text{ W/m}^3$), co wskazuje na niewielką, lecz zauważalną przewagę wariantu z kosubstratem. W MFC 5 (wulkan błotny) efekt ten był zdecydowanie bardziej wyraźny – w serii A rejestrowano sygnały do wartości 50 mW/m^2 ($2,6 \text{ W/m}^3$), natomiast w serii B aktywność była niemal zerowa, z pojedynczymi wzrostami nieprzekraczającymi 1 mW/m^2 ($0,05 \text{ W/m}^3$). Wyniki te sugerują, że w glebie z wulkanu błotnego dodatek kosubstratu silnie stymulował aktywność egzoelektrogenerną, podczas gdy w glebie tropikalnej jego wpływ był umiarkowany, choć pozytywny.

W próbkach z terenów skażonych substancjami ropopochodnymi (MFC 6-9) wpływ kosubstratu na wydajność ogniów był wyraźny w większości przypadków, choć niejednorodny. W MFC 6 (kanał ściekowy stacji paliw) w serii A po 100. dniu zaobserwowano wyraźny wzrost generowanej gęstości mocy. Maksymalne wartości sięgały 120 mW/m^2 ($6,3 \text{ W/m}^3$) podczas gdy w serii B nie przekraczały 25 mW/m^2 ($1,3 \text{ W/m}^3$). Świadczy to o silnym działaniu stymulującym kosubstratu. Odmienne efekty uzyskano w MFC 7 (okolice skrzynki rozładunku paliw). Nieznacznie wyższe sygnały gęstości mocy wystąpiły tam w serii B ($\sim 20 \text{ mW/m}^2$) niż w serii A ($\sim 10 \text{ mW/m}^2$), co może wynikać z lepszej adaptacji mikroflory do wykorzystania wyłącznie ropy naftowej. W MFC 8 (separator substancji ropopochodnych) w serii A rejestrowano sygnały o wysokim poziomie mocy, przekraczające 350 mW/m^2 ($18,3 \text{ W/m}^3$) pojawiające się z dużą częstotliwością. Było to ogniwo o najwyższej stabilności w całym eksperymencie, a maksymalną moc odnotowano około 75. dnia. W serii B wartości maksymalne wynosiły jedynie około 33 mW/m^2 ($1,7 \text{ W/m}^3$) co potwierdza silny wpływ kosubstratu. W MFC 9 (parking miejski) w serii A wartości gęstości mocy zarejestrowano na poziomie około 120 mW/m^2 ($6,3 \text{ W/m}^3$) wykazując tendencję wzrostową aż do 60. dnia eksperymentu. Po tym czasie nie pojawiały się już kolejne wzrosty. W serii B wartości nie przekraczały 60 mW/m^2 ($3,1 \text{ W/m}^3$). Wyniki pokazują, że w większości środowisk skażonych ropopochodnymi obecność kosubstratu wyraźnie zwiększała moc i dynamikę pracy MFC. Wyjątek stanowił układ, w których mikroflora była wyspecjalizowana w metabolizowaniu ropy naftowej jako jedyne źródła węgla, jak w przypadku MFC 7.

Dopełnieniem powyższej analizy jest zestawienie maksymalnych gęstości mocy uzyskanych w obu seriach badawczych (**Tabela 11**). Wyniki jednoznacznie potwierdzają kluczową rolę octanu sodu jako kosubstratu. Średnia gęstość mocy objętościowej dla wszystkich układów w serii A (z kosubstratem) wyniosła $5,5 \text{ W/m}^3$, co stanowi niemal czterokrotny wzrost wydajności w porównaniu do serii B (sama ropa), gdzie średnia osiągnęła poziom $1,5 \text{ W/m}^3$.

Tabela 11 Porównanie maksymalnych wartości gęstości mocy generowanych przez ogniwa MFC1-9 dla serii A i B.

Układ	Inokulum	Maksymalna gęstość mocy				Stosunek serii A/B (dla mW/m ²)
		(mW/m ²)		(W/m ³)		
		Seria A	Seria B	Seria A	Seria B	
MFC 1	Jezioro pokopalniane	140	4,0	7,3	0,2	35,0
MFC 2	Lodowiec	2	4	0,1	0,2	0,5
MFC 3	Rzeka polodowcowa	2,5	1	0,13	0,05	2,5
MFC 4	Gleba tropikalna	140	120	7,3	6,3	1,2
MFC 5	Wulkan błotny	50	1	2,6	0,05	50,0
MFC 6	Kanał ściekowy w okolicy stacji paliw	120	25	6,3	1,3	4,8
MFC 7	Okolice skrzynki rozładunku paliw na stacji paliw	10	20	0,5	1,1	0,5
MFC 8	Separator substancji ropopochodnych na stacji paliw	350	33	18,3	1,7	10,6
MFC 9	Parking miejski	120	60	6,3	3,1	2,0
	średnia	104,9	27,6	5,5	1,5	3,8

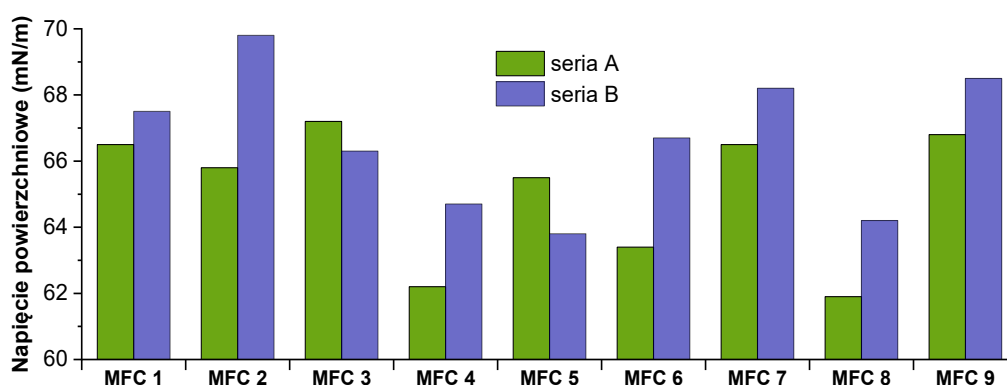
Analiza poszczególnych układów wykazała, że najwyższą sprawnością energetyczną charakteryzował się układ MFC 8 (separator substancji ropopochodnych), osiągając maksymalną gęstość mocy na poziomie 18,3 W/m³. Tak wysoki wynik, w połączeniu z długim czasem trwania cyklu generowania mocy, wskazuje na dobrą adaptację mikroorganizmów zasiedlających anodę do efektywnego przetwarzania węglowodorów w obecności kosubstratu. Silną reakcję na dodatek octanu zaobserwowano również w MFC 1 (jezioro pokopalniane) oraz MFC 5 (wulkan błotny), gdzie usunięcie kosubstratu skutkowało drastycznym spadkiem mocy (odpowiednio 35- i 50-krotnym). W tych przypadkach octan pełnił funkcję niezbędnego donora elektronów.

Wyjątek od powyższej reguły stanowiły układy MFC 2 (lodowiec) oraz MFC 7 (skrzynka rozładunku), w których odnotowano wyższą wydajność w Serii B (stosunek A/B na poziomie 0,5). Sugeruje to, że w tych specyficznych środowiskach dominują mikroorganizmy, dla których ropa naftowa jest wystarczającym źródłem energii. Na uwagę zasługuje również MFC 4 (gleba tropikalna), który jako jedyny wykazał dużą stabilność energetyczną niezależnie od składu pożywki (spadek mocy o zaledwie 17 % w serii bez kosubstratu), co świadczy o wysokiej odporności jego mikroflory na deficyt łatwo przyswajalnych substancji odżywczych.

Analiza spadków napięcia powierzchniowego

W trakcie trwania eksperymentu okresowo monitorowano napięcie powierzchniowe anolitów. Na **Rysunku 29** przedstawiono najniższe wartości tego parametru uzyskane dla serii A oraz serii B. W siedmiu z dziesięciu przypadków odnotowano niższe wartości napięcia powierzchniowego w obecności kosubstratu. Najniższe wartości zaobserwowano dla MFC 8 (61,7 mN/m), MFC 4 (62,1 mN/m) oraz MFC 6 (63,0 mN/m).

Spadek napięcia powierzchniowego anolitów, obserwowany po wymianie medium i dodaniu nowych substratów, można wiązać z biosyntezą związków powierzchniowo czynnych w odpowiedzi na obecność hydrofobowego substratu. Produkcja biosurfaktantów sprzyja solubilizacji takich związków, zwiększając ich biodostępność dla mikroorganizmów [225]. Najniższe wartości napięcia powierzchniowego były związane z fazami wzrostu generowanej mocy, co wskazuje na dodatnią zależność pomiędzy syntezą biosurfaktantów a wydajnością elektrochemiczną układów. Obecność związków powierzchniowo czynnych potwierdzono dodatkowo w testach emulsyfikacji.



Rysunek 29 Wykres prezentujący minimalne wartości napięcia powierzchniowego anolitów z serii A i B, zarejestrowane w trakcie całego przebiegu eksperymentu. Oznaczenie próbek: MFC 1 – Jezioro pokopalniane, MFC 2 – Lodowiec, MFC 3 – Rzeka polodowcowa, MFC 4 – Gleba tropikalna, MFC 5 – Wulkan błotny, MFC 6 – Kanał ściekowy w okolicy stacji paliw, MFC 7 – Okolice skrzynki rozładunku paliw na stacji paliw, MFC 8 – Separator substancji ropopochodnych na stacji paliw, MFC 9 – Parking miejski.

4.3.1.3. Analiza struktury i aktywności społeczności mikrobiologicznych

Analiza metagenomiczna została przeprowadzona na próbkach anolitów pobranych po zakończeniu cyklu, w którym zarejestrowano najwyższą gęstość mocy w trakcie całego eksperymentu. Wykorzystano sekwencjonowanie całego genomu metodą shotgun NGS, co pozwoliło na szczegółowe określenie składu taksonomicznego społeczności mikroorganizmów. Dla ogniw MFC 1-8 analizie poddano próbki z serii A, suplementowanej ropą naftową oraz octanem sodu. Natomiast dla MFC 9 z obu wariantów: A i B (tylko ropa naftowa). Taki dobór materiału umożliwił określenie struktury oraz funkcjonalności społeczności drobnoustrojów w fazie maksymalnej aktywności elektrochemicznej, kiedy biofilm anodowy był najbardziej rozwinięty

i stabilny. Pozwoliło to uchwycić moment, w którym współpraca mikroorganizmów w procesach utleniania substratów i przekazywania elektronów na anodę osiągała najwyższą efektywność.

Struktura archeonów w społecznościach anodowych

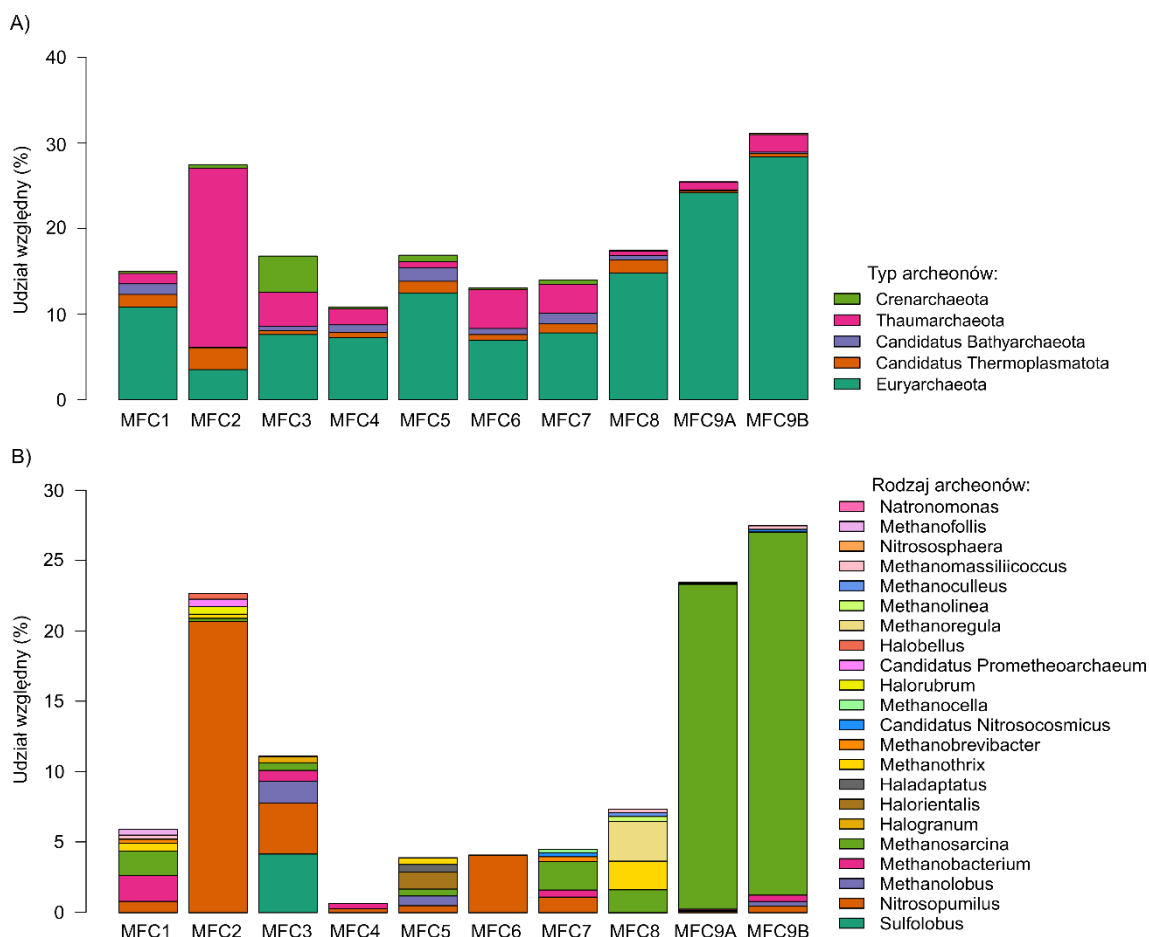
Rysunek 30 przedstawia względny udział procentowy typów oraz rodzajów archeonów w społecznościach anodowych ogni. Procenty te obliczono względem całkowitej liczby archeonów w danej próbce, co umożliwia porównanie ich struktury między próbkami. Należy jednak podkreślić, że całkowity udział archeonów w społeczności mikroorganizmów zasiedlających anodę był niewielki i wahał się od zaledwie 0,003 % w MFC 2 (lodowiec) do 1,60 % w MFC 8 (separator substancji ropopochodnych) (**Tabela 12**), przy czym we wszystkich próbkach dominowały bakterie (57,13 – 92,81 %). Oznacza to, że nawet dominujące typy lub rodzaje w obrębie archeonów stanowiły jedynie ułamek procenta całej społeczności. Z tego względu ich bezpośredni wkład w generowanie prądu w MFC mógł być ograniczony, jednak potencjalny wpływ pośredni, poprzez udział w degradacji substratów oraz interakcje syntroficzne z egzoelektrogenami, pozostają istotne dla interpretacji funkcjonowania biofilmu.

Tabela 12 Udział względny bakterii i archeonów (%) w społecznościach anodowych poszczególnych ogni MFC, obliczony względem wszystkich odczytów w próbce. Oznaczenie próbek: MFC 1 – Jezioro pokopalniane, MFC 2 – Lodowiec, MFC 3 – Rzeka polodowcowa, MFC 4 – Gleba tropikalna, MFC 5 – Wulkan błotny, MFC 6 – Kanał ściekowy w okolicy stacji paliw, MFC 7 – Okolice skrzynki rozładunku paliw na stacji paliw, MFC 8 – Separator substancji ropopochodnych na stacji paliw, MFC 9 – Parking miejski.

Nr MFC	Bakterie (%)	Archeony (%)
MFC 1	90,26	0,006
MFC 2	92,81	0,003
MFC 3	90,47	0,006
MFC 4	73,51	0,138
MFC 5	81,00	0,108
MFC 6	75,34	0,047
MFC 7	80,40	0,092
MFC 8	57,13	1,60
MFC 9A	78,49	1,14
MFC 9B	79,72	0,199

Na poziomie typu (**Rysunek 30A**), społeczności archeonów we wszystkich próbkach zdominowane były przez przedstawicieli typu *Euryarchaeota*. Najwyższy ich udział odnotowano w MFC 9B (28,4 % względem społeczności archeonów; 0,056 % względem wszystkich odczytów próbki), MFC 9A (24,2 %; 0,276 %) oraz MFC 8 (14,8 %; 0,237 %). W MFC 8 (separator substancji ropopochodnych, seria A) ich obecność współwystępowała z rekordową generacją mocy, co może sugerować korzystne interakcje syntroficzne metanogenów z egzoelektrogenami. Typ *Thaumarchaeota* dominował w MFC 2 (20,9 %; 0,006 %), jednak nie przekładało się to na wysoką wydajność elektrochemiczną, co może wynikać z ich autotroficznego metabolizmu niezwiązanego z transferem elektronów.

Na poziomie rodzaju (**Rysunek 30B**) różnice między próbkami są wyraźne, a ich skład jest silnie związany z charakterem środowiska, z którego pochodził inokulum. Podobne warunki fizykochemiczne źródłowych ekosystemów sprzyjały formowaniu się zbliżonych zespołów dominujących archeonów w biofilmach anodowych. Najwyższy udział w społecznościach archeonów odnotowano dla rodzaju *Methanosarcina*, który osiągnął maksymalne wartości w MFC 9B (25,8 % względem archeonów; 0,051 % względem całej społeczności) oraz MFC 9A (23,1 %; 0,26 %). Gatunki tego rodzaju należą do wszechstronnych metanogenów zdolnych do metanogenezy acetoklastycznej, wodorowej oraz metylotrofowej, a także do bezpośredniego międzygatunkowego transferu elektronów (DIET) [226]. W MFC 8 udział *Methanosarcina* wynosił 1,6 % względem archeonów (0,026 % całej społeczności), co może wskazywać na udział w interakcjach syntroficznych z egzoelektrogenami.



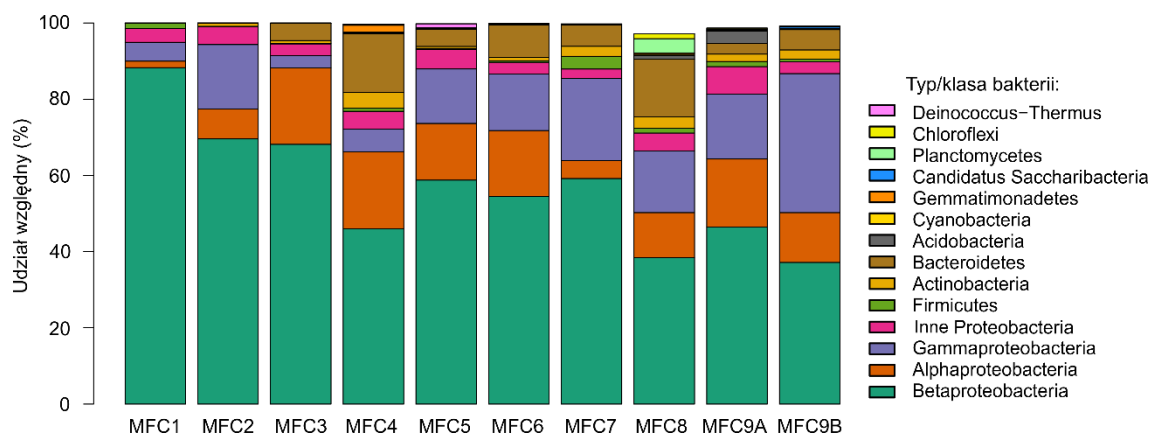
Rysunek 30 Analiza struktury społeczności mikroorganizmów przedstawiająca względny udział procentowy: A) trzech najliczniejszych typów archeonów oraz B) sześciu najliczniejszych rodzajów archeonów, w społecznościach anodowych uczestniczących w degradacji ropy naftowej i octanu. Oznaczenie próbek: MFC 1 – Jezioro pokopalniane, MFC 2 – Lodowiec, MFC 3 – Rzeka polodowcowa, MFC 4 – Gleba tropikalna, MFC 5 – Wulkan błotny, MFC 6 – Kanał ściekowy w okolicy stacji paliw, MFC 7 – Okolice skrzynki rozładunku paliw na stacji paliw, MFC 8 – Separator substancji ropopochodnych na stacji paliw, MFC 9 – Parking miejski.

W próbkach odnotowano również niewielki udział amonooksydacyjnych archeonów z rodzaju *Nitrosopumilus* [227], występujących w MFC 2 (20,7 %; 0,006 % względem całej społeczności mikroorganizmów), MFC 3 (3,7 %; 0,002 %) oraz MFC 6 (4,1 %; 0,002 %). Ich rola w funkcjonowaniu MFC jest prawdopodobnie marginalna i ogranicza się głównie do udziału w obiegu azotu, bez bezpośredniego wpływu na elektrogenność biofilmu. Z kolei rodzaj *Methanothrix* to wyspecjalizowany metanogen acetoklastyczny zdolny do DIET [228]. Zidentyfikowano go w MFC 8 (2,0 %; 0,033 %). Jego obecność w społeczności mikroorganizmów anodowych mogła prowadzić do konkurencji o elektrony z egzoelektrogenami, skutkując przekierowaniem strumienia elektronów z anody w kierunku metanogenezy. W konsekwencji udział *Methanothrix* mógł potencjalnie ograniczać efektywność bioelektrochemicznych procesów anodowych. *Methanoregula* występowała w istotnych ilościach jedynie w MFC 8 (2,8 %; 0,045 %).

Pozostałe rodzaje archeonów odnotowane w próbkach występowały w udziałach poniżej 0,01 % względem całej społeczności mikroorganizmów, co wskazuje na ich marginalne znaczenie ilościowe w strukturze biofilmu anodowego. Należy jednak podkreślić, że mimo iż całkowity udział archeonów w MFC 8, inokulowanym osadem z separatora substancji ropopochodnych, był najwyższy spośród wszystkich badanych układów, wynosił on jedynie 1,6 % całej społeczności mikroorganizmów. Tak niski udział archeonów nie stanowił czynnika ograniczającego funkcjonowanie układu, co potwierdza fakt, że MFC 8 osiągnął najwyższą wydajność elektrochemiczną w kontekście generowanej energii elektrycznej.

Struktura społeczności bakterii oraz ich aktywność w społecznościach anodowych

Na poziomie typu (**Rysunek 31**) społeczności bakteryjne we wszystkich próbkach były zdominowane przez *Proteobacteria*, głównie przedstawiciele klasy *Betaproteobacteria*, których udział wahał się od 37,2 % w MFC 9B do 88,3 % w MFC 1.



Rysunek 31 Analiza struktury społeczności mikroorganizmów przedstawiająca względny udział procentowy pięciu najliczniejszych typów bakterii (oraz klas w przypadku typu *Proteobacteria*) w społecznościach anodowych uczestniczących w biodegradacji ropy naftowej i octanu. Oznaczenie próbek: MFC 1 – Jezioro pokopalniane, MFC 2 – Lodowiec, MFC 3 – Rzeka polodowcowa, MFC 4 – Gleba tropikalna, MFC 5 – Wulkan błotny, MFC 6 – Kanał ściekowy w okolicy stacji paliw, MFC 7 – Okolice skrzynki rozładunku paliw na stacji paliw, MFC 8 – Separator substancji ropopochodnych na stacji paliw, MFC 9 – Parking miejski.

W próbkach pochodzących ze środowisk górskich (MFC 1-3) udział *Betaproteobacteria* był wysoki i wynosił 68,1 - 88,3 %. W MFC 1 dominowały one jednoznacznie (88,3 %), natomiast w MFC 2 i MFC 3 ich udział był niższy (69,6 % i 68,1 %) przy jednoczesnym wyraźnym wzroście klasy *Alphaproteobacteria* (7,93 % i 20,10 %). W MFC 2 dodatkowo odnotowano stosunkowo wysoki udział *Gammaproteobacteria* (16,8 %), a w MFC 3 typu *Bacteroidetes* (4,6 %).

Próbki glebowe z Azji (MFC 4, MFC 5) charakteryzowały się większym zróżnicowaniem taksonomicznym niż próbki górskie. Udział *Betaproteobacteria* wynosił 46,0 % w MFC 4 oraz 58,8 % w MFC 5, natomiast *Alphaproteobacteria* 20,3 % i 14,9 %. W obu próbkach obecne były *Gammaproteobacteria* (5,9 % w MFC 4 i 14,3 % w MFC 5), a także znaczący udział bakterii typu *Bacteroidetes* (15,4 % w MFC 4 i 4,6 % w MFC 5). W MFC 4 dodatkowo stwierdzono obecność *Actinobacteria* (4,2 %).

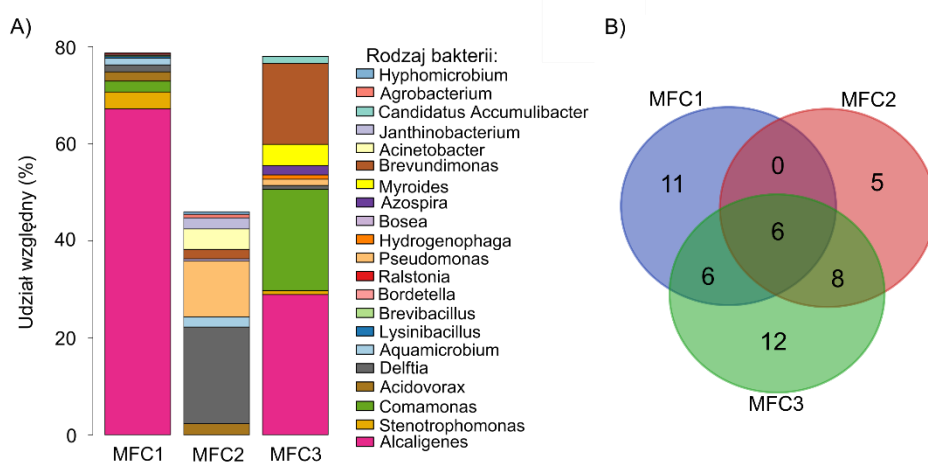
W próbkach środowisk zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi (MFC 6-9) odnotowano dominujący udział *Betaproteobacteria*, którego wartość wahała się od 37,2 % (MFC 9B) do 59,2 % (MFC 7). Istotny udział w strukturze mikrobiomu wykazywały również inne grupy *Proteobacteria*, w tym *Alphaproteobacteria* (4,8 - 17,9 %) oraz *Gammaproteobacteria* (14,8 - 36,5 %), natomiast pozostałe klasy tego typu osiągały wartości od 2,4 do 7,2 %. W analizowanych próbkach istotną rolę odgrywały także inne typy bakterii. Udział *Bacteroidetes* wynosił od 2,8 % (MFC 9A) do 15,1 % (MFC 8), *Actinobacteria* od 0,82 % (MFC 6) do 3,06 % (MFC 8), natomiast *Firmicutes* od 0,43 % (MFC 6) do 3,3 % (MFC 7). *Acidobacteria* były obecne w zakresie od 0,04 % (MFC 7) do 3,3 % (MFC 9A). Pozostałe grupy taksonomiczne, takie jak *Cyanobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Candidatus Saccharibacteria*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi* oraz *Deinococcus-Thermus*, występowały w niższych udziałach (< 4 %), przy czym wyróżniała się próbka MFC 8, w której stwierdzono wyraźnie podwyższony udział *Planctomycetes* (3,7 %) oraz *Chloroflexi* (1,3 %).

Próbki wód ze środowisk górskich

Na **Rysunku 32A** przedstawiono względny udział procentowy dominujących rodzajów bakterii w społecznościach anodowych MFC inokulowanych próbkami wód pochodzących ze środowisk górskich. W przypadku MFC 1, zainokulowanego próbką wody i osadu z jeziora pokopalnianego, społeczność anodowa charakteryzowała się dosyć niską bioróżnorodnością. Wyraźna dominacja rodzaju *Alcaligenes* (67,2 %) wskazuje na kluczową rolę tego taksonu w funkcjonowaniu biofilmu anodowego. Pozostałe rodzaje, takie jak *Stenotrophomonas* (3,5 %), *Comamonas* (2,3 %), *Acidovorax* (1,9 %), *Delftia* (1,4 %) czy *Aquamicrobium* (1,4 %), występowały w znacznie mniejszych udziałach i prawdopodobnie pełniły funkcje wspomagające, m.in. poprzez zwiększanie biodostępności substratów lub stabilizację struktury biofilmu. Pomimo uproszczonej struktury taksonomicznej, nie zaobserwowano ograniczenia funkcjonalności układu. W wariacie z kosubstratem gęstość mocy wzrosła do 140 mW/m². Na podstawie dostępnych danych literaturowych dotyczących rodzaju *Alcaligenes* można przypuszczać, że obserwowana aktywność elektrochemiczna była

związana głównie z pośrednim zewnątrzkomórkowym transferem elektronów, zachodzącym z udziałem mediatorów redoks, takich jak związki siarki, chinony lub produkty metabolizmu azotowego [229]. Ponadto przedstawiciele rodzaju *Alcaligenes*, takie jak *A. aquatilis*, wykazują zdolność do degradacji różnych węglowodorów i produkcji biosurfaktantów, co dodatkowo wspiera ich funkcjonalną rolę w anodowych społecznościach mikroorganizmów [230].

W MFC 2, którego inokulum pochodziło z wód lodowcowych, skład społeczności był bardziej zróżnicowany. Najliczniej reprezentowane były *Delftia* (19,9 %) i *Pseudomonas* (11,5 %), a ponadto występowały *Acinetobacter* (4,2 %), *Janthinobacterium* (2,3 %) i *Acidovorax* (2,3 %) oraz *Aquamicrobium* (2,1 %). Struktura ta sugeruje potencjał degradacyjny wobec związków ropopochodnych, jednak nie przełożyła się na wysoką aktywność egzoelektrogeną. Maksymalne wartości mocy nie przekraczały 2 mW/m², co wskazuje, że brakowało tu skutecznych mechanizmów przenoszenia elektronów. Mimo że *Pseudomonas* może syntetyzować fenazyny pełniące rolę mediatorów EET, warunki środowiskowe prawdopodobnie nie sprzyjały ich aktywnej produkcji. Z dużym prawdopodobieństwem elektrony uwalniane w procesach katabolicznych były kierowane głównie do wewnętrznych szlaków oddechowych, a nie na anodę. Wynik ten sugeruje, że mimo zdolności do degradacji węglowodorów i możliwej roli egzoelektrogennej, obecność takich mikroorganizmów jak *Delftia* [231] i *Pseudomonas* nie przekłada się na wysoką aktywność egzoelektrogeną społeczności.



Rysunek 32 A) Analiza struktury społeczności mikroorganizmów środowisk górskich przedstawiająca względny udział procentowy najliczniejszych dziesięciu rodzajów bakterii w społecznościach anodowych odpowiedzialnych za degradację ropy naftowej i octanu. B) Diagram Venna przedstawiający porównanie składu taksonomicznego (poziom rodzaju) społeczności mikroorganizmów pomiędzy poszczególnymi próbkami, przy uwzględnieniu tylko taksonów o względnym udziale >0,05 %. Oznaczenie próbek: MFC 1 – Jezioro pokopalniane, MFC 2 – Lodowiec, MFC 3 – Rzeka polodowcowa.

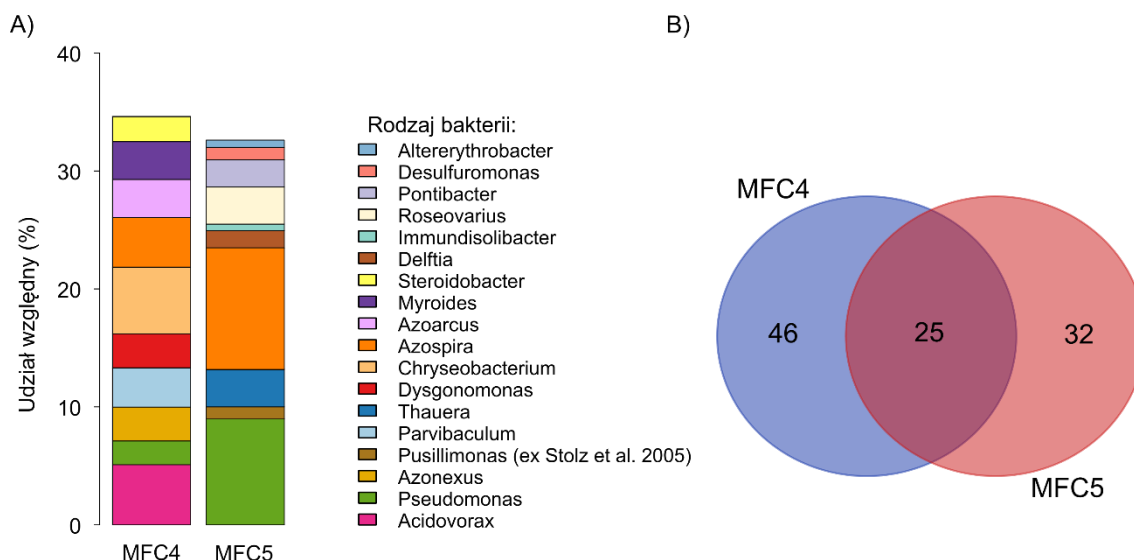
Spółeczność w MFC 3, zainokulowanym wodą i osadem z rzeki polodowcowej, była bardziej zrównoważona, z dominacją trzech rodzajów bakterii: *Alcaligenes* (28,9 %), *Comamonas* (20,9 %) i *Brevundimonas* (16,7%). Występowały również *Myroides* (4,4 %), *Azospira* (1,9 %) oraz *Pseudomonas* (1,3 %). Taki skład sugerował potencjalną synergii w degradacji ropy i octanu oraz udział mikroorganizmów związanych z cyklem

azotowym. Jednak moc generowana w tym układzie nie przekraczała 2,5 mW/m². Obecność denitryfikatorów, takich jak *Azospira*, mogła sprzyjać kierowaniu elektronów do alternatywnych akceptorów, co zmniejszało efektywność przekazywania ich do elektrody [232]. W rezultacie, mimo szerokiego spektrum degraderów węglowodorów, układ nie wykazywał wysokiej aktywności elektrochemicznej.

Interpretację tych wyników wspiera analiza diagramu Venna (**Rysunek 32B**), która pokazała, że próbki MFC 1-3 dzieliły jedynie sześć wspólnych rodzajów bakterii: *Comamonas*, *Acidovorax*, *Delftia*, *Aquamicrobium*, *Burkholderia* oraz *Pseudomonas*. Natomiast liczba taksonów unikalnych była stosunkowo niska (11 w MFC1, 5 w MFC 2 i 12 w MFC3). Wskazuje to, że społeczności górskie posiadały ograniczony rdzeń mikrobiologiczny i stosunkowo prostą strukturę, co odzwierciedla warunki oligotroficzne ich środowisk źródłowych.

Gleby azjatyckie

W przypadku MFC 4, zainokulowanego glebą tropikalną ze Sri Lanki, społeczność anodowa charakteryzowała się stosunkowo wysoką różnorodnością (**Rysunek 33A**). Najwyższy udział miały bakterie z rodzaju *Chryseobacterium* (5,7 %), *Acidovorax* (5,1 %) oraz *Azospira* (4,2 %), a także *Parvibaculum* (3,3 %), *Azoarcus* (3,2 %), *Myroides* (3,2 %) i *Dysgonomonas* (2,9 %) i *Pseudomonas* (2,0 %). W społeczności obecny był również *Geobacter* (0,5 %), klasyczny egzoelektrogen, zdolny do bezpośredniego transferu elektronów. Taksony dominujące są znane z udziału w degradacji związków ropopochodnych oraz procesach denitryfikacyjnych, co wskazuje, że konsorcjum było dobrze przystosowane do rozkładu złożonych związków organicznych obecnych w ropie naftowej. Mechanizm transferu elektronów w tym układzie prawdopodobnie miał charakter pośredni i opierał się na współdziałaniu kilku grup metabolicznych, przy czym obecność bakterii z rodzaju *Geobacter* mogła dodatkowo wspierać przewodnictwo elektronów poprzez bezpośredni kontakt z anodą. Bakterie denitryfikacyjne (*Acidovorax*, *Azospira*, *Azoarcus*) pełniły rolę akceptorów elektronów, podczas gdy mikroorganizmy fermentacyjne i degradujące polimery (*Dysgonomonas*, *Myroides*, *Parvibaculum*) dostarczały substratów wtórnych sprzyjających powstawaniu aktywnego biofilmu. Wariant z kosubstratem cechował się licznymi i stabilnymi wzrostami mocy, które w fazie największej aktywności osiągały 140 mW/m². Wynika to prawdopodobnie z faktu, że obecność łatwo dostępnego źródła węgla (octanu) stymulowała aktywność metaboliczną dominujących szczepów degradacyjnych i sprzyjała efektywnemu przepływowi elektronów [233].



Rysunek 33 A) Analiza struktury społeczności mikroorganizmów pochodzących z gleb azjatyckich przedstawiająca względny udział procentowy najliczniejszych dziesięciu rodzajów bakterii w społecznościach anodowych odpowiedzialnych za degradację ropy naftowej i octanu. B) Diagram Venna przedstawiający porównanie składu taksonomicznego (poziom rodzaju) społeczności mikroorganizmów pomiędzy poszczególnymi próbkami, przy uwzględnieniu tylko taksonów o względnym udziale >0,05 %. Oznaczenie próbek: MFC 4 – Gleba tropikalna, MFC 5 – Wulkan błotny.

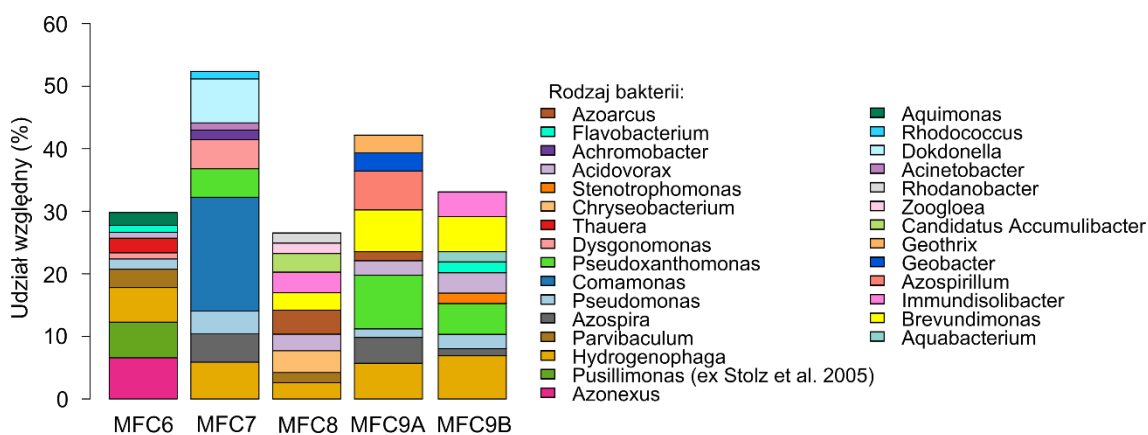
W MFC 5, którego inokulum pochodziło z wulkanu błotnego, społeczność anodowa zdominowana była przez bakterie z rodzaju *Azospira* (10,3 %) i *Pseudomonas* (9,0 %), a mniejsze, lecz istotne udziały miały także *Thauera* (3,17 %), *Roseovarius* (3,15 %), *Pontibacter* (2,3 %), *Delftia* (1,5 %) oraz egzoelektrogeny rodzaj *Desulfuromonas* (1,1 %) [234]. Skład tej społeczności wskazuje na udział mikroorganizmów zdolnych do degradacji związków aromatycznych oraz uczestniczących w przemianach cyklu azotu. Choć udział *Azospira* był znaczący, literatura sugeruje, że jego rola jako egzoelektrogena w MFC jest wciąż słabo poznana i prawdopodobnie ograniczała się do wspierania pośredniego transferu elektronów oraz procesów denitryfikacji [235]. Dodatkowo aktywność *Pseudomonas* mogła wspomagać transfer elektronów poprzez produkcję metabolitów redoks, natomiast obecność *Desulfuromonas* wskazywała na możliwość bezpośredniego transferu elektronów, realizowanego głównie za pośrednictwem cytochromów [236]. Wyniki eksperymentów potwierdziły te obserwacje. W wariancie z kosubstratem odnotowano maksymalne wartości gęstości mocy wynoszące 50 mW/m², podczas gdy w układzie bez dodatkowego źródła zdolność do generowania energii elektrycznej była znikoma. Oznacza to, że społeczność MFC 5, mimo obecności taksonów egzoelektrogennych, była silnie uzależniona od łatwo przyswajalnych substratów i wykazywała niższą stabilność elektrochemiczną w porównaniu z konsorcjum MFC 4.

Analizę tych wyników uzupełnia diagram Venna (**Rysunek 33B**), który pokazuje, że społeczności MFC 4 i MFC 5 dzieliły 25 wspólnych rodzajów bakterii, a jednocześnie każda z nich charakteryzowała się względnie dużą liczbą taksonów unikalnych (46 w MFC 4 i 32 w MFC 5). Wskazuje to na wysoką heterogeniczność mikroflory, wynikającą z odmiennych warunków środowiskowych. Zależność ta dobrze koresponduje z uzyskaną wydajnością. Choć oba konsorcja korzystnie reagowały

na obecność kosubstratu, społeczność MFC 4 była bardziej stabilna i efektywna elektrochemicznie, podczas gdy MFC 5 wykazywała silną zależność od obecności octanu i bez niego niemal całkowicie traciła aktywność.

Próbki środowiskowe zanieczyszczone związkami ropopochodnymi

W przypadku MFC 6, którego inokulum stanowiła próbka gleby i osadu z kanału ściekowego przy stacji paliw, społeczność anodowa cechowała się zróżnicowaną strukturą (**Rysunek 34**). Dominującymi rodzajami bakterii były: *Azonexus* (6,6 %), *Pusillimonas* (5,7 %) i *Hydrogenophaga* (5,5 %). Rodzaje te są znane z udziału w procesach denitryfikacyjnych, metabolizmu wodoru oraz biodegradacji związków organicznych, co wskazuje na zdolność konsorcjum do metabolizowania składników obecnych w środowisku skażonym ropopochodnymi. Obecność *Parvibaculum* (2,9 %), *Thauera* (2,3 %) i *Aquimonas* (2,1 %) dodatkowo potwierdza potencjał społeczności w biodegradacji związków aromatycznych i alifatycznych. Po 100. dniu eksperymentu obserwowano wyraźny wzrost aktywności elektrochemicznej ogniwa, z maksymalnymi wartościami sięgającymi 120 mW/m². Wynik ten wskazuje, że wraz z rozwojem biofilmu mikroflora zyskała zdolność do efektywnego przenoszenia elektronów, przy czym rolę w tym procesie mogły odgrywać egzoelektrogenne przedstawiciele rodzaju *Azonexus* [197]. Pozostałe dominujące rodzaje mogłyby wspierać konsorcjum poprzez degradację złożonych związków organicznych i dostarczanie substratów dla mikroorganizmów egzoelektrogennych.



Rysunek 34 Analiza struktury społeczności mikroorganizmów przedstawiająca względny udział procentowy najliczniejszych dziesięciu rodzajów poszczególnych rodzajów bakterii w społecznościach anodowych odpowiedzialnych za degradację ropy naftowej i octanu: środowiska skażone związkami ropopochodnymi. Oznaczenie próbek: MFC 6 – Kanał ściekowy w okolicy stacji paliw, MFC 7 – Okolice skrzynki rozładunku paliw na stacji paliw, MFC 8 – Separator substancji ropopochodnych na stacji paliw, MFC 9 – Parking miejski.

W MFC 7, zainokulowanym glebą z okolic skrzynki rozładunku paliw, społeczność anodowa była zdominowana głównie przez rodzaj *Comamonas* (18,2 %). Inne rodzaje, o stosunkowo wysokim udziale to *Dokdonella* (7,0 %), *Hydrogenophaga* (5,9 %), *Pseudoxanthomonas* (4,5 %), *Azospira* (4,5 %), *Dysgonomonas* (4,7 %) oraz *Pseudomonas* (3,7 %). Skład ten wskazuje na obecność mikroorganizmów zdolnych do degradacji węglowodorów i związków aromatycznych oraz uczestniczących

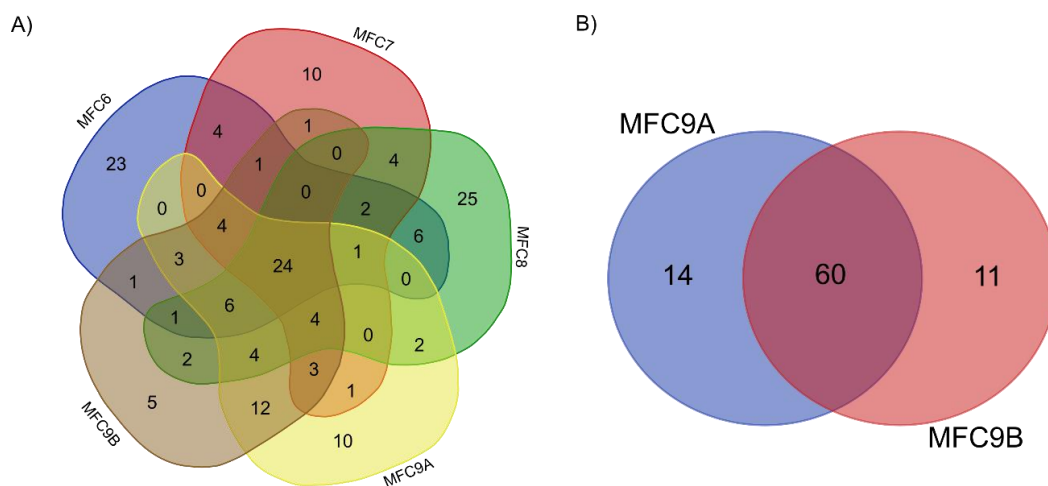
w procesach denitryfikacyjnych. *Comamonas sp.*, będący fakultatywnym beztlenowcem, był wcześniej wykrywany w anodowych biofilmach MFC i wykazywał zdolność do produkcji prądu przy użyciu octanu jako substratu [237]. Ponadto przedstawiciele rodzaju *Comamonas* wykazują zdolność do degradacji węglowodorów, zwłaszcza o charakterze aromatycznych [238]. Wariant z kosubstratem generował maksymalnie około 10 mW/m², podczas gdy w serii B wartości były wyższe i sięgały około 20 mW/m². Wyniki te wskazują, że mikroflora w warunkach obecności samej ropy była bardziej efektywna w przekazywaniu elektronów na anodę, a dodatek łatwo przyswajalnego substratu mógł modyfikować interakcje w konsorcjum i niekoniecznie zwiększać aktywność egzoelektrogeną.

Najwyższą wydajnością w całym eksperymencie charakteryzowało się ogniwo MFC 8, którego inokulum pochodziło z separatora substancji ropopochodnych. Społeczność anodowa w tym układzie była najbardziej różnorodna i obejmowała kilka rodzajów o podobnym względnym udziale w konsorcjum. Są to m.in. *Azoarcus* (3,9 %), *Chryseobacterium* (3,5 %), *Immundisolibacter* (3,3 %), *Candidatus Accumulibacter* (3,0 %), *Brevundimonas* (2,8 %) oraz *Acidovorax* (2,7 %), *Hydrogenophaga* (2,6 %), *Zoogloea* (1,7 %), *Rhodanobacter* (1,6 %), *Parvibaculum* (1,6 %) oraz *Pseudomonas* (1,4 %). Analiza składu konsorcjum sugeruje, że główne funkcje w degradacji ropy mogły pełnić *Pseudomonas*, *Parvibaculum*, *Acidovorax*, *Immundisolibacter* i *Azoarcus*, co wynika z ich zdolności do rozkładu węglowodorów alifatycznych i aromatycznych [239], [240], [241], [242]. Pozostałe rodzaje mogłyby pełnić funkcje wspomagające, m.in. poprzez stabilizację biofilmu, udział w pośrednim transferze elektronów i procesach redoks oraz wspieranie metabolizmu resztkowych związków organicznych. Taki układ zwiększa efektywność i stabilność całego systemu, zapewniając jego odporność na wahania środowiskowe. Wariant ten wykazywał wysoką i stabilną aktywność egzoelektrogeną, z licznymi pikami mocy przekraczającymi 350 mW/m², co stanowiło najwyższą wartość w eksperymencie. W tym przypadku obecność kosubstratu sprzyjała szybkiemu rozwojowi złożonego i metabolicznie zróżnicowanego konsorcjum, zapewniając stabilność układu i utrzymanie synergicznych interakcji między gatunkami.

W przypadku MFC 9A, zainokulowanego glebą z okolic parkingu miejskiego, dominowały bakterie takie jak *Pseudoxanthomonas* (8,6 %), *Brevundimonas* (6,7 %), *Azospirillum* (6,2 %), *Hydrogenophaga* (5,7 %), a także *Geobacter* (2,9 %) i *Geothrix* (2,8 %), które są kluczowymi egzoelektrogenami, odpowiedzialnymi za transfer elektronów do elektrody [101]. Wariant ten generował liczne sygnały wzrostu gęstości mocy, osiągające wartości do 120 mW/m² w pierwszych 60 dniach eksperymentu. Po tym czasie aktywność malała, co może świadczyć o zmianach w składzie i strukturze biofilmu anodowego lub o lokalnych ograniczeniach elektrochemicznych, wpływających na efektywność transferu elektronów do elektrody. Struktura konsorcjum wskazuje na obecność zarówno rodzajów degradujących węglowodory (np. *Pseudoxanthomonas*, *Brevundimonas* [243], [244]), jak i bakterii uczestniczących w formowaniu biofilmów (np. *Azospirillum*, *Hydrogenophaga* [245], [246]), co początkowo sprzyjało wysokiej aktywności elektrochemicznej.

W MFC 9B, rozwiniętym w warunkach, gdzie jedynym źródłem węgla była ropa, dominowały *Hydrogenophaga* (6,9 %), *Brevundimonas* (5,6 %) oraz *Pseudoxanthomonas* (4,9 %). W społeczności obecne były również *Immundisolibacter* (3,9 %) i *Acidovorax* (3,2 %). Szczepy tych rodzajów bakterii mogą uczestniczyć w rozkładzie bardziej złożonych frakcji ropy i wspierać stabilność biofilmu [247], [248], [249]. Znotowano także wyższy udział *Pseudomonas* (2,3 %) niż w przypadku wariantu z kosubstratem (1,4 % w MFC 9A). Może to wynikać ze zdolności tego rodzaju bakterii do degradacji trudnych, hydrofobowych składników ropy oraz produkcji biosurfaktantów, które zwiększają dostępność substratów. W warunkach braku łatwo dostępnego źródła węgla, jak octan, *Pseudomonas* i inne wyspecjalizowane bakterie zyskują przewagę. Natomiast udział egzoelektrogenów, takich jak *Geobacter* (0,1 %) i *Geothrix* (0,2 %), pozostaje minimalny. Moc generowana w MFC 9B była niższa niż w wariacie z kosubstratem (maksymalnie 60 mW/m²), lecz utrzymywała się na stabilnym poziomie przez cały okres eksperymentu, co odzwierciedla powstanie trwałego, wyspecjalizowanego konsorcjum zdolnego do metabolizowania ropy w długiej perspektywie.

Analiza społeczności bakteryjnych pochodzących ze środowisk skażonych ropopochodnymi wykazała, że cechują się one najwyższą różnorodnością spośród wszystkich badanych próbek. Diagram Venna (**Rysunek 35A**) pokazuje, że dzieliły one wspólny rdzeń obejmujący 24 rodzaje bakterii. Liczba unikalnych taksonów różniła się w zależności od badanego środowiska. Najwięcej unikalnych rodzajów odnotowano w MFC 6 i MFC 8. W przypadku MFC 8 było to związane z najwyższą gęstością produkowanej mocy. Największą liczbę wspólnych rodzajów stwierdzono natomiast w parach próbek MFC 9A i MFC 9B, co ilustruje **Rysunek 35B**. Ich mikrobiomy były bardziej podobne niż odmienne, co pozostaje zgodne z faktem, iż oba ogniwa zostały zainokulowane tym samym materiałem. Wyniki te sugerują, że środowiska zanieczyszczone węglowodorami stanowią cenny rezerwuuar mikroorganizmów o zdolnościach egzoelektrogennych oraz degradacyjnym.



Rysunek 35 A) Diagram Venna przedstawiający porównanie składu taksonomicznego (poziom rodzaju) społeczności mikroorganizmów pomiędzy poszczególnymi próbkami pochodzącymi ze środowisk skażonych związkami ropopochodnymi, przy uwzględnieniu tylko taksonów o względnym udziale >0,05 %. B) Diagram Venna przedstawiający porównanie składu taksonomicznego (poziom rodzaju) społeczności mikroorganizmów pomiędzy próbkami MFC 9A i MFC 9B, przy uwzględnieniu tylko taksonów o względnym udziale >0,05 %. Oznaczenie próbek: MFC 6 – Kanał ściekowy w okolicy stacji paliw, MFC 7 – Okolice skrzynki rozładunku paliw na stacji paliw, MFC 8 – Separator substancji ropopochodnych na stacji paliw, MFC 9 – Parking miejski.

Porównanie wszystkich środowisk

Na **Rysunku 36** przedstawiono diagram Venna, który obrazuje porównanie składu taksonomicznego społeczności mikroorganizmów na poziomie rodzaju pomiędzy badanymi grupami próbek. Chociaż społeczności anodowe MFC wykazują zróżnicowany skład, to trzy rodzaje bakterii występowały we wszystkich badanych próbkach: *Acidovorax*, *Pseudomonas* oraz *Burkholderia*. Stała obecność tych rodzajów bakterii wskazuje na ich zdolność do adaptacji do warunków bioelektrochemicznych. Rodzaj *Pseudomonas*, szeroko opisywany we wcześniejszych rozdziałach niniejszej pracy, jest znanym egzoelektrogenem, który dodatkowo jest zdolny do produkcji biosurfaktantów (ramnolipidów) oraz do degradacji związków ropopochodnych. Właściwości te sprzyjają zarówno generacji prądu, jak i zwiększaniu dostępności substratów dla pozostałych mikroorganizmów w komorze anodowej. Kolejnym taksonem jest *Burkholderia*, którego przedstawiciele wykazują zdolność do rozkładu szerokiego spektrum węglowodorów aromatycznych [250]. Podobnie jak *Pseudomonas*, wykazuje on zdolność do produkcji ramnolipidów, których obecność wpływa na zwiększoną biodostępność hydrofobowych związków dla innych mikroorganizmów [148]. Choć w literaturze dotyczącej MFC jest on rzadziej opisywany, jego obecność we wszystkich analizowanych układach wskazuje na jego istotną rolę w procesach biokonwersji zanieczyszczeń ropopochodnych w warunkach produkcji prądu. Z kolei *Acidovorax* jest denitryfikującym rodzajem bakterii, zdolnym do metabolizowania prostych związków, takich jak octan [251], [252]. Jak opisano w rozdziale 4.1.4, w układach MFC zasilanych glukozą zaobserwowano jego zwiększony udział w społeczności anodowej, natomiast w układach z benzenem nie stwierdzono jego znacznej obecności. To wskazuje na preferencje metaboliczne *Acidovorax sp.* względem prostych substratów. Pomimo tego, że ten rodzaj bakterii nie

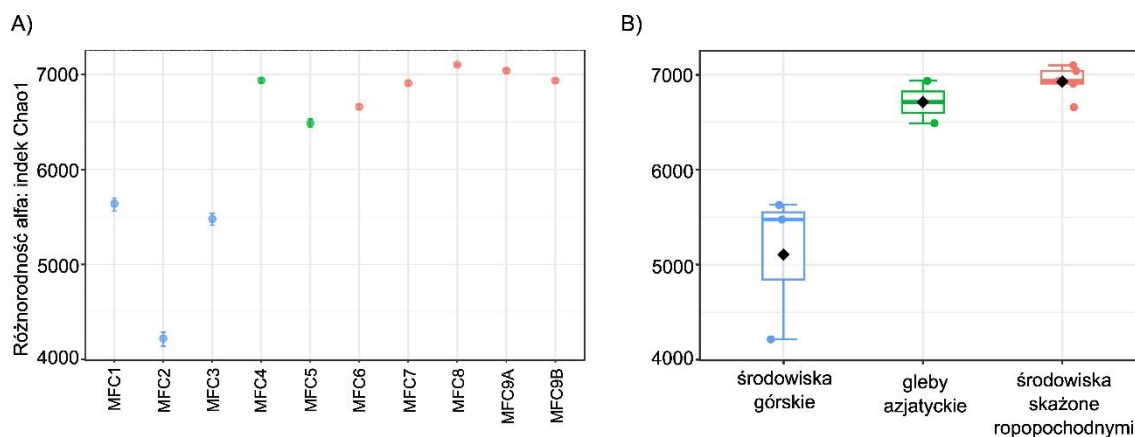
jest szeroko opisywany w literaturze dotyczącej układów bioelektrochemicznych, istnieją doniesienia literaturowe sugerujące jego potencjalny udział w transferze elektronów oraz związek jego zwiększonej obfitości z poprawą wydajności produkcji prądu [253].

Gleby azjatyckie charakteryzowały się jednym z największych bogactw unikalnych taksonów (15 rodzajów), w tym m.in. *Azoarcus* i *Thauera*, znanych ze zdolności do redukcji azotanów i tlenowej i/lub beztlenowej degradacji związków aromatycznych [254], [255]. Społeczności ze środowisk skażonych ropopochodnymi były również bogate w unikalne mikroorganizmy (15 rodzajów), wśród których dominowały bakterie związane z biodegradacją węglowodorów, takie jak *Polaromonas* i *Stenotrophomonas* [256], [257]. Z kolei środowiska górskie nie wykazywały własnych unikalnych taksonów; ich mikroflora w dużej mierze pokrywała się z mikrobiomem anod inokulowanych materiałem pochodzącym z gleb azjatyckich i środowisk skażonych. Istotne podobieństwo pomiędzy glebami azjatyckimi a środowiskami skażonymi (6 wspólnych rodzajów) sugeruje, że gleby azjatyckie mogą stanowić rezerwuar mikroorganizmów zdolnych do degradacji zanieczyszczeń. Wysoka liczebność taksonów związanych z metabolizmem węglowodorów i cyklem azotu wskazuje, że społeczności te mogą skutecznie wspierać przewodnictwo elektronowe w anodach. Wyniki pokazują również, że wybór inokulum znacząco wpływa na skład społeczności anodowych i ich potencjał bioelektrochemiczny.



Rysunek 36 Diagram Venna przedstawiający porównanie składu taksonomicznego społeczności mikroorganizmów na poziomie rodzaju pomiędzy grupami próbek. Na diagramie uwzględniono wyłącznie rodzaje bakterii wspólne dla wszystkich próbek w obrębie danej grupy (o względnym udziale > 0,05 %).

Na **Rysunku 37** przedstawiono wartości wskaźnika Chao1 opisującego bogactwo gatunkowe społeczności bakteryjnych rozwijających się na anodach. Wykres A pokazuje wartości dla poszczególnych próbek, a wykres B porównuje rozkład alfa-różnorodności w trzech grupach: środowiska górskie (MFC 1-3), gleby azjatyckie (MFC 4-5) oraz środowiska skażone węglowodorami (MFC 6-9). Analiza wariancji Welch'a (ANOVA) wykazała, że różnice między grupami są istotne statystycznie ($p = 0,002$). Społeczności ze środowisk górskich różniły się istotnie od gleb azjatyckich i środowisk skażonych. Różnice między dwiema ostatnimi grupami były mniejsze, co wskazuje na ich większe podobieństwo.



Rysunek 37 Analiza struktury społeczności mikroorganizmów przedstawiająca wykresy punktowe i pudełkowe obrazujące rozkład alfa-różnorodności (indeks Chao1) na poziomie taksonomicznym rodzaju w trzech grupach doświadczalnych: środowiska górskie, gleba azjatycka oraz środowiska skażone ropopochodnymi. Wykres A) przedstawia wartości wskaźnika Chao1 w poszczególnych próbkach; oznaczenie próbek: MFC 1 – Jezioro pokopalniane, MFC 2 – Lodowiec, MFC 3 – Rzeka polodowcowa, MFC 4 – Gleba tropikalna, MFC 5 – Wulkan błotny, MFC 6 – Kanał ściekowy w okolicy stacji paliw, MFC 7 – Okolice skrzynki rozładunku paliw na stacji paliw, MFC 8 – Separator substancji ropopochodnych na stacji paliw, MFC 9 – Parking miejski. Wykres B) ilustruje porównanie rozkładu alfa-różnorodności pomiędzy grupami. Zastosowano test Welch’a (ANOVA) z analizą porównań post-hoc w celu wykrycia istotnych różnic statystycznych. P-value:0,002, [ANOVA] F-value: 16,243.

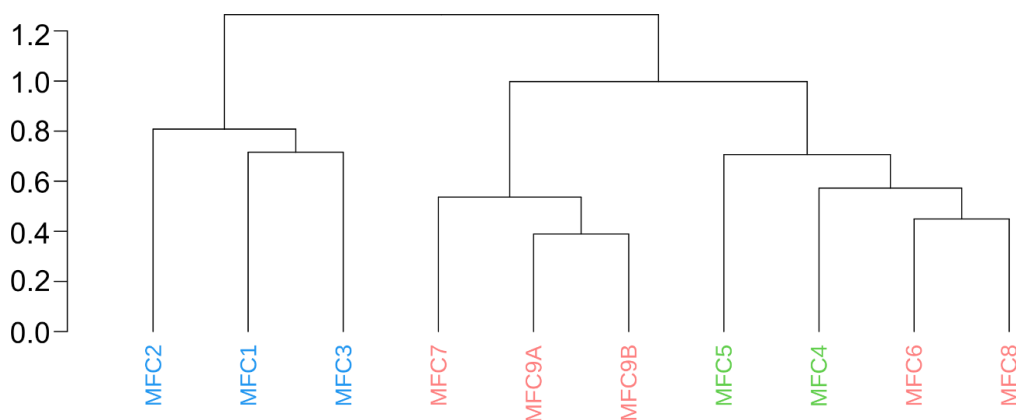
Najniższe wartości Chao1 stwierdzono w próbkach górskich. Wskazuje to na uproszczoną strukturę konsorcjów w porównaniu do innych grup badawczych. Społeczności anodowe, gdzie jako inokulaty zastosowano próbki gleb azjatyckich oraz środowiska skażone węglowodorami, charakteryzowały się wysoką różnorodnością alfa. W grupie gleb najwyższą wartość miał MFC 4, co współwystępowało ze stabilną produkcją mocy. W grupie skażonej wyróżniał się MFC 8, gdzie wysoki indeks Chao1 był związany z rekordową aktywnością elektrochemiczną zarejestrowaną dla tego eksperymentu.

Na dendrogramie przedstawionym na **Rysunku 38** przedstawiono podobieństwo taksonomiczne mikrobiomów anodowych na poziomie rodzaju. Na rysunku widoczne są dwa główne klastry. Pierwszy obejmuje próbki pochodzące ze środowisk górskich (MFC 1, MFC 2, MFC 3), które charakteryzują się wysokim podobieństwem taksonomicznym. Drugi klaster obejmuje próbki pochodzące zarówno ze środowisk skażonych związkami ropopochodnymi, jak i z gleb azjatyckich.

W obrębie drugiego klastra można wyróżnić dwa wyraźne podzbiory. Pierwszy tworzą próbki MFC 7, MFC 9A i MFC 9B. Pomimo że w próbkach MFC 9A i MFC 9B zastosowano różne substraty (odpowiednio octan oraz mieszaninę octanu i ropy naftowej), społeczności mikroorganizmów w tych układach wykazują znaczne podobieństwo taksonomiczne na poziomie rodzaju. Próbki te grupują się ze sobą bardzo blisko, co wskazuje na wysokie podobieństwo ich mikrobiomu. Drugi podzbiór tworzą próbki MFC 4, MFC 5, MFC 6 oraz MFC 8, które również wykazują wyraźne podobieństwo taksonomiczne między sobą.

Struktura społeczności mikroorganizmów w badanych MFC grupuje się przede wszystkim według pochodzenia inokulum. Środowiska górskie tworzą osobny,

jednorodny klastery, natomiast gleby azjatyckie i środowiska skażone związkami ropopochodnymi tworzą wspólny, lecz zróżnicowany wewnętrznie zbiór.



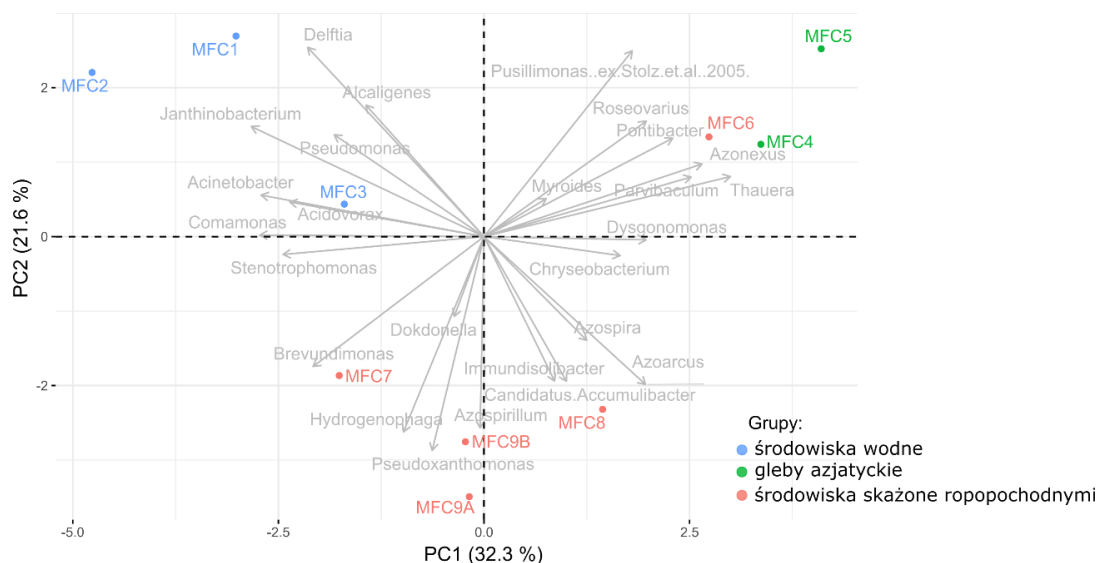
Rysunek 38 Dendrogram pokazujący podobieństwo taksonomiczne społeczności mikroorganizmów w MFC, wygenerowany na podstawie względnej liczebności taksonów na poziomie rodzaju. Do obliczenia macierzy niepodobieństwa zastosowano indeks Braya-Curtisa, a do grupowania hierarchicznego metodę Ward. Kolory oznaczają typ inokulum użytego do zaszczepiania ogni: niebieski – środowiska górskie, zielony – gleby azjatyckie, czerwony – środowiska skażone związkami ropopochodnymi. Oznaczenie próbek: MFC 1 – Jezioro pokopalniane, MFC 2 – Lodowiec, MFC 3 – Rzeka polodowcowa, MFC 4 – Gleba tropikalna, MFC 5 – Wulkan błotny, MFC 6 – Kanał ściekowy w okolicy stacji paliw, MFC 7 – Okolice skrzynki rozładunku paliw na stacji paliw, MFC 8 – Separator substancji ropopochodnych na stacji paliw, MFC 9 – Parking miejski.

Analiza głównych składowych (**Rysunek 39**) w oparciu o 10 dominujących rodzajów bakterii w każdej próbce pozwoliła na wizualizację różnic i podobieństw w składzie społeczności bakteryjnych rozwijających się na anodach badanych ogni. Dwie pierwsze składowe (PC1 i PC2) wyjaśniały łącznie 53,9 % zmienności danych, co umożliwiło rozdzielenie próbek zgodnie z ich pochodzeniem środowiskowym i dominującymi taksonami.

W lewej części wykresu znalazły się MFC 1, MFC 2 i MFC 3, reprezentujące środowiska górskie. Były one różnicowane głównie takimi rodzajami jak: *Alcaligenes*, *Janthinobacterium*, *Delftia*, *Comamonas*, *Acinetobacter* czy *Acidovorax*. Wyraźne oddzielenie tych próbek od pozostałych odzwierciedla uproszczony skład konsorcjów i dominację pojedynczych taksonów. Niska moc generowana w MFC 2 i MFC 3 oraz krótkotrwałe sygnały wzrostu gęstości mocy w MFC 1 dobrze odzwierciedlały ich niską różnorodność.

W prawej górnej części wykresu grupują się MFC 4, MFC 5 oraz MFC 6. Wskazuje to na podobieństwo dominujących rodzajów bakterii w glebie tropikalnej, glebie z wulkanu błotnego oraz w osadzie pozyskanym z kanału ściekowego stacji paliw. Społeczności te były silnie różnicowane przez taksony zdolne do denitryfikacji i degradacji związków aromatycznych, takimi jak *Azonexus* i *Thauera* [258], [259]. Bliskość MFC 6 do próbek gleb azjatyckich sugeruje, że pomimo pochodzenia ze środowiska skażonego węglowodorami, profil tego mikrobiomu był bardziej zbliżony do społeczności wywodzących się ze środowisk nieskażonych.

Dolna część wykresu obejmuje MFC 7-9, pochodzące ze środowisk skażonych ropopochodnymi. Społeczności te zawierały taksony wyspecjalizowane w degradacji węglowodorów. Społeczność anodowa MFC 7 była głównie różnicowana przez rodzaje *Brevundimonas* oraz *Dokdonella*, natomiast MFC 8 przez *Candidatus Accumulibacter* oraz *Immundisolibacter*. Największe podobieństwo w tej grupie wykazywały społeczności MFC 9A i MFC 9B, co odzwierciedla wspólne pochodzenie inokulum początkowego. Ich mikrobiomy były kształtowane głównie przez *Pseudoxanthomonas* oraz *Azospirillum*.



Rysunek 39 Wykres PCA w oparciu o dziesięć najliczniejszych rodzajów z każdej społeczności anodowej w eksperymencie. Oznaczenie próbek: MFC 1 – Jezioro pokopalniane, MFC 2 – Lodowiec, MFC 3 – Rzeka polodowcowa, MFC 4 – Gleba tropikalna, MFC 5 – Wulkan błotny, MFC 6 – Kanał ściekowy w okolicy stacji paliw, MFC 7 – Okolice skrzynki rozładunku paliw na stacji paliw, MFC 8 – Separator substancji ropopochodnych na stacji paliw, MFC 9 – Parking miejski.

Podsumowując, analiza PCA wykazała wyraźne rozdzielenie społeczności anodowych w zależności od pochodzenia inokulum, przy czym wyróżniono trzy główne grupy: próbki ze środowisk górskich (MFC 1-3), gleby azjatyckie (MFC 4-5) oraz środowiska skażone węglowodorami (MFC 7-9). Ciekawym wyjątkiem okazał się mikrobiom anodowy MFC 6 (kanał ściekowy w okolicy stacji paliw), który, mimo że pochodził ze środowiska skażonego ropopochodnymi, został zgrupowany razem z glebami azjatyckimi. Sugeruje to, że mikrobiom tego ogniwa, pod względem dominujących rodzajów bakterii, był bardziej zbliżony do społeczności środowisk górskich niż do tych rozwijających się bezpośrednio w skażonych osadach.

4.3.1.4. Identyfikacja genów związanych z degradacją węglowodorów

Na podstawie danych metagenomicznych przeprowadzono ukierunkowaną analizę funkcjonalną badanych metagenomów, skoncentrowaną na identyfikacji genów związanych z degradacją węglowodorów. W tym celu wykorzystano 59 profili HMM (ukrytych modeli Markowa), opisujących charakterystyczne wzorce sekwencji

białkowych. Zastosowane profile obejmowały cztery główne kategorie genów funkcjonalnych: (i) geny związane z degradacją związków alifatycznych, (ii) geny związane z degradacją węglowodorów monoaromatycznych, (iii) geny związane z degradacją wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA), (iv) geny związane z beztlenową degradacją węglowodorów, które zestawiono w **Tabeli 13**. Analiza wykazała obecność genów ze wszystkich wymienionych grup we wszystkich badanych metagenomach, co potwierdza szeroki potencjał metaboliczny mikroorganizmów w zakresie degradacji węglowodorów.

Tabela 13 Lista genów oraz kodowanych przez nie enzymów związanych z degradacją węglowodorów.

Oznaczenie genu	Nazwa kodowanego enzymu	Kod KEGG / Ref.	Źródło HMM
Degradacja węglowodorów alifatycznych			
almA	flawinozależna monooksygenaza	AlmA	[260]
CYP153	cytochrom P450 z rodziny CYP153, hydroksylaza alkanowa	CYP153	[261]
alkB1_2	alkano-1-monooksygenaza	K00496	KEGG
prmA	propano-2-monooksygenaza - podjednostka alfa (duża)	K18223	KEGG
prmC	propano-2-monooksygenaza - podjednostka gamma (mała)	K18224	KEGG
prmB	reduktaza propanomonooksygenazy	K18225	KEGG
prmD	białko sprzęgające propanomonooksygenazy	K18226	KEGG
ladA	długołańcuchowa alkano-monooksygenaza	K20938	KEGG
bmoX	butano-monooksygenaza - podjednostka alfa	K21317	KEGG
bmoY	butano-monooksygenaza - podjednostka beta	K21318	KEGG
bmoZ	butano-monooksygenaza - podjednostka gamma	K21319	KEGG
bmoC	reduktaza butano-monooksygenazy	K21320	KEGG
bmoB	regulator butano-monooksygenazy	K21321	KEGG
bmoD	hipotetyczne białko montażowe butano-monooksygenazy	K21322	KEGG
Degradacja węglowodorów monoaromatycznych			
todC1	dioksygenaza benzenu/toluenu/chlorobenzene - podjednostka α (alfa)	K03268	KEGG
phenol 2	fenol 2-monooksygenaza (zależna od NADPH)	K03380	KEGG
etbAa	dioksygenaza etylobenzenu - podjednostka α (alfa)	K14748	KEGG
etbAb	dioksygenaza etylobenzenu - podjednostka β (beta)	K14749	KEGG
etbAc	dioksygenaza etylobenzenu - komponent ferredoksynowy	K14750	KEGG
xylM	toluenowa metylomonooksygenaza - podjednostka katalityczna	K15757	KEGG
xylA	toluenowa metylomonooksygenaza - składnik transferu elektronów	K15758	KEGG
tmoA	toluenowa monooksygenaza – białko systemu A (katalityczna podjednostka)	K15760	KEGG

tmoB	toluenowa monoooksygenaza - białko systemu B	K15761	KEGG
tmoC	toluenowa monoooksygenaza - podjednostka ferredoksynowa	K15762	KEGG
tmoD	toluenowa monoooksygenaza - białko systemu D	K15763	KEGG
tmoE	toluenowa monoooksygenaza - białko systemu E	K15764	KEGG
tmoF	toluenowa monoooksygenaza - składnik transferu elektronów	K15765	KEGG
dmpN	fenol/toluen 2-monoooksygenaza - podjednostka duża (alfa)	K16242	KEGG
Degradacja WWA			
nidA	podjednostka duża dioksygenazy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (PAH)	K11943	KEGG
nidB	podjednostka mała dioksygenazy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (PAH)	K11944	KEGG
nahB	dehydrogenaza cis-1,2-dihydro-1,2-dihydroksynaftalenu / dihydrodiolu dibenzotiofenu	K14582	KEGG
nahC	dioksygenaza 1,2-dihydroksynaftalenowa	K14583	KEGG
dszC	monoooksygenaza dibenzotiofenu	K22219	KEGG
ndoB	podjednostka α dioksygenazy 1,2-naftalenowej / tlenaza naftalenowa	NdoB	[261]
ndoC	podjednostka β dioksygenazy 1,2-naftalenowej / tlenaza naftalenowa	NdoC	[261]
nahAb	ferredoksyna dioksygenazy 1,2-naftalenowej	K14578	KEGG
nahAc	podjednostka α dioksygenazy 1,2-naftalenowej	K14579	KEGG
nahAd	podjednostka β dioksygenazy 1,2-naftalenowej	K14580	KEGG
nahAa	reduktaza ferredoksynowa dioksygenazy 1,2-naftalenowej	K14581	KEGG
Beztlenowa degradacja węglowodorów			
nmsA	podjednostka α syntazy 2-naftylo-2-metylo-bursztynianu	K01670	KEGG
BssA	syntaza benzylobursztynianu	K07540	KEGG
AssA	podjednostka A syntazy alkilobursztynianu	AssA	[261]
ebdA	podjednostka α hydroksylazy etylobenzenu	K10700	KEGG
ebdB	podjednostka β hydroksylazy etylobenzenu	K17048	KEGG
ebdC	podjednostka γ hydroksylazy etylobenzenu	K17049	KEGG
AhyA	hydroksylaza metylenu C2 alkanu	ahyA	[261]
nmsB	podjednostka B syntazy 2-naftylo-2-metylo-bursztynianu	K15567	KEGG
nmsC	podjednostka C syntazy 2-naftylo-2-metylo-bursztynianu	K15568	KEGG
bsdC	podjednostka C dekarboksylazy 4-hydroksybenzoesanowej	K16239	KEGG
bsdC'	podjednostka C dekarboksylazy wanilinianowej/4-hydroksybenzoesanowej	K01612	KEGG
bsdD	podjednostka D dekarboksylazy wanilinianowej / 4-hydroksybenzoesanowej	K21759	KEGG

Wyniki zostały znormalizowane do jednostek RPKG (liczba odczytów przypadających na kilozasadę sekwencji z uwzględnieniem równoważnika genomowego) [171]. W analizowanych metagenomach geny związane z degradacją węglowodorów były reprezentowane we wszystkich badanych grupach funkcjonalnych (**Tabela 14**). Suma wartości RPKG dla genów degradacyjnych wahała się pomiędzy 80 a 118. Najniższą wartość odnotowano w metagenomie MFC 8 (80,09 RPKG; separator substancji ropopochodnych), natomiast najwyższą w metagenomie MFC 3 (117,47 RPKG; rzeka polodowcowa). W pozostałych metagenomach wartości mieściły się w zakresie od 93,6 (MFC 9A, gleba z parkingu miejskiego) do 110,7 RPKG (MFC 9B), co wskazuje na względnie równomierne występowanie genów degradacyjnych w badanych próbkach.

Tabela 14 Suma wartości RPKG dla poszczególnych grup genów degradacyjnych w metagenomach MFC 1 - MFC 9B. Oznaczenie próbek: MFC 1 – Jezioro pokopalniane, MFC 2 – Lodowiec, MFC 3 – Rzeka polodowcowa, MFC 4 – Gleba tropikalna, MFC 5 – Wulkan błotny, MFC 6 – Kanał ściekowy w okolicy stacji paliw, MFC 7 – Okolice skrzynki rozładunku paliw na stacji paliw, MFC 8 – Separator substancji ropopochodnych na stacji paliw, MFC 9 – Parking miejski.

Nr MFC	Węglowodory alifatyczne	Węglowodory monoaromatyczne	WWA	Degradacja beztlenowa	Suma RPKG
1	8,19	38,71	51,34	7,55	100,19
2	10,61	35,56	44,18	7,14	107,21
3	11,12	47,61	44,60	7,39	117,47
4	10,48	36,60	53,90	7,00	95,24
5	6,99	34,53	34,57	12,70	98,41
6	9,30	36,82	39,82	6,91	96,06
7	10,71	37,11	49,19	8,06	100,48
8	8,48	30,31	41,16	6,74	80,09
9A	8,02	36,61	43,04	9,16	93,61
9B	10,00	43,25	45,74	8,27	110,71

Najwyższe wartości RPKG odnotowano dla genów związanych z degradacją WWA, które dominowały we wszystkich metagenomach, osiągając maksymalnie 53,90 RPKG w metagenomie MFC 4 (gleba tropikalna), przy minimalnej wartości 34,57 dla MFC 5 (gleba z wulkanu błotnego). Drugą pod względem obfitości grupą były geny związane z degradacją węglowodorów monoaromatycznych, z wartościami w zakresie 47,61 RPKG w próbce MFC 3 (rzeka polodowcowa), przy wartości minimalnej 3,31 RPKG w próbce MFC 8 (separator substancji ropopochodnych). Niższe wartości uzyskano dla genów związanych z degradacją węglowodorów alifatycznych (6,99 - 11,12 RPKG), z maksymalną wartością w MFC 3, a najniższą w MFC 5. Geny odpowiedzialne za szlaki beztlenowe były obecne we wszystkich metagenomach, jednak charakteryzowały się niższymi wartościami (6,74 - 12,70 RPKG), z minimum w próbce MFC 8 i maksimum w próbce MFC 5. Ogółem wyniki wskazują, że największy potencjał degradacji węglowodorów dotyczył szlaków związanych z degradacją związków aromatycznych, zarówno wielopierścieniowych jak i monoaromatycznych, niezależnie od pochodzenia próbek.

Geny związane z degradacją węglowodorów alifatycznych

Analiza genów związanych z degradacją węglowodorów alifatycznych wykazała obecność 11 spośród 14 docelowych markerów funkcjonalnych (**Rysunek 40**). Łączna liczebność tej kategorii wahała się od 6,99 RPKG (MFC 5, gleba z wulkanu błotnego) do 11,12 RPKG (MFC 3, rzeka polodowcowa).

Najliczniej reprezentowanym genem we wszystkich metagenomach był *ladA*, kodujący monooksygenazę alkanową odpowiedzialną za inicjację degradacji alkanów długołańcuchowych (C₁₅-C₃₆). Enzym ten katalizuje reakcję hydroksylacji terminalnej, prowadząc do powstania alkoholu, który następnie ulega dalszym przemianom do kwasu tłuszczowego i włączeniu do szlaków β-oksydacji [261]. Najwyższą obfitość genu *ladA* odnotowano w MFC 2 (6,30 RPKG; lodowiec). Wysokie wartości uzyskano również w MFC 3 (3,80 RPKG; rzeka polodowcowa), MFC 4 (3,28 RPKG; gleba tropikalna) oraz MFC 7 (3,24 RPKG; okolice skrzynki rozładunku paliw).

Geny *almA* i *CYP153*, odpowiedzialne za degradację alkanów średnio- i długołańcuchowych, były obecne we wszystkich metagenomach w zakresie 0,61 - 2,73 RPKG. Gen *almA* koduje monooksygenazę wiążącą flawinę, enzym inicjujący degradację alkanów długołańcuchowych (C₂₀-C₃₂) poprzez hydroksylację końcową, prowadzącą do powstania odpowiednich alkoholi [261]. Z kolei *CYP153* należy do rodziny cytochromów P450 i katalizuje terminalną hydroksylację alkanów C₅-C₁₃. Obecność tych dwóch markerów w każdej z próbek wskazuje, że zarówno środowiska górskie, azjatyckie, jak i skażone, charakteryzują się powszechnym potencjałem do biodegradacji alkanów średnich i długich, co stanowi kluczowy etap w metabolizmie węglowodorów ropopochodnych.

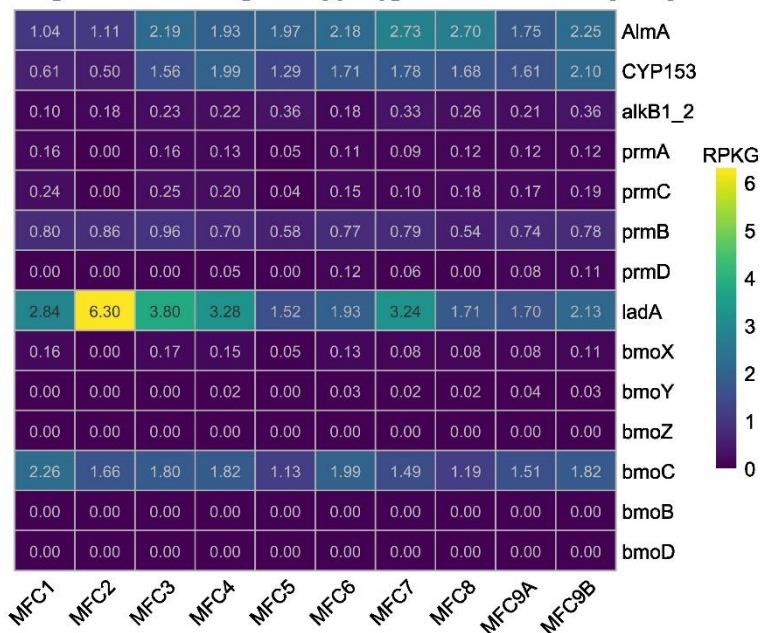
Kompleks *prmABCD*, związany z degradacją krótkich alkanów, wykazywał umiarkowaną reprezentację w zakresie 0,67 - 1,37 RPKG, osiągając najwyższe wartości w MFC 3 (rzeka polodowcowa) oraz MFC 9B (gleba z okolic parkingu miejskiego). Kompleks ten koduje monooksygenazę propanową, wieloskładnikowy enzym inicjujący rozkład propanu i innych krótkołańcuchowych alkanów poprzez reakcję hydroksylacji. Powstające alkohole (1-propanol lub 2-propanol) ulegają następnie dalszym przemianom do aldehydów i kwasów karboksylowych, które mogą być włączane do centralnych szlaków metabolicznych. Kompleks ten został opisany dla szczepu *Gordonia sp.* [262]. Należy podkreślić, że w próbce MFC 2 (lodowiec) wykryto jedynie gen *prmB*, co wskazuje na niepełną reprezentację całego kompleksu w tym środowisku. Ogółem obecność klastra *prmABCD* w pozostałych próbkach potwierdza powszechny potencjał społeczności mikroorganizmów do degradacji krótkołańcuchowych węglowodorów alifatycznych.

Klaster *bmoBCDXYZ* koduje monooksygenazę butanową, enzym wieloskładnikowy inicjujący tlenową degradację krótkich alkanów (C₂-C₄). Kompleks ten został scharakteryzowany u *Pseudomonas sp.* i katalizuje hydroksylację butanu do 1-butanolu, a następnie produkty reakcji włączane są do centralnego metabolizmu komórki [263]. Klaster ten został wykryty w sposób niepełny: geny *bmoX* i *bmoC* charakteryzowały się

relatywnie wysoką obfitością (do 2,42 RPKG w MFC 1, jezioro pokopalniane), *bmoY* odnotowano sporadycznie na bardzo niskich poziomach, natomiast *bmoB*, *bmoD* oraz *bmoZ* nie zostały wykryte w żadnej z próbek (0 RPKG).

Uzyskane wyniki wskazują, że szlaki degradacji alkanów, zwłaszcza średnio- i długołańcuchowych, są szeroko rozpowszechnione we wszystkich analizowanych środowiskach. Należy jednak podkreślić, że pełna reprezentacja wszystkich podjednostek kompleksu *bmo* nie została wykryta, co sugeruje częściową obecność tego szlaku i potencjalne ograniczenia w pełnej degradacji krótkołańcuchowych alkanów.

Geny zaangażowane w degradację węglowodorów alifatycznych



Rysunek 40 Mapa cieplna przedstawiająca znormalizowane wartości (RPKG) genów zaangażowanych w degradację węglowodorów alifatycznych. Oznaczenie próbek: MFC 1 – Jezioro pokopalniane, MFC 2 – Lodowiec, MFC 3 – Rzeka polodowcowa, MFC 4 – Gleba tropikalna, MFC 5 – Wulkan błotny, MFC 6 – Kanał ściekowy w okolicy stacji paliw, MFC 7 – Okolice skrzynki rozładunku paliw na stacji paliw, MFC 8 – Separator substancji ropopochodnych na stacji paliw, MFC 9 – Parking miejski.

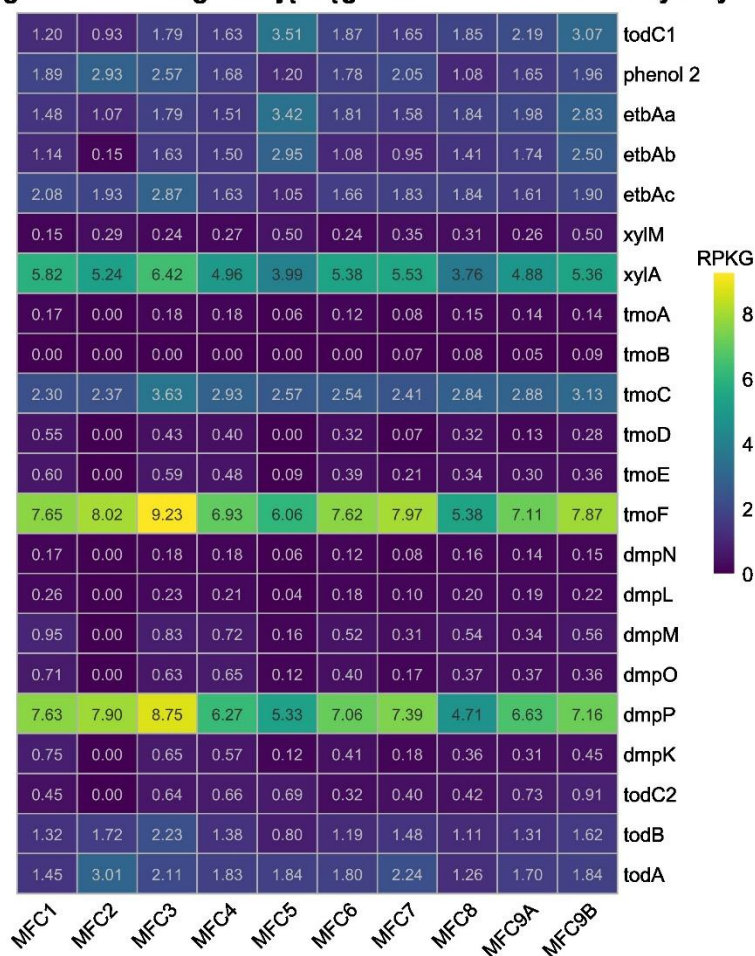
Geny związane z degradacją węglowodorów monoaromatycznych

Analiza genów odpowiedzialnych za degradację węglowodorów monoaromatycznych wykazała obecność wszystkich 21 docelowych markerów funkcjonalnych (Rysunek 41). Sumaryczna obfitość tej kategorii mieściła się w zakresie od 30,31 RPKG (MFC 8, separator substancji ropopochodnych) do 47,61 RPKG (MFC 3, rzeka polodowcowa). Najliczniej reprezentowaną grupą były geny klastra *tmoABCDEF*, kodujące podjednostki monooksygenazy toluenowej. Ich wartości wahały się od 8,77 RPKG (MFC 5, gleba z wulkanu błotnego) do 14,06 RPKG (MFC 3, rzeka polodowcowa). Enzym ten inicjuje tlenowy szlak degradacji toluenu, katalizując reakcję hydroksylacji tego związku do 4-metylfenolu (krezolu) [264]. Proces ten stanowi etap kluczowy dla uruchomienia dalszych przemian katabolicznych w szlaku degradacji węglowodorów aromatycznych.

Drugą co do obfitości grupą były geny klastra *dmpKLMNOP*, kodujące kompleks monooksygenazy fenolowej oraz dioksygenaz katecholowych, odpowiedzialnych

za hydroksylację fenolu do katecholu i dalszy rozkład pierścienia aromatycznego. Produktem tych reakcji są związki pośrednie, takie jak cis,cis-mukonian, które następnie wchodzi w szlak β -ketoadypinowy i ulegają mineralizacji do acetylo-CoA i bursztynilo-CoA, kluczowych metabolitów cyklu Krebsa. Ponadto biorą także udział w degradacji chlorowanych pochodnych cykloheksanu oraz benzenu [265]. Ich obfitość osiągała maksimum 11,26 RPKG w MFC 3 (rzeka polodowcowa) oraz minimum 5,83 RPKG w MFC 5 (gleba z wulkanu błotnego).

Geny zaangażowane w degradację węglowodorów monoaromatycznych



Rysunek 41 Mapa cieplna przedstawiająca znormalizowane wartości (RPKG) genów zaangażowanych w degradację węglowodorów monoaromatycznych. Oznaczenie próbek: MFC 1 – Jezioro pokopalniane, MFC 2 – Lodowiec, MFC 3 – Rzeka polodowcowa, MFC 4 – Gleba tropikalna, MFC 5 – Wulkan błotny, MFC 6 – Kanał ściekowy w okolicy stacji paliw, MFC 7 – Okolice skrzynki rozładunku paliw na stacji paliw, MFC 8 – Separator substancji ropopochodnych na stacji paliw, MFC 9 – Parking miejski.

Klaster *todABCIC2* koduje kompleks dioksygenazy toluenowej, inicjujący rozkład toluenu oraz innych związków aromatycznych (m.in. benzenu, etylobenzenu, chlorocykloheksanu, chlorobenzenu). Enzym ten został opisany u przedstawicieli rodzaju *Pseudomonas sp.* i katalizuje dwustopniową hydroksylację pierścienia aromatycznego, prowadząc do powstania dihydrodioli, które następnie ulegają dalszemu przekształceniu do katecholu. Produkt ten jest mineralizowany szlakiem orto (β -ketoadypinowym) lub meta, co umożliwia włączenie go do cyklu Krebsa [266]. W analizowanych metagenomach geny klastra *todABCIC2* występowały we wszystkich próbkach,

osiągając wartości od 4,43 RPKG (MFC 1, jezioro pokopalniane) do 7,43 RPKG (MFC 9B, gleba z okolic parkingu miejskiego). Obecność tego klastra we wszystkich środowiskach wskazuje, że potencjał degradacji toluenu i innych aromatów jest cechą powszechną w badanych społecznościach mikroorganizmów, choć jego intensywność różni się w zależności od źródła inokulum.

Geny *xylA* i *xylM*, należące do operonu TOL i związane z degradacją toluenu oraz ksyleny, charakteryzowały się obfitością od 4,07 RPKG (MFC 8, separator substancji ropopochodnych) do 6,67 RPKG (MFC 3, rzeka polodowcowa). Gen *xylM* koduje metylomonooksygenazę toluenową, katalizującą hydroksylację substratów do metylokatecholi, natomiast *xylA* koduje składnik przenoszący elektrony metylomonooksygenazy toluenowej, która jest odpowiedzialna za rozszczepienie powstałego katecholu lub metylokatecholu w pozycji meta [267].

Geny klastra *etbAabc*, kodują podjednostki etylobenzenowej monoooksygenazy odpowiedzialnej za przekształcenie etylobenzenu do 1-fenylometanolu poprzez reakcję hydroksylacji. Produkt tej reakcji ulega dalszym przemianom do kwasu fenylacetowego, a następnie jest rozkładany do związków pośrednich włączanych do cyklu Krebsa. Geny te zostały scharakteryzowane dla rodzaju *Rhodococcus sp.*[268]. Ich ilość w badanych metagenomach wynosiła od 3,15 RPKG (MFC 2, lodowiec) do 7,41 RPKG (MFC 5, gleba z wulkanu błotnego). Obecność genów *etbAabc* wskazuje na zdolność społeczności mikroorganizmów do wykorzystania etylobenzenu jako źródła węgla i energii.

Istotną rolę we wszystkich próbkach odgrywał gen *phenol 2*, kodujący dużą podjednostkę monoooksygenazy fenolowej, enzymu odpowiedzialnego za hydroksylację fenolu do katecholu. Szlak ten jest zaangażowany zarówno w degradację toluenu, fenolu, jak i aminobenzoesanów [269]. Wartości tego genu mieściły się w zakresie od 1,08 RPKG (MFC 8, separator substancji ropopochodnych) do 2,93 RPKG (MFC 2, lodowiec). Stosunkowo wysokie wartości w MFC 2, MFC 3 (2,57 RPKG; rzeka polodowcowa) oraz MFC 7 (2,05 RPKG; gleba z okolic skrzynki rozładunku paliw).

Warto zaznaczyć, że najwyższe wartości RPKG odnotowano dla genów *tmoF*, *dmpP* i *xylA*, co sugeruje dominację szlaków związanych z transferem elektronów w kompleksie monoooksygenazy toluenowej (*tmo*), rozkładem fenolu (*dmp*) oraz meta-szlakiem degradacji katecholu (*xyl*). Wyniki te wskazują, że w analizowanych społecznościach mikroorganizmów istotną rolę odgrywają zarówno wczesne etapy hydroksylacji toluenu i fenolu, jak i późniejsze procesy rozszczepienia pierścienia aromatycznego, prowadzące do włączenia produktów do centralnego metabolizmu w cyklu Krebsa.

Podsumowując, analiza genów odpowiedzialnych za degradację węglowodorów monoaromatycznych wskazuje, że badane społeczności mikroorganizmów posiadają szeroki potencjał w rozkładzie toluenu, ksyleny, etylobenzenu, benzenu, fenolu oraz aminobenzoesanów. Wysoka obfitość markerów takich jak *tmoF*, *dmpP* i *xylA* podkreśla kluczową rolę szlaków hydroksylacji toluenu i fenolu oraz meta-szlaku rozkładu katecholu, prowadzących do pełnej mineralizacji substratów aromatycznych. Obecność genów klastrów *etbAabc* i *todABCIC2* dodatkowo wskazuje na zdolność

do biodegradacji etylobenzenu, chlorocykloheksanu czy chlorobenzenu, co świadczy o szerokim spektrum substratowym tych konsorcjów. Najwyższy potencjał degradacji monocyklicznych węglowodorów aromatycznych odnotowano w społeczności z MFC 3 (rzeka polodowcowa), natomiast najniższy w MFC 8 (separator substancji ropopochodnych).

Geny związane z degradacją wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA)

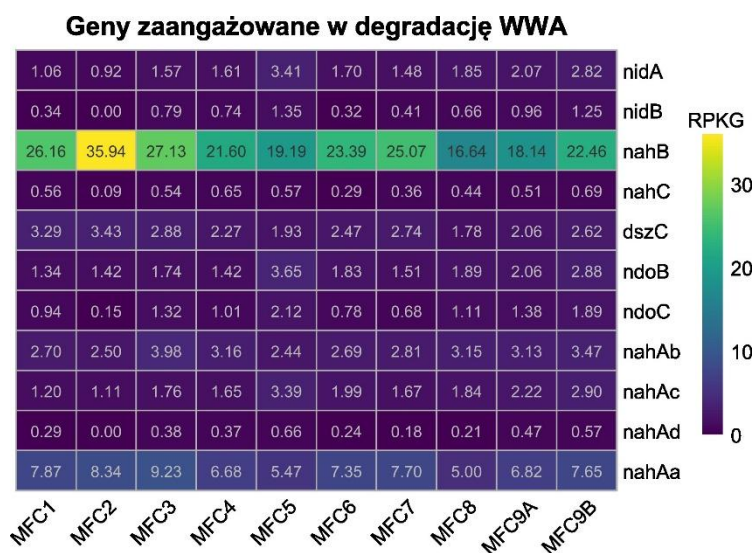
Analiza genów związanych z degradacją WWA wykazała obecność wszystkich jedenastu docelowych markerów funkcjonalnych we wszystkich metagenomach (**Rysunek 42**). Najliczniej reprezentowaną grupę stanowiły geny operonu *nah*, biorącego udział w degradacji naftalenu. Kompleks *nahAabcd* koduje dioksygenazę naftalenową, enzym inicjujący szlak, który katalizuje wprowadzenie dwóch atomów tlenu do pierścienia aromatycznego i przekształcenie naftalenu do cis-1,2-dihydrodiolu naftalenu [270]. Wśród podjednostek tego kompleksu najwyższą obfitością charakteryzował się gen *nahAa* (5,00 - 9,23 RPKG), osiągając maksimum w próbce MFC 3 (rzeka polodowcowa). Wysokie wartości odnotowano również w MFC 2 (8,34 RPKG; lodowiec) oraz MFC 1 (7,87 RPKG; jezioro pokopalniane).

Kolejny etap szlaku prowadzi enzym kodowany przez gen *nahB*, którego produkt, dehydrogenaza cis-naftalenodiolu, utlenia cis-1,2-dihydrodiol do 1,2-dihydroksynaftalenu [270]. Gen *nahB* był obecny we wszystkich próbkach i charakteryzował się wyjątkowo wysoką obfitością. Najwyższą wartość odnotowano w MFC 2 (35,94 RPKG; lodowiec), co wskazuje na dominującą rolę szlaku naftalenowego w społeczności mikroorganizmów tego środowiska. Równie wysokie wartości występowały w MFC 3 (27,13 RPKG; rzeka polodowcowa), MFC 1 (26,16 RPKG; jezioro pokopalniane) oraz MFC 7 (25,07 RPKG; gleba z okolic skrzynki rozładunku paliw). Najniższą obfitość *nahB* zaobserwowano w MFC 8 (16,64 RPKG; separator substancji ropopochodnych).

Geny klastra *nidAB* kodują dioksygenazę fenantrenową inicjującą degradację fenantrenu [271]. Ich wartości mieściły się w zakresie od 0,92 RPKG (MFC 2, lodowiec) do 4,76 RPKG (MFC 5, gleba z wulkanu błotnego). Najwyższe wartości odnotowano w próbkach glebowych (MFC 5 i MFC 9B), co wskazuje na szczególnie wysoki potencjał tych społeczności w degradacji bardziej złożonych, wielopierścieniowych struktur aromatycznych. Podobną zależność zaobserwowano w przypadku genów *ndoB* i *ndoC*, kodujących podjednostki hydroksylazy dioksygenazy naftalenowej [261]. Ich obfitość mieściła się w zakresie od 1,56 RPKG (MFC 2, lodowiec) do 5,77 RPKG (MFC 5, gleba z wulkanu błotnego).

Gen *dszC*, kodujący monooksygenazę dibenzotiofenową, został zidentyfikowany we wszystkich analizowanych metagenomach. Enzym ten, po raz pierwszy scharakteryzowany u *Rhodococcus erythropolis D-1*, katalizuje dwa pierwsze etapy metabolicznego szlaku „4S”, w którym dibenzotiofen (DBT) ulega kolejno sulfooksydacji do DBT-sulfotlenku (DBTO), a następnie do DBT-sulfonu (DBTO₂)

[272]. Jego obfitość mieściła się w zakresie od 1,78 RPKG (MFC 8, separator substancji ropopochodnych) do 3,43 RPKG (MFC 2, lodowiec). Stosunkowo wysokie wartości odnotowano również w MFC 1 (3,29 RPKG; jezioro pokopalniane) oraz MFC 3 (2,88 RPKG; rzeka polodowcowa). Wyniki te wskazują, że szlak biodesulfuracji odgrywa istotną rolę zarówno w środowiskach górskich, jak i skażonych związkami ropopochodnymi, umożliwiając mikroorganizmom efektywne usuwanie siarki z węglowodorów.



Rysunek 42 Mapa cieplna przedstawiająca znormalizowane wartości (RPKG) genów zaangażowanych w degradację wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA). Oznaczenie próbek: MFC 1 – Jezioro pokopalniane, MFC 2 – Lodowiec, MFC 3 – Rzeka polodowcowa, MFC 4 – Gleba tropikalna, MFC 5 – Wulkan błotny, MFC 6 – Kanał ściekowy w okolicy stacji paliw, MFC 7 – Okolice skrzynki rozładunku paliw na stacji paliw, MFC 8 – Separator substancji ropopochodnych na stacji paliw, MFC 9 – Parking miejski.

Podsumowując, wszystkie analizowane społeczności mikroorganizmów wykazywały pełen zestaw genów zaangażowanych w degradację WWA, co świadczy o ich szerokim potencjale metabolicznym. Najwyższą obfitością wyróżniały się geny operonu *nah*, wskazując na dominującą rolę szlaku naftalenowego w wielu środowiskach. Jednocześnie obecność genów *nidAB*, *ndoBC* i *dszC* podkreśla zdolność tych społeczności do degradacji bardziej złożonych struktur aromatycznych oraz do usuwania związków siarkoorganicznych.

Geny związane z beztlenową degradacją węglowodorów

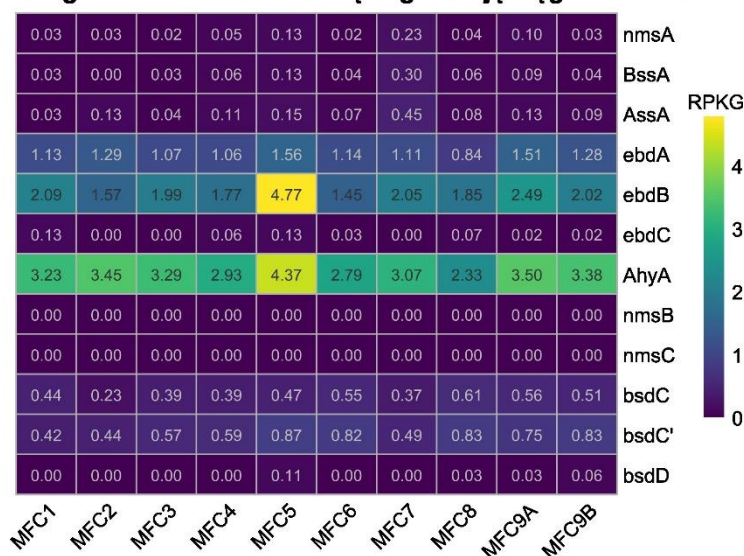
Spośród 12 analizowanych markerów funkcjonalnych związanych z beztlenową degradacją węglowodorów, w metagenomach wykryto 10 genów, co wskazuje na szeroką reprezentację szlaków beztlenowych we wszystkich badanych metagenomach (Rysunek 43).

Gen *nmsA*, kodujący podjednostkę α syntazy 2-naftylo-2-metylobursztynianu (NMS), jest odpowiedzialny za beztlenową aktywację 2-metylonaftalenu poprzez addycję fumaranu [273]. Został on wykryty we wszystkich próbkach, jednak jego wartości były niskie (0,018 - 0,23 RPKG). Podjednostki *NmsB* i *NmsC* nie zostały wykryte w żadnym

metagenomie, co wskazuje na brak pełnej funkcjonalności kompleksu NMS.

Gen *bssA*, kodujący syntazę benzylobursztynianu, kluczowy enzym inicjujący beztlenową degradację benzenu [261], również był obecny w większości próbek (0 - 0,30 RPKG). Najwyższe wartości stwierdzono w MFC 7 (0,30 RPKG; gleba z okolic skrzynki rozładunku paliw), podczas gdy w MFC 2 (lodowiec) jego obecności nie odnotowano. Podobny zakres występowania wykazał gen *assA*, kodujący syntazę alkilobursztynianową odpowiedzialną za degradację n-alkanów (C₁₀-C₂₀) w warunkach beztlenowych [261]. Obfitość *assA* mieściła się w zakresie 0,0 - 0,45 RPKG, z maksimum w MFC 7.

Geny zaangażowane w beztlenową degradację węglowodorów



Rysunek 43 Mapa cieplna przedstawiająca znormalizowane wartości (RPKG) genów zaangażowanych w beztlenową degradację węglowodorów. Oznaczenie próbek: MFC 1 – Jezioro pokopalniane, MFC 2 – Lodowiec, MFC 3 – Rzeka polodowcowa, MFC 4 – Gleba tropikalna, MFC 5 – Wulkan błotny, MFC 6 – Kanał ściekowy w okolicy stacji paliw, MFC 7 – Okolice skrzynki rozładunku paliw na stacji paliw, MFC 8 – Separator substancji ropopochodnych na stacji paliw, MFC 9 – Parking miejski.

Znaczącą grupę markerów stanowiły geny *ebdABC*, kodujące kompleks dehydrogenazy etylobenzenowej [274]. Największa obfitość tego kompleksu występowała w metagenomie MFC 5 (6,47 RPKG; gleba wulkanu błotnego) oraz MFC 9A (4,01 RPKG; gleba z parkingu miejskiego). Najniższą ilość tego genu zidentyfikowano w metagenomie MFC 6 (2,61 RPKG; kanał ściekowy stacji paliw). Warto jednak podkreślić, że wartości uzyskane dla tego kompleksu były stosunkowo wysokie we wszystkich analizowanych metagenomach, co wskazuje na jego szeroką dystrybucję w różnych typach środowisk. Dehydrogenaza etylobenzenowa jest jednym z najlepiej poznanych enzymów inicjujących beztlenową degradację węglowodorów aromatycznych, a jej aktywność jest szczególnie istotna w warunkach denitryfikacyjnych, gdzie katalizuje przekształcenie etylobenzenu do 1-fenylotanolu. Enzym ten został po raz pierwszy szczegółowo scharakteryzowany u *Azoarcus sp.*, modelowego organizmu zdolnego do beztlenowej degradacji etylobenzenu [274]. Fakt ten potwierdza kluczową rolę tego kompleksu w adaptacji społeczności mikroorganizmów do metabolizmu węglowodorów w warunkach ograniczonej dostępności tlenu.

Gen *ahyA* był najliczniej reprezentowanym markerem tej grupy. Jego wartości mieściły się w zakresie od 2,33 do 4,37 RPKG, z maksimum w MFC 5 (gleba wulkanu błotnego). Gen ten koduje hydroksylazę metylenu C2 alkanu. Enzym ten uczestniczy w beztlenowej hydroksylacji alkanów w pozycji C2, czyli wprowadza grupę hydroksylową do drugiego atomu węgla łańcucha alkilowego. Proces ten stanowi alternatywny mechanizm inicjacji szlaków degradacji węglowodorów alifatycznych w warunkach beztlenowych, umożliwiając ich dalsze przekształcenia do metabolitów pośrednich, które mogą być włączane do centralnych szlaków metabolicznych [261].

W analizowanych metagenomach zidentyfikowano geny *bsdC* i *bsdD*, kodujące podjednostki dekarboksylaz aromatycznych kwasów hydroksylowych. Enzymy te należą do klasy liaz i katalizują reakcje degradacji aminobenzoesanów, opisane m.in. u szczepów *Bacillus sp.* [275]. Występowały dwa warianty genu *bsdC*: K01612 (0,42 - 0,87 RPKG), o wyższej obfitości, oraz K16239 (0,23 - 0,61 RPKG), związany z dekarboksylazą 4-hydroksybenzoesanową. Gen *bsdD* wykryto jedynie w czterech próbkach (MFC 5, MFC 8, MFC 9A, MFC 9B), w zakresie 0,02 - 0,11 RPKG.

Analiza genów związanych z beztlenową degradacją węglowodorów wykazała szeroką reprezentację szlaków prowadzących do metabolizmu różnych klas związków. W badanych metagenomach obecne były markery inicjujące rozkład aromatycznych i alifatycznych węglowodorów, takich jak benzen, etylobenzen, alkanany średnio- i długołańcuchowe oraz pochodne aminobenzoesanów. Kluczowe enzymy obejmowały syntazy bursztynianowe (*bssA*, *assA*, *nmsA*), kompleks dehydrogenazy etylobenzenowej (*ebdABC*), hydroksylazę metylenu C2 alkanów (*ahyA*) oraz dekarboksylazy hydroksybenzoesanów (*bsdCD*). Wyniki te potwierdzają, że społeczności mikroorganizmów we wszystkich próbkach dysponują potencjałem do beztlenowej degradacji zarówno prostych węglowodorów aromatycznych, jak i bardziej złożonych związków alifatycznych, co podkreśla ich zdolność adaptacyjną w warunkach ograniczonej dostępności tlenu.

Podsumowanie analizy genów związanych z degradacją węglowodorów

Analiza metagenomów wykazała obecność reprezentacji genów odpowiedzialnych zarówno za tlenową, jak i beztlenową degradację węglowodorów. Wśród markerów funkcjonalnych najwyższą obfitością wyróżniały się: *nahB* – gen operonu *nah* zaangażowany w rozkład wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w tym naftalenu, *tmoF* – podjednostka kompleksu monoooksygenazy toluenowej odpowiedzialnej za degradację węglowodorów monoaromatycznych, w tym toluenu, *ladA* – monoooksygenaza alkanowa inicjująca degradację długołańcuchowych alkanów oraz *ahyA* – marker beztlenowych szlaków degradacyjnych, kodujący hydroksylazę metylenu C2 alkanów. Dominacja tych genów wskazuje, że badane społeczności mikroorganizmów posiadają wysoki potencjał metaboliczny obejmujący kluczowe grupy związków: alkanany, węglowodory monoaromatyczne oraz WWA, a także mechanizmy umożliwiające ich rozkład w warunkach beztlenowych. Wyniki te potwierdzają zdolność analizowanych konsorcjów do efektywnej mineralizacji szerokiego spektrum węglowodorów, co ma istotne znaczenie w kontekście bioremediacji i funkcjonowania

układów bioelektrochemicznych.

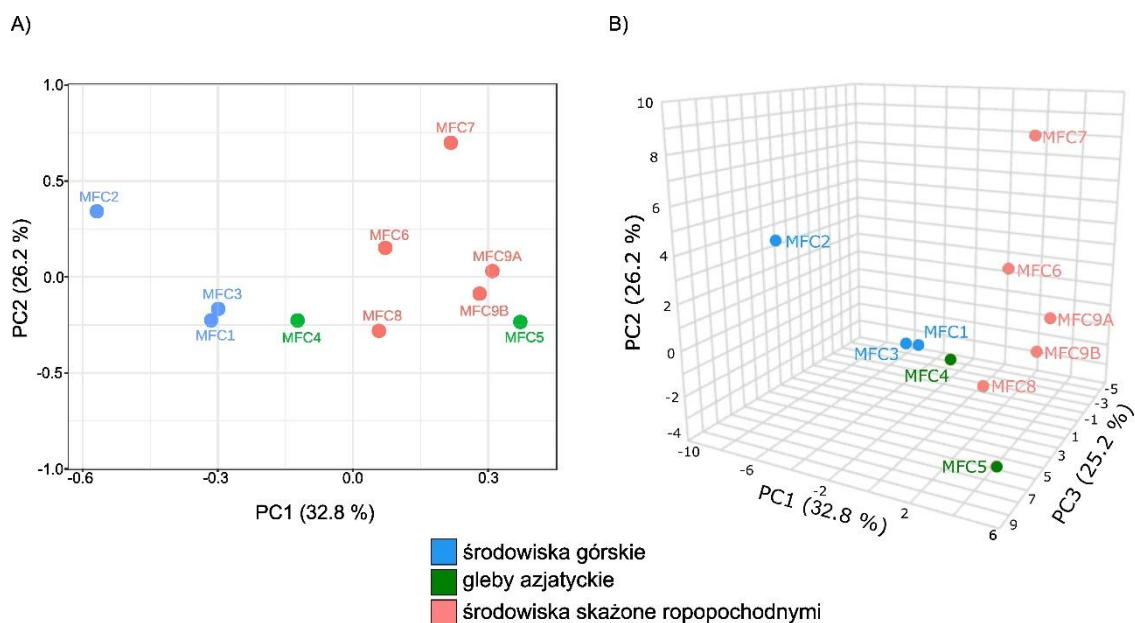
W analizowanych metagenomach największy potencjał degradacji węglowodorów, zarówno w szlakach tlenowych, jak i beztlenowych, stwierdzono w społecznościach z próbek MFC 3 (rzeka polodowcowa), a następnie MFC 9B (gleba z okolic parkingu miejskiego) oraz MFC 2 (lodowiec). Najniższą sumaryczną obfitość genów degradacyjnych wykazała próbka MFC 8 (separator substancji ropopochodnych). Należy jednak podkreślić, że we wszystkich analizowanych metagenomach łączna liczba RPKG genów degradacyjnych była wysoka, co wskazuje, że każde z konsorcjów mikroorganizmów jest wyspecjalizowane i potencjalnie zdolne zarówno do tlenowego, jak i beztlenowego rozkładu węglowodorów.

Choć najniższą sumaryczną wartość RPKG odnotowano w MFC 8 (separator substancji ropopochodnych), nie świadczy to o niskim potencjale degradacyjnym tej społeczności. We wszystkich próbkach, w tym również w MFC 8, wykryto pełny zestaw analizowanych genów HDG na stosunkowo wysokim poziomie, co wskazuje na zdolność mikroorganizmów do pełnej degradacji węglowodorów. Różnice w wartościach RPKG pomiędzy próbkami mogą więc wynikać nie tyle z obecności czy braku genów, ile z odmiennych struktur i strategii adaptacyjnych społeczności mikrobiologicznych. W przypadku inokulatów pochodzących ze środowisk górskich (lodowiec, rzeka polodowcowa) obserwowano wyższe wartości RPKG dla genów związanych z degradacją węglowodorów w MFC w porównaniu ze społecznościami ze środowisk wcześniej skażonych ropą (separator substancji ropopochodnych, kanał ściekowy stacji paliw). Wynikać to może z faktu, że w mikrobiomach nieskażonych wcześniej niszowe populacje drobnoustrojów z genami związanymi z degradacją węglowodorów szybko zwiększały swoją liczebność w warunkach MFC, co przejawiało się wyższym względnym udziałem tych genów w populacji [276]. Natomiast w społecznościach ze środowisk skażonych wcześniej ropą, profil genów degradacyjnych mógł być już wcześniej ukształtowany przez naturalną ekspozycję na zanieczyszczenie [277], co tłumaczy zachowanie wysokiego potencjału degradacyjnego.

Uzyskane wyniki różnią się od licznych doniesień literaturowych dotyczących środowisk skażonych związkami ropopochodnymi, gdzie społeczności mikroorganizmów zwykle wykazują poszerzony skład genów degradacyjnych, co tłumaczy się długotrwałą presją selekcyjną i adaptacją do obecności węglowodorów [278], [279]. Jednocześnie są one zgodne z obserwacjami Peeb i in. [260], którzy wykazali, że w metagenomie czystego lodu morskiego potencjał degradacyjny był wyższy niż w lodzie skażonym ropą. Sugeruje to, że relacja między poziomem zanieczyszczenia a potencjałem degradacyjnym nie jest uniwersalna i może zależeć od charakteru ekosystemu oraz specyficznych mechanizmów adaptacyjnych mikrobiomów, w tym interakcji z układami bioelektrochemicznymi. Ostatecznie, wszystkie badane społeczności charakteryzują się wysokim udziałem genów związanych z degradacją zanieczyszczeń ropopochodnych, co wskazuje na możliwość ich zastosowania w bioremediacji.

Ocena funkcjonalnego zróżnicowania badanych metagenomów

Analiza PCA (**Rysunek 44**) pozwoliła na ocenę zróżnicowania funkcjonalnego społeczeństwa mikroorganizmów w komorach anodowych MFC, w zależności od zastosowanego inokulum. **Rysunek 44A** przedstawia dwuwymiarowe PCA, które wyjaśnia łącznie 59 % zmienności danych. Natomiast **Rysunek 44B** pokazuje przestrzeń trójwymiarową obejmującą trzy pierwsze składowe główne, wyjaśniające łącznie 84,2 % całkowitej zmienności, co pozwala na bardziej wiarygodną interpretację danych funkcjonalnych. Na wykresach zaobserwowano wyraźne rozdzielanie próbek w zależności od pochodzenia inokulum. Próbki oznaczone kolorem czerwonym, reprezentujące środowiska skażone związkami ropopochodnymi (MFC 6, MFC 7, MFC 8, MFC 9A, MFC 9B), tworzą zwartą grupę w prawej części wykresu, co wskazuje na ich zbliżony profil funkcjonalny. Taka koncentracja przestrzenna świadczy o obecności wyspecjalizowanych społeczności mikroorganizmów, zawierających podobne zestawy genów zaangażowanych w biodegradację węglowodorów. Ich obecność odzwierciedla wcześniejszą ekspozycję inokulum na związki ropopochodne, która mogła prowadzić do selekcji mikroorganizmów o ukierunkowanej funkcjonalności metabolicznej. Z kolei próbki oznaczone kolorem niebieskim (MFC 1, MFC 2, MFC 3), pochodzące ze środowisk górskich o niskim stopniu antropogenicznego skażenia, są bardziej rozproszone i zajmują lewą część wykresu. Ich pozycja wskazuje na większe zróżnicowanie profilu funkcjonalnego. MFC 2, inokulowane wodą z lodowca, jest wyraźnie odseparowane od pozostałych próbek, co potwierdza, że jego mikrobiom różni się funkcjonalnie.



Rysunek 44 Analiza głównych składowych (PCA) przedstawiająca zróżnicowanie funkcjonalne społeczności mikroorganizmów w ogniwach MFC na podstawie profilu genów związanych z degradacją związków ropopochodnych. (A) Dwuwymiarowy wykres PCA uwzględniający pierwszą i drugą składową główną (PC1 i PC2). (B) Trójwymiarowy wykres PCA uwzględniający trzy pierwsze składowe główne (PC1, PC2 i PC3). Oznaczenie próbek: MFC 1 – Jezioro pokopalniane, MFC 2 – Lodowiec, MFC 3 – Rzeka polodowcowa, MFC 4 – Gleba tropikalna, MFC 5 – Wulkan błotny, MFC 6 – Kanał ściekowy w okolicy stacji paliw, MFC 7 – Okolice skrzynki rozładunku paliw na stacji paliw, MFC 8 – Separator substancji ropopochodnych na stacji paliw, MFC 9 – Parking miejski.

4.3.1.5. Podsumowanie i wnioski

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów jednoznacznie wskazują, że zarówno pochodzenie inokulum, jak i strategia zastosowania kosubstratu stanowią kluczowe czynniki determinujące poziom oraz stabilność mocy generowanej przez MFC. Dodatek octanu

w większości MFC sprzyjał szybkiemu rozwojowi biofilmu oraz intensyfikacji procesów elektrochemicznych, a uśrednione dane z dziesięciu eksperymentów wykazały niemal czterokrotny wzrost gęstości mocy w porównaniu do serii bez kosubstratu. W szczególności MFC 8, inokulowane osadem z separatora substancji ropopochodnych, osiągnęło wysoką wartość mocy przekraczającą 350 mW/m^2 ($18,3 \text{ W/m}^3$). Wyjątek stanowił MFC 7 (osad z okolic skrzynki rozładunku paliw), w którym konsorcjum mikroorganizmów wyspecjalizowane w wykorzystywaniu węglowodorów osiągało wyższą wydajność w warunkach braku kosubstratu. Mimo, że układy inokulowane próbkami ze środowisk górskich (MFC 2 – lodowiec i MFC 3 – rzeka polodowcowa) wykazywały stosunkowo niską i niestabilną produkcję mocy, mikroorganizmy w nich obecne były zdolne do degradacji węglowodorów w warunkach pracy MFC.

Zarejestrowane spadki napięcia powierzchniowego wskazują na produkcję biosurfaktantów *in situ*, które mogą odgrywać istotną rolę w zwiększaniu biodostępności frakcji hydrofobowych oraz pośrednio wpływać na intensyfikację transferu elektronów w układach MFC. Najniższe wartości napięcia powierzchniowego zaobserwowano w układach MFC 8, MFC 4 i MFC 6, a ich występowanie było związane z fazami wzrostu mocy, co sugeruje, że wzmożona synteza związków powierzchniowo czynnych sprzyjała efektywniejszemu wykorzystaniu substratów węglowodorowych przez społeczności anodowe. Jednocześnie analiza składu taksonomicznego wykazała, że struktura społeczności mikrobiologicznych była silnie determinowana przez środowisko pochodzenia inokulum. Archeony stanowiły jedynie niewielki odsetek społeczności anodowych (do 1,6 %). Zaobserwowano jednak zależność między najwyższą generowaną mocą a relatywnie wyższym udziałem tej grupy mikroorganizmów. Może to sugerować, że obecność niewielkiej frakcji archeonów sprzyja zwiększeniu efektywności MFC. Ich rola może być związana z relacjami syntroficznymi oraz udziałem w mechanizmach bezpośredniego transferu elektronów (DIET), co wymaga dalszej weryfikacji w analizach funkcjonalnych. Obecność przedstawicieli rodzajów *Methanosarcina* i *Methanothrix* dodatkowo wspiera tę hipotezę, wskazując na potencjalny udział archeonów w stabilizacji i wspomaganie aktywności egzoelektrogennej społeczności anodowej. We wszystkich analizowanych układach biofilmy anodowe były zdominowane przez bakterie, głównie przedstawicieli klasy *Betaproteobacteria*. Najwyższą różnorodność alfa, najbardziej rozbudowany profil funkcjonalny oraz najwyższą moc zarejestrowano w układzie MFC 8.

Analiza PCA wykazała wyraźne rozdzielenie próbek na trzy grupy odpowiadające typom środowisk inokulum. Jedynie MFC 6 (środowisko skażone ropopochodnie) grupował się bliżej próbek z gleb azjatyckich (MFC 4 i MFC 5), co wskazuje na podobieństwo dominujących taksonów. Diagram Venna i dendrogram potwierdzają, że największe

podobieństwo występowało między próbkami z gleb azjatyckich i środowisk skażonych węglowodorami. Pomimo odmiennego pochodzenia geograficznego i środowiskowego obserwowane podobieństwo sugeruje silny wpływ węglowodorów na kształtowanie struktury społeczności mikroorganizmów.

Kluczowym elementem niniejszych analiz była ocena potencjału degradacyjnego społeczności anodowych na podstawie danych metagenomicznych. W przeprowadzonych analizach wykazano, że najwyższą obfitością w badanych metagenomach charakteryzowały się geny *nahB*, *tmoF*, *ladA* oraz *ahyA*, co wskazuje na ich istotny udział w procesach degradacji węglowodorów w warunkach pracy MFC. Jest to szczególnie istotne, ponieważ dotychczasowe prace skupiały się głównie na markerach takich jak *bssA*, *bsdC* czy *CYP153* [280], [281]. W przeciwieństwie do nich, geny *nahB*, *tmoF*, *ladA* i *ahyA* nie były dotąd analizowane w kontekście społeczności anodowych. Niniejsza praca wypełnia zatem istotną lukę badawczą dotyczącą funkcjonalnych wskaźników potencjału degradacyjnego mikroorganizmów zasiedlających anodę MFC w warunkach kontaktu z węglowodorami ropopochodnymi. Po raz pierwszy wykazano, że geny *nahB*, *tmoF*, *ladA* oraz *ahyA* mogą stanowić kluczowe markery efektywności procesów degradacji węglowodorów w MFC. We wszystkich badanych metagenomach stwierdzono ponadto obecność szerokiego spektrum genów związanych z tlenową i beztlenową degradacją alkanów oraz związków aromatycznych (m.in. klastry *tmo*, *tod*, *dmp*, operon *nah*, a także *ebdABC*, *bssA*, *assA*).

Sama obfitość genów degradacyjnych nie była jednoznacznie związana z wydajnością elektrochemiczną MFC. Przykładem jest MFC 8 (separator substancji ropopochodnych), które mimo relatywnie niższej liczby markerów osiągnęło najwyższą moc i stabilność pracy. Wysoką wydajność można przypisać obecności egzoelektrogenów zdolnych efektywnie wykorzystać łatwo degradowalny octan jako główny donor elektronów, podczas gdy degradacja węglowodorów ropopochodnych przebiegała równolegle, lecz w mniejszym stopniu przyczyniała się do generowanej energii. Wyniki te wskazują, że efektywność MFC zależy nie tylko od potencjału metabolicznego społeczności wobec węglowodorów, ale również od składu funkcjonalnego mikrobiomu, interakcji troficznych oraz efektywności transferu elektronów w biofilmie.

Uzyskane wyniki mają istotne znaczenie zarówno dla zrozumienia mechanizmów funkcjonowania MFC, jak i dla pogłębienia wiedzy na temat produkcji biosurfaktantów ze związków ropopochodnych w warunkach generacji prądu elektrycznego. Stanowią tym samym istotny wkład w obszar badań, który dotychczas pozostawał słabo rozpoznany. Po pierwsze, wykazano, że dobór inokulum stanowi jeden z kluczowych czynników determinujących efektywność funkcjonowania MFC. Konsorcja pochodzące ze środowisk długotrwale eksponowanych na warunki obecności ropy naftowej charakteryzują się wysoką stabilnością, różnorodnością taksonomiczną oraz zdolnością do szybkiego formowania aktywnego biofilmu, co bezpośrednio przekłada się na uzyskiwanie wysokiej i stabilnej mocy. Po drugie, wykazano, że strategia zastosowania kosubstratu istotnie wpływa na efektywność systemu, przy czym skala tego efektu zależy od charakterystyki inokulum oraz stopnia jego metabolicznej specjalizacji.

Po trzecie, zaobserwowane spadki napięcia powierzchniowego mogą wskazywać na zachodzącą w układach MFC produkcję biosurfaktantów *in situ*, co stanowi zjawisko dotychczas słabo opisane w literaturze.

Przeprowadzone analizy znacząco poszerzają dotychczasową wiedzę na temat funkcjonowania społeczności mikrobiologicznych w środowiskach bioelektrochemicznych stosowanych do degradacji frakcji ropopochodnych. Wypełniają istotną lukę badawczą dotyczącą zależności pomiędzy potencjałem degradacyjnym, strukturą społeczności a efektywnością procesów bioelektrochemicznych. Stanowią jednocześnie punkt wyjścia do dalszych badań ukierunkowanych na analizę ekspresji genów, mechanizmów EET oraz opracowanie strategii sterowania procesem w celu optymalizacji efektywności systemów MFC stosowanych w bioremediacji środowisk zanieczyszczonych węglowodorami.

4.3.2. Podniesienie skali oraz wydajności ogniów dla wybranych społeczności mikroorganizmów

Wyniki eksperymentu, przedstawionego w poprzednim rozdziale, umożliwiły wybór społeczności mikroorganizmów o najwyższej aktywności elektrochemicznej, zdolności do syntezy biosurfaktantów oraz degradacji związków ropopochodnych. Na tej podstawie wytypowano trzy konsorcja, które poddano dalszemu wzbogaceniu w warunkach selekcyjnych mikrobiologicznych ogniów paliwowych. Proces ten miał na celu stabilizację mikrobiomu anodowego oraz utrwalenie cech egzoelektrogennych wybranych grup bakterii.

Celem kolejnego etapu prac było określenie, w jaki sposób wyselekcjonowane i wzbogacone konsorcja mikroorganizmów anodowych funkcjonują w układach MFC o zwiększonej skali, przy jednoczesnej ocenie ich zdolności do biodegradacji frakcji ropopochodnych, syntezy biosurfaktantów oraz generacji energii elektrycznej. W tym celu zwiększono skalę układów poprzez powiększenie objętości roboczej komór anodowych z 6 cm³ do 25 cm³ oraz zwiększenie geometrycznej powierzchni anody i katody z 3 cm² do 9 cm², co odpowiadało ponad czterokrotnemu wzrostowi objętości reaktora oraz trzykrotnemu zwiększeniu powierzchni aktywnej elektrod. Tak zaprojektowane modyfikacje umożliwiły ocenę wpływu podniesienia skali na stabilność pracy układów MFC oraz na parametry elektrochemiczne i biodegradacyjne uzyskiwane w warunkach długoterminowej pracy wsadowej.

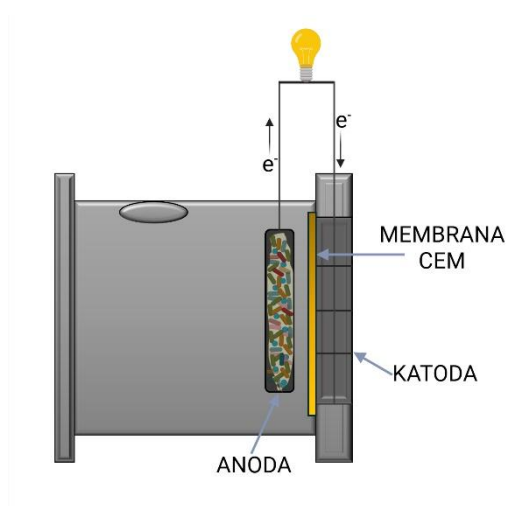
4.3.2.1. Inokulacja MFC oraz przebieg eksperymentu

W niniejszym eksperymencie skonstruowano trzy jednokomorowe mikrobiologiczne ogniwa paliwowe z katodą powietrzną (**Rysunek 45**). Elementy ogniów wykonano z płyt akrylowych przy użyciu plotera laserowego, a szczegółową specyfikację techniczną przedstawiono w **Tabeli 2** (rozd. 3.1). Powierzchnia geometryczna anody wynosiła 9 cm², natomiast objętość robocza komory anodowej 25 cm³. Na podstawie wyników uzyskanych w poprzednim etapie prac wytypowano trzy konsorcja mikrobiologiczne o najwyższym potencjale w zakresie produkcji energii elektrycznej, degradacji związków ropopochodnych oraz biosyntezy surfaktantów. Do inokulacji zastosowano aktywne konsorcja anodowe wzbogacone w eksperymencie opisanym w rozdziale 4.3.1, którym nadano nowe oznaczenia zestawione w **Tabeli 15**.

Tabela 15 Zestawienie pierwotnych i nowych oznaczeń konsorcjów zastosowanych do inokulacji MFC.

Nowe oznaczenie	Inokulum	Źródło inokulum
MFC 1	Wzbogacone konsorcjum anodowe z MFC 6	Gleba i osad z kanału ściekowego stacji paliw, Wrocław (Polska)
MFC 2	Wzbogacone konsorcjum anodowe z MFC 8	Osad i gleba z separatora substancji ropopochodnych, Wielgie (Polska)
MFC 3	Wzbogacone konsorcjum anodowe z MFC 4	Gleba tropikalna (Sri Lanka)

Początkowo zastosowano opór zewnętrzny (R_{zew}) o wartości 2 k Ω , który w dalszym przebiegu eksperymentu był regulowany na podstawie wyników uzyskiwanych podczas cyklicznych testów polaryzacyjnych. Po siedmiu dniach od inokulacji zawartość komory anodowej zastąpiono świeżym podłożem mineralnym (MSM) zawierającym 0,5 g/L NH_4Cl . Szczegółowy skład podłoża mineralnego przedstawiono w rozdziale 3.3. Jako źródło węgla zastosowano mieszaninę ropy naftowej (0,07 % v/v) i octanu sodu (0,1 % w/v, 7,4 mM). Ogniwa prowadzono w trybie wsadowym, przy czym podłoże mineralne wraz z substratem wymieniano co 2-3 dni (średni czas retencji HRT = $60,2 \pm 21,3$ h). Eksperyment realizowano w temperaturze pokojowej (25 °C) przez okres 365 dni. W tym czasie napięcie generowane przez ogniwa rejestrowano w sposób ciągły, a okresowo wykonywano testy LSV, CV i EIS. W trakcie eksperymentu systematycznie monitorowano dynamikę napięcia powierzchniowego oraz właściwości emulsyfikacyjne anolitów. Próbkę anolitu do analizy biosurfaktantów i mikrobiomu anodowego pobierano w fazie ustabilizowanej pracy ogniwa, po osiągnięciu maksymalnej aktywności biosyntezy.



Rysunek 45 Konstrukcja jednokomorowego MFC zastosowanego w eksperymencie.

4.3.2.2. Wydajność MFC

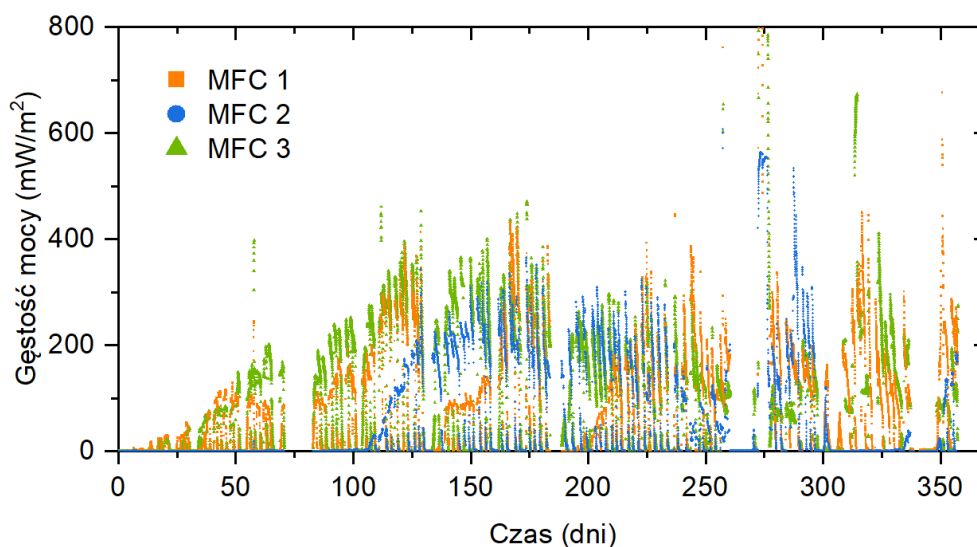
Analiza wydajności energetycznej MFC w czasie rzeczywistym

Napięcia generowane przez ogniwa zostały przeliczone na gęstości mocy zgodnie z prawem Ohma. Analiza zmian gęstości mocy w czasie rzeczywistym (**Rysunek 46**) wykazała wyraźne różnice pomiędzy poszczególnymi ogniwami. W MFC 1 oraz MFC 3 intensywny wzrost produkowanej mocy obserwowano już po 14 dniach od inokulacji i utrzymywał się on do około 180. dnia eksperymentu. W MFC 3 maksymalną gęstość mocy zarejestrowano w 174. dniu pracy i wyniosła ona 471 mW/m² (17 W/m³). W przypadku MFC 1 maksimum odnotowano w 170. dniu i było ono niższe o 6 % w porównaniu z MFC 3, osiągając 443 mW/m² (16 W/m³). Oba ogniwa wykazywały stabilną pracę aż do końca trwania eksperymentu. W przypadku MFC 2 zaobserwowano wydłużony okres adaptacji mikroorganizmów. Wyraźny wzrost generowanej mocy pojawił się dopiero po około 100 dniach od inokulacji. Maksymalną gęstość mocy dla

tego ogniwa odnotowano, podobnie jak w pozostałych, w 174. dniu pracy i wyniosła ona 363 mW/m^2 (14 W/m^3). Była to wartość niższa odpowiednio o 23 % i 18 % w porównaniu z MFC 3 i MFC 1.

Zaobserwowane różnice wskazują, że krótszy czas adaptacji i szybsze tempo wzrostu w MFC 1 i MFC 3 sprzyjały osiągnięciu wyższych wartości maksymalnych gęstości mocy, natomiast w MFC 2 rozwój biofilmu anodowego przebiegał wolniej, co przełożyło się na opóźnione i niższe wartości szczytowe. Takie zróżnicowanie dynamiki potwierdza kluczową rolę etapu formowania się biofilmu w determinowaniu efektywności systemu. W literaturze podkreślano, że początkowy rozwój biofilmu stanowi etap ograniczający pracę MFC [116] a jego tempo i stabilność zależą m.in. od dostępności składników odżywczych oraz składu konsorcjum mikroorganizmów [282].

Stabilizacja wartości mocy na zbliżonym poziomie we wszystkich ogniwach w końcowej fazie eksperymentu sugeruje, że po osiągnięciu dojrzałości biofilmu długoterminowa wydajność MFC stabilizuje się na porównywalnym poziomie, niezależnie od początkowego tempa adaptacji. Pomimo różnic w dynamice początkowej, stabilne biofilmy anodowe zapewniają zbliżoną efektywność konwersji energii w warunkach długotrwałej pracy.



Rysunek 46 Gęstość mocy generowana przez ogniwa MFC 1, 2, 3, rejestrowana w czasie rzeczywistym. Oznaczenie próbek: MFC 1 – wzbogacone konsorcjum anodowe z kanału ściekowego stacji paliw, MFC 2 – wzbogacone konsorcjum anodowe z separatora ropopochodnych, MFC 3 – wzbogacone konsorcjum anodowe z gleby tropikalnej.

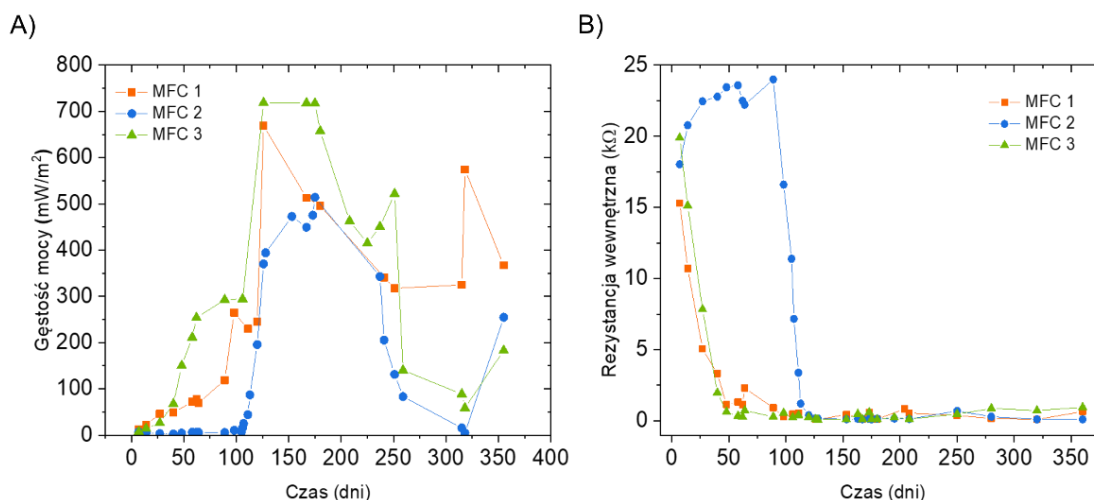
Długoterminowe zachowanie elektrochemiczne MFC

Woltamperometria liniowa

Analiza wyników uzyskanych w dwuelektrodowych eksperymentach LSV wykazała, że napięcie obwodu otwartego (OCV) w badanych ogniwach MFC mieściło się w zakresie 0,58 - 0,63 V. Najwyższą wartość odnotowano dla MFC 3, jednak pozostałe ogniwa osiągnęły wartości zbliżone. Może to wskazywać na pełne uformowanie funkcjonalnego biofilmu anodowego oraz prawidłowy przebieg transferu jonów we wszystkich układach [59]. Dynamikę zmian gęstości mocy przedstawiono na **Rysunku 47A**. Spośród analizowanych ogniw, największą gęstość mocy zarejestrowano dla MFC 3 – 719 mW/m² (26 W/m³) w 126. dniu eksperymentu. W tym samym czasie swoje maksimum osiągnęło również MFC 1, generując 669 mW/m² (24 W/m³). Natomiast MFC 2 uzyskało najwyższą wartość gęstości mocy dopiero w 175. dniu eksperymentu, wynoszącą 514 mW/m² (19 W/m³). Osiągnięte wartości maksymalne dla MFC 1 i MFC 2 były odpowiednio o 7 % i 29 % niższe niż dla MFC 3. W testach polaryzacyjnych zaobserwowano wyraźny spadek gęstości mocy po 250. dniu eksperymentu, szczególnie w przypadku MFC 2 oraz MFC 3, co może wynikać z częściowej destabilizacji biofilmu anodowego, wyczerpania dostępnych substratów lub zmian w strukturze konsorcjum mikroorganizmów. Następnie około 320. dnia odnotowano ponowny wzrost tego parametru. Obserwacje te wskazują na dynamiczne zmiany w aktywności egzoelektrogennej społeczności mikroorganizmów. Wszystkie maksymalne gęstości mocy uzyskane w niniejszym eksperymencie przewyższają dotychczasowe wartości dostępne w literaturze, która w tym obszarze pozostaje bardzo ograniczona. Najwyższa jak dotąd raportowana w gęstość mocy przy zastosowaniu ropy naftowej oraz jednoczesnej syntezie biosurfaktantów *in situ* wynosiła 525 mW/m² (6,3 W/m³). Wartość tę uzyskano w pracy Sharmy i współpracowników [283], gdzie jako inokulum zastosowano dwa szczepy zdolne do produkcji biosurfaktantów: *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Bacillus subtilis*. W tamtym eksperymencie nie stosowano kosubstratu, a stężenie ropy naftowej wynosiło 2,5 %, co odpowiada wartości około 36 razy wyższej niż w niniejszym eksperymencie. Osiągnięta w niniejszej pracy doktorskiej najwyższa gęstość mocy (26 W/m³) była ponad 4-krotnie wyższa od wspomnianych wyników literaturowych.

Analiza zmian rezystancji wewnętrznej przedstawiona na **Rysunku 47B** wykazała, że w początkowej fazie eksperymentu wszystkie układy charakteryzowały się wysokimi wartościami tego parametru (powyżej 15 kΩ). Najszybciej ustabilizowały się MFC 1 oraz MFC 3, osiągając niską rezystancję wewnętrzną w ciągu pierwszych 50 dni. Odmienny przebieg zaobserwowano dla MFC 2, w którym wysoka rezystancja utrzymywała się do około 100. dnia, a następnie gwałtownie spadła do wartości poniżej 1 kΩ. MFC 2 wykazywało zatem znacznie wydłużoną fazę wysokiej rezystancji, co może wskazywać na początkowe problemy z adaptacją mikrobiomu anodowego lub opóźnione formowanie się biofilmu przewodzącego [59]. Po ok. 100. dniu wszystkie układy wykazywały bardzo podobny, niski poziom rezystancji wewnętrznej, co potwierdza długoterminową

stabilność systemu i prawidłowe wykształcenie się biofilmu na anodzie.



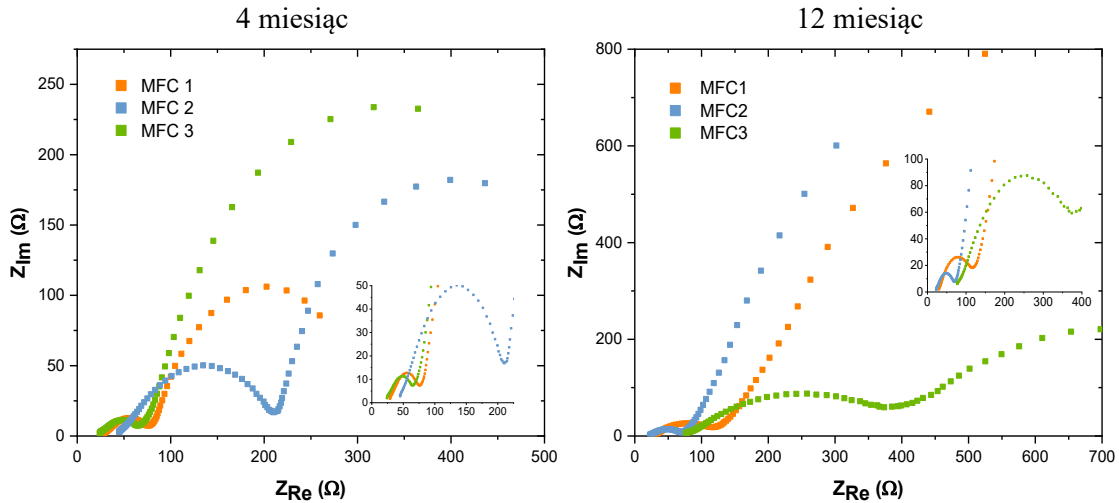
Rysunek 47 Zmiany gęstości mocy w czasie (A) oraz odpowiadające im wartości rezystancji wewnętrznej układu (B) uzyskane z pomiarów voltamperometrii liniowej dla MFC 1, MFC 2 i MFC 3 w trakcie trwania eksperymentu. Oznaczenie próbek: MFC 1 – wzbogacone konsorcjum anodowe z kanału ściekowego stacji paliw, MFC 2 – wzbogacone konsorcjum anodowe z separatora ropopochodnych, MFC 3 – wzbogacone konsorcjum anodowe z gleby tropikalnej.

Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna

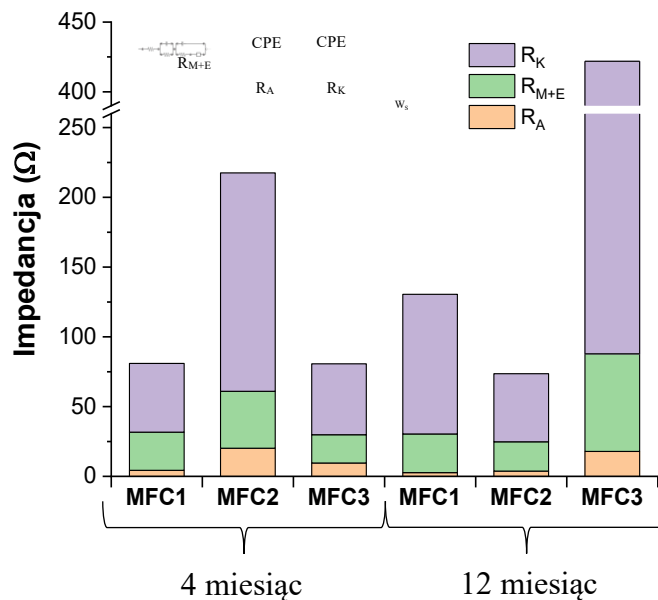
Dane uzyskane w pomiarach EIS poddano analizie przy użyciu modelu obwodu równoważnego (ECM, ang. equivalent circuit model) zgodnie z opisem Sekara i Ramasamy'ego [284]. W modelu parametr R_A odnosi się do oporu anody, R_K do oporu katody, natomiast R_{M+E} reprezentuje składowe oporu omowego wynikające głównie z obecności membrany i właściwości elektrolitu. Wprowadzono również element stałej fazy (CPE, ang. constant phase element), który odzwierciedla pojemnościowe zachowanie warstwy podwójnej na granicy elektroda–elektrolit. Parametr ten uwzględnia wpływ chropowatości i porowatości powierzchni elektrody, a także obecność biofilmu i zmiany w jego grubości [284]. W modelu zastosowano również element Warburga (W_S), który opisuje procesy dyfuzyjne w układzie. W przypadku katody odnosi się on głównie do ograniczeń transportu tlenu [285].

Otrzymane wykresy Nyquista wykazały obecność trzech półkoli, które przedstawiono na **Rysunku 48**. Analizę poszczególnych składowych impedancji zaprezentowano na **Rysunku 49**. Eksperyment EIS przeprowadzony po 4 miesiącach pracy ogniw wykazał, że najniższą sumą impedancji charakteryzowały się układy MFC 3 (80,6 Ω) i MFC 1 (80,9 Ω), podczas gdy najwyższe wartości odnotowano dla MFC 2 (217,5 Ω). Głównym czynnikiem ograniczającym w MFC 2 były opory katodowe (R_K), których wartość była trzykrotnie wyższa niż w MFC 1 i MFC 3. Najniższą impedancję anody stwierdzono dla MFC 1 (4,4 Ω) oraz MFC 3 (9,6 Ω), co wskazuje na dobrze rozwinięty biofilm anodowy na tym etapie eksperymentu. Niskie wartości R_A w tych układach mogą wynikać z korzystnych warunków dla rozwoju biofilmu oraz z obecnością

biosurfaktantów produkowanych *in situ* w układzie. Jak sugerują wcześniejsze dane literaturowe, biosurfaktanty takie jak ramnolipidy mogą sprzyjać adhezji i wzrostowi mikroorganizmów na powierzchni anody, co wspiera tworzenie stabilnego biofilmu i redukuje opór anodowy [153], [154].



Rysunek 48 Wykresy Nyquista uzyskane z testów spektroskopii impedancyjnej (EIS) w 4 i 12 miesiącu pracy poszczególnych ogniw. Oznaczenie próbek: MFC 1 – wzbogacone konsorcjum anodowe z kanału ściekowego stacji paliw, MFC 2 – wzbogacone konsorcjum anodowe z separatora ropopochodnych, MFC 3 – wzbogacone konsorcjum anodowe z gleby tropikalnej.



Rysunek 49 Analiza danych z testów spektroskopii impedancyjnej (EIS) z wykorzystaniem modelu obwodu równoważnego (ECM), przedstawionego na środku wykresu, uzyskanych po 4 i 12 miesiącach pracy ogniw. Oznaczenie próbek: MFC 1 – wzbogacone konsorcjum anodowe z kanału ściekowego stacji paliw, MFC 2 – wzbogacone konsorcjum anodowe z separatora ropopochodnych, MFC 3 – wzbogacone konsorcjum anodowe z gleby tropikalnej.

Po 12 miesiącach pracy układów zaobserwowano istotne zmiany w strukturze impedancji. Najniższą sumą impedancji charakteryzowały się ogniwa MFC 1 ($130,5 \Omega$) i MFC 2 ($73,6 \Omega$), natomiast w przypadku MFC 3 odnotowano znaczny wzrost do $421,9 \Omega$. Największy udział w rosnącej impedancji MFC 3 miał opór katody (R_K), który osiągnął wartość kilkakrotnie wyższą niż w pozostałych układach. Najczęściej wzrost oporu katody wynika z wytrącania się soli oraz tworzenia się biofilmu na powierzchni katody, co wpływa na ograniczenie dyfuzję tlenu w strefie katodowej [133], [155]. Zwiększeniu uległy także opory membrany i elektrolitu (R_{M+E}), co wskazuje na dodatkowe utrudnienia w transporcie protonów przez membranę, prawdopodobnie spowodowane zjawiskiem biofoulingu. Zjawiska te prowadzą do zmniejszenia aktywnej powierzchni reakcji oraz utrudnionego transportu masy, co skutkuje znacznym wzrostem strat wewnętrznych [286]. W długim okresie w MFC 2 zaobserwowano poprawę parametrów elektrochemicznych. Całkowita impedancja obniżyła się z $217,5 \Omega$ w 4. miesiącu do $73,6 \Omega$ po roku pracy. Spadek ten można powiązać z adaptacją społeczności mikroorganizmów oraz rozwinieniem się biofilmu anodowego, co skutkowało zmniejszeniem R_A i lepszym przewodnictwem układu [116]. Wskazuje to, że mimo początkowych trudności MFC 2 w dalszej fazie eksperymentu osiągnęło stabilny i wydajny tryb pracy.

Woltamperometria cykliczna

Eksperymenty woltamperometrii cyklicznej przeprowadzono w układzie dwuelektrodowym, a przykładowe woltamogramy przedstawiono na **Rysunku 50**. Analizowano aktywność egzoelektrogeną społeczności anodowych w 4. oraz 12. miesiącu okresu eksperymentalnego.

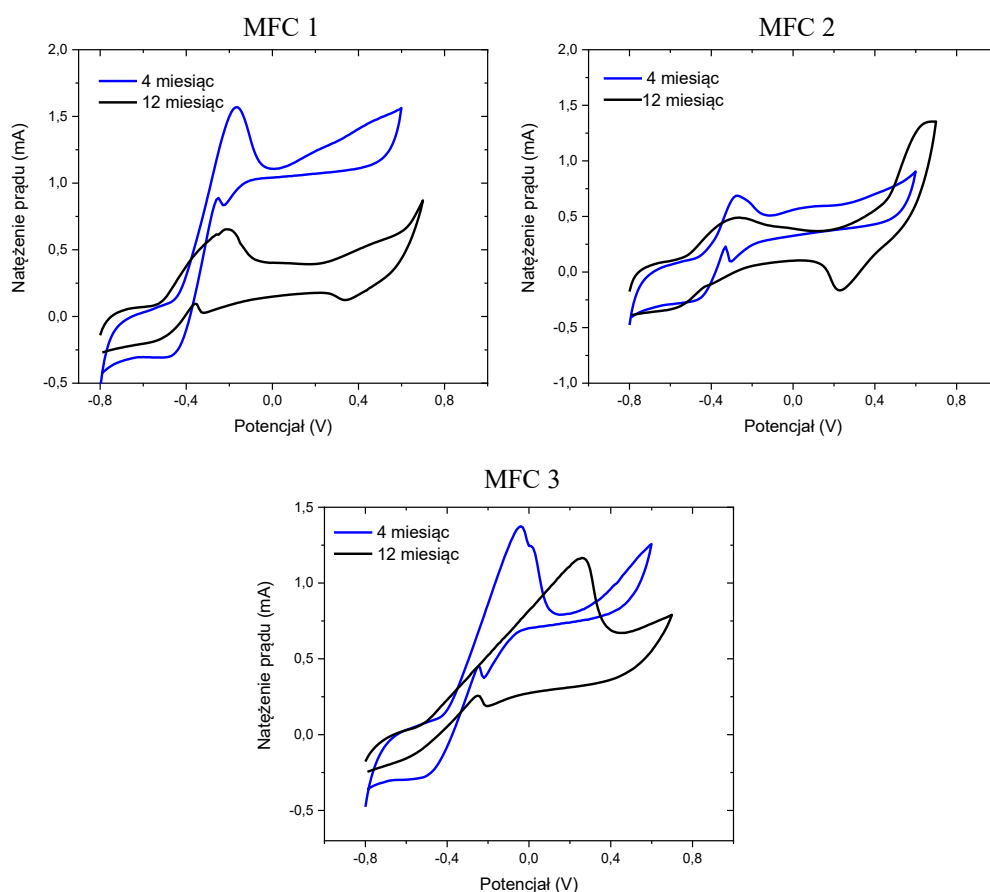
W przypadku MFC 1 w 4. oraz 12. miesiącu zarejestrowano jeden pik oksydacyjny oraz dwa sygnały redukcyjne. Maksymalne natężenie prądu dla pików utleniających w 4. miesiącu wyniosło $1,6 \text{ mA}$. W 12. miesiącu odnotowano spadek maksymalnego natężenia prądu o około 56% w porównaniu z miesiącem 4, co wskazuje na obniżenie aktywności biofilmu. Taki trend można wiązać ze starzeniem się społeczności mikroorganizmów, zmianami w strukturze biofilmu lub pogorszeniem przewodnictwa wewnątrz jego matrycy [133].

W MFC 2 w 4. miesiącu obserwowano jeden pik oksydacyjny i dwa redukcyjne, natomiast po 12 miesiącach pojawiły się już dwa sygnały oksydacyjne i dwa redukcyjne. Co istotne, maksymalne natężenie prądu zanotowano w 12. miesiącu ($1,4 \text{ mA}$), czyli wartość niemal dwukrotnie wyższą niż w miesiącu 4. Wynik ten sugeruje, że w trakcie długoterminowego działania MFC, społeczność mikroorganizmów rozwijała się w kierunku bardziej aktywnego konsorcjum, zdolnego do wydajniejszego przekazywania elektronów do elektrody. Zjawisko to jest zgodne z doniesieniami literaturowymi, w których podkreśla się selekcję egzoelektrogenów wraz z czasem pracy MFC.

W przypadku MFC 3 w 4. miesiącu zarejestrowano dwa nakładające się na siebie sygnały utleniające oraz dwa sygnały redukcyjne. Po 12 miesiącach profil uległ uproszczeniu i zaobserwowano jeden pik oksydacyjny oraz dwa redukcyjne. Najwyższe natężenie

prądu dla tego układu osiągnięto w 4. miesiącu (1,4 mA), a pod koniec eksperymentu wartość ta była niższa o około 14 %. Stosunkowo niewielki spadek prądu wskazuje jednak na wysoką stabilność biofilmu i utrzymanie aktywności elektrochemicznej w dłuższym czasie.

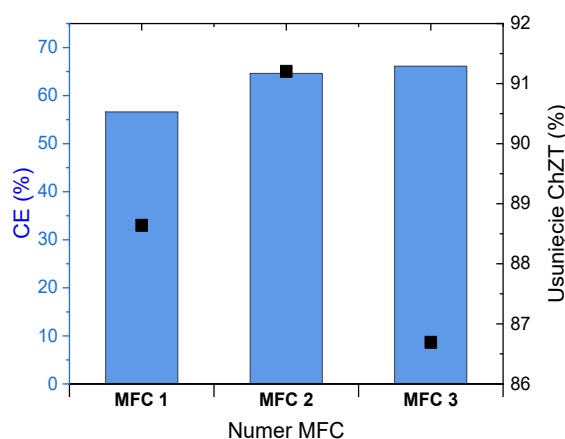
Podsumowując, najwyższą aktywność egzoelektrogeną we wczesnym etapie wykazywał układ MFC 1, natomiast po 12 miesiącach najbardziej efektywny okazał się MFC 2. MFC 3 wyróżniał się stabilnością, utrzymując podobne wartości prądów w trakcie całego okresu eksperymentalnego. Zmiany liczby i intensywności pików redoks wskazują na dynamiczną ewolucję społeczności mikroorganizmów oraz na możliwe zmiany w dominujących mechanizmach transferu elektronów. Mimo ograniczeń wynikających z pracy w konfiguracji dwuelektrodowej, analiza CV pozwoliła uchwycić kluczowe trendy rozwoju i spadku aktywności elektrochemicznej w badanych układach.



Rysunek 50 Woltamogramy cykliczne dla MFC 1, MFC 2 oraz MFC 3 w 4. i 12. miesiącu eksperymentu. Oznaczenie próbek: MFC 1 – wzbogacone konsorcjum anodowe z kanału ściekowego stacji paliw, MFC 2 – wzbogacone konsorcjum anodowe z separatora ropopochodnych, MFC 3 – wzbogacone konsorcjum anodowe z gleby tropikalnej.

Usunięcie ChZT oraz efektywność kulombowska ogniw

Po siedmiu miesiącach trwania eksperymentu we wszystkich analizowanych układach MFC odnotowano wysokie wartości usunięcia ChZT, co świadczy o efektywnej degradacji związków ropopochodnych. Zestawienie uzyskanych wartości efektywności kulombowskiej oraz stopnia usunięcia ChZT przedstawiono na **Rysunku 51**. Najwyższy stopień usunięcia ChZT osiągnięto w ogniwie MFC 2 (91 %), natomiast najniższy w MFC 3 (86 %). Różnice te, mimo że relatywnie niewielkie, wskazują na pewne zróżnicowanie w aktywności społeczności mikrobiologicznych pomiędzy poszczególnymi układami. Uzyskane wartości usunięcia ChZT (powyżej 86 %) mogą świadczyć także o produkcji biosurfaktantów w układach, które wpływając na biodostępność hydrofobowych substratów ułatwiają ich rozkład i usuwanie.



Rysunek 51 Efektywność kulombowska (CE, przedstawiona w formie słupków) oraz usunięcie ChZT (przedstawione w formie kwadratów), zmierzone po siedmiu miesiącach trwania eksperymentu. Oznaczenie próbek: MFC 1 – wzbogacone konsorcjum anodowe z kanału ściekowego stacji paliw, MFC 2 – wzbogacone konsorcjum anodowe z separatora ropopochodnych, MFC 3 – wzbogacone konsorcjum anodowe z gleby tropikalnej.

Co istotne, najniższa wartość usunięcia ChZT (MFC 3) była związana z najwyższą efektywnością kulombowską (CE = 66 %). Wskazuje to na bardzo wydajny transfer elektronów do anody, jednak niższe usunięcie ChZT mogło być związane z obecnością i akumulacją biosurfaktantów produkowanych w tym układzie. Związki te, jako część materii organicznej oznaczanej w ChZT, mogły wpływać na pozornie niższy stopień usunięcia wskaźnika [178].

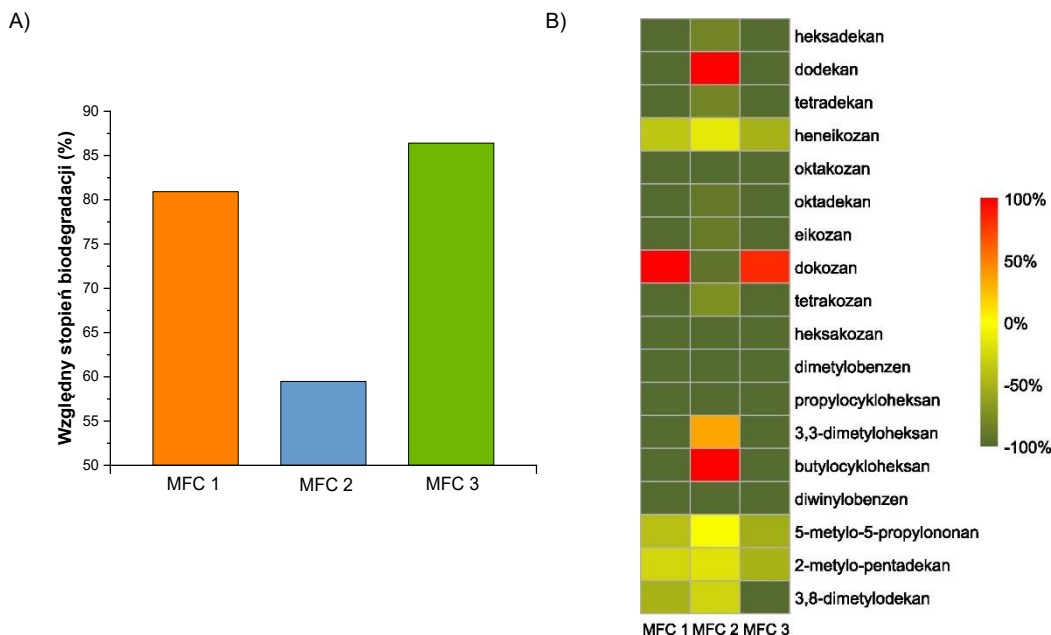
We wszystkich badanych układach MFC uzyskano wartości efektywności kulombowskiej przekraczające 57 %, co należy uznać za rezultat bardzo dobry w porównaniu z danymi literaturowymi. W dostępnych pracach eksperymentalnych dotyczących degradacji węglowodorów ropopochodnych w MFC wartości efektywności kulombowskiej (CE) raportowane są stosunkowo rzadko, jednak zazwyczaj mieszczą się one w zakresie od około 0,5 % do 23 % [189], [287]. Podkreśla to wysoką efektywność zastosowanych w niniejszym eksperymencie układów oraz aktywność mieszanych konsorcjów mikroorganizmów. Co istotne, uzyskane wartości CE należą do najwyższych dotychczas raportowanych w kontekście degradacji związków ropopochodnych w MFC.

4.3.2.3. Stopień biodegradacji ropy naftowej w ogniwach

Skład anolitu został oznaczony za pomocą metody GC-MS, pod koniec cyklu pracy w MFC. Względny stopień biodegradacji składników ropy naftowej przedstawiono na **Rysunku 52A**. Najwyższy poziom degradacji wszystkich związków wykrytych metodą GC-MS odnotowano MFC 3 (86,4 %), następnie w MFC 1 (80,9 %) oraz w MFC 2 (60,0 %). Różnice te wskazują, że skuteczność biodegradacji była determinowana przez skład mikroflory zaszczipionej do poszczególnych ogniw.

Szczegółowy rozkład biodegradacji poszczególnych komponentów przedstawiono na **Rysunku 52B**. We wszystkich ogniwach zaobserwowano całkowitą biodegradację takich związków jak: oktakozań, heksakozań, dimetylobenzen, propylocykloheksan oraz diwinylobenzen, co wskazuje na szeroki potencjał metaboliczny mikroorganizmów obecnych w komorach anodowych. Dodatkowo w MFC 1 i MFC 3 całkowitemu usunięciu uległy także heksadekan, dodekan, tetradekan, oktadekan, eikozan, tetrakozań, 3,3-dimetyloheksan oraz butylocykloheksan. Analiza ilościowa wykazała jednak pewne różnice między ogniwami. W MFC 1 i 3 obserwowano akumulację lub produkcję dokozań, podczas gdy w MFC 2 nastąpiło jego całkowite usunięcie. Zjawisko to sugeruje, że dokozań może być produktem pośrednim w szlaku degradacji dłuższych węglowodorów, którego dalszy metabolizm przebiega w różny sposób w zależności od obecności specyficznych mikroorganizmów lub dostępnych warunków środowiskowych. Odmienny wzorzec zaobserwowano w przypadku dodekanu, 3,3-dimetyloheksanu oraz butylocykloheksanu. Związki te akumulowały się w MFC 2, natomiast w MFC 1 i 3 zostały całkowicie usunięte. Ponadto w przypadku MFC 2 degradacja takich węglowodorów jak tetradekan, heneikozan, heksadekan, oktadekan, eikozan czy tetrakozań przebiegała w sposób niepełny. Wyniki te potwierdzają, że n-alkany o dłuższych łańcuchach węglowych, charakteryzują się większą odpornością na biodegradację [288]. Niecałkowitą degradację zarejestrowano również dla 5-metylo-5-propylononanu oraz 2-metylo-pentadekanu we wszystkich ogniwach, co wskazuje, że rozgałęzione struktury węglowodorów stanowią trudniejszy substrat metaboliczny w porównaniu do prostych alkanów [288].

Profil związków ropopochodnych po procesie degradacji był bardzo podobny w MFC 1 i MFC 3, co wskazuje na podobieństwo procesów metabolicznych zachodzących w tych układach. Jediną wyraźną różnicę odnotowano w przypadku 3,8-dimetylododekanu. W MFC 3 uległ on całkowitej biodegradacji, natomiast w MFC 1 jego degradacja była niepełna (około 50 %). Wynik ten może wskazywać na obecność specyficznych drobnoustrojów w biofilmie anodowym MFC 3, zdolnych do efektywnego metabolizmu bardziej złożonych struktur węglowodorowych.



Rysunek 52 A) Względny stopień usunięcia wszystkich związków wykrytych za pomocą metody GC-MS, B) Względna zmiana powierzchni sygnałów wykrytych związków w anolitech MFC degradujących ropę naftową i octan. Oznaczenie próbek: MFC 1 – wzbogacone konsorcjum anodowe z kanału ściekowego stacji paliw, MFC 2 – wzbogacone konsorcjum anodowe z separatora ropopochodnych, MFC 3 – wzbogacone konsorcjum anodowe z gleby tropikalnej.

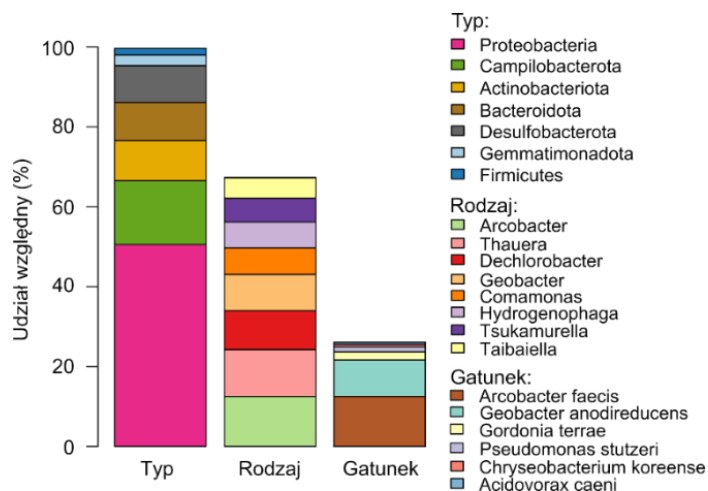
4.3.2.4. Analiza struktury społeczności mikroorganizmów

W celu identyfikacji taksonomicznej społeczności mikroorganizmów zasiedlających anodę mikrobiologicznego ogniwa paliwowego przeprowadzono analizę sekwencji genu 16S rRNA. Spośród trzech badanych ogniw w niniejszym eksperymencie do dalszej analizy wybrano MFC 3, ponieważ wykazywało ono najefektywniejsze parametry pracy takie jak najwyższa produkowana gęstość mocy, najwyższa wartość efektywności kulombowskiej oraz najwyższy stopień biodegradacji związków ropopochodnych. Skupienie się na tym wariancie pozwoliło na szczegółową charakterystykę społeczności mikrobiologicznej w układzie najbardziej wydajnym i reprezentatywnym dla omawianych procesów. Analiza umożliwiła określenie składu taksonomicznego społeczności mikrobiologicznej obecnej w komorze anodowej tego ogniwa, którą przedstawiono na **Rysunku 53**.

Analiza sekwencji genu 16S rRNA wykazała, że 100 % zsekwencjonowanych odczytów przypisano do królestwa Bakterii. Na poziomie typu dominowały przedstawiciele *Proteobacteria* (50,5 %), wśród których szczególnie licznie reprezentowane były *Gammaproteobacteria* (42,8 %). Kolejne pod względem udziału były: *Campilobacterota* (16,0 %), *Actinobacteriota* (10,1 %), *Bacteroidota* (9,5 %) oraz *Desulfobacterota* (9,2 %).

Na poziomie rodzaju najliczniej reprezentowane były: *Arcobacter* (12,5 %), *Thauera* (11,7 %), *Dechlorobacter* (9,8 %), *Geobacter* (9,1 %), *Comamonas* (6,6 %), *Hydrogenophaga* (6,5 %), *Tsukamurella* (5,97 %) oraz *Taibaiella* (5,2 %).

Szczególnie istotny jest udział *Geobacter*, znanego ze zdolności do bezpośredniego przekazywania elektronów na anodę, co mogło mieć kluczowe znaczenie dla wydajności bioelektrochemicznej tego układu [289]. Obecność rodzajów takich jak *Arcobacter* i *Thauera* wskazuje dodatkowo na zdolności do rozkładu złożonych związków organicznych oraz udział w procesach redukcji azotanów [255], [290].



Rysunek 53 Analiza społeczności mikrobiologicznej na poziomach taksonomicznych: typu, rodzaju i gatunku we wzgobacym konsorcjum anodowym z gleby tropikalnej (MFC 3).

Na poziomie gatunku największy udział miały *Arcobacter faecis* (12,5 %) oraz *Geobacter anodireducens* (9,1 %). Obecność *A. faecis* jest szczególnie interesująca, ponieważ dotąd nie ma bezpośrednich doniesień o roli tego rodzaju w układach MFC. W literaturze jednak opisano, że inny szczep pochodzący z tego samego rodzaju: *Arcobacter butzleri* został wyizolowany z biofilmu anodowego i wykazywał zdolność do generacji prądu w układzie MFC z octanem jako substratem [291]. Wskazuje to, że niektóre gatunki z rodzaju *Arcobacter* mogą wykazywać aktywność egzoelektrogeną. W przypadku *A. faecis* można przypuszczać, że odgrywa on rolę w generacji prądu w MFC, jednak całkowite potwierdzenie tego założenia wymaga dalszych badań eksperymentalnych. *Geobacter anodireducens* jest jednym z najlepiej poznanych egzoelektrogenów. Sun i in. [292] wykazali, że może on generować wysoką gęstość prądu w systemach bioelektrochemicznych, a jego genom zawiera liczne geny kodujące cytochromy typu c oraz białka odpowiedzialne za transfer elektronów. Obecność tego gatunku w analizowanym układzie wskazuje, że biofilm anodowy charakteryzował się wysokim potencjałem do efektywnego przekazywania elektronów na elektrodę, co mogło mieć kluczowe znaczenie dla wydajności pracy MFC.

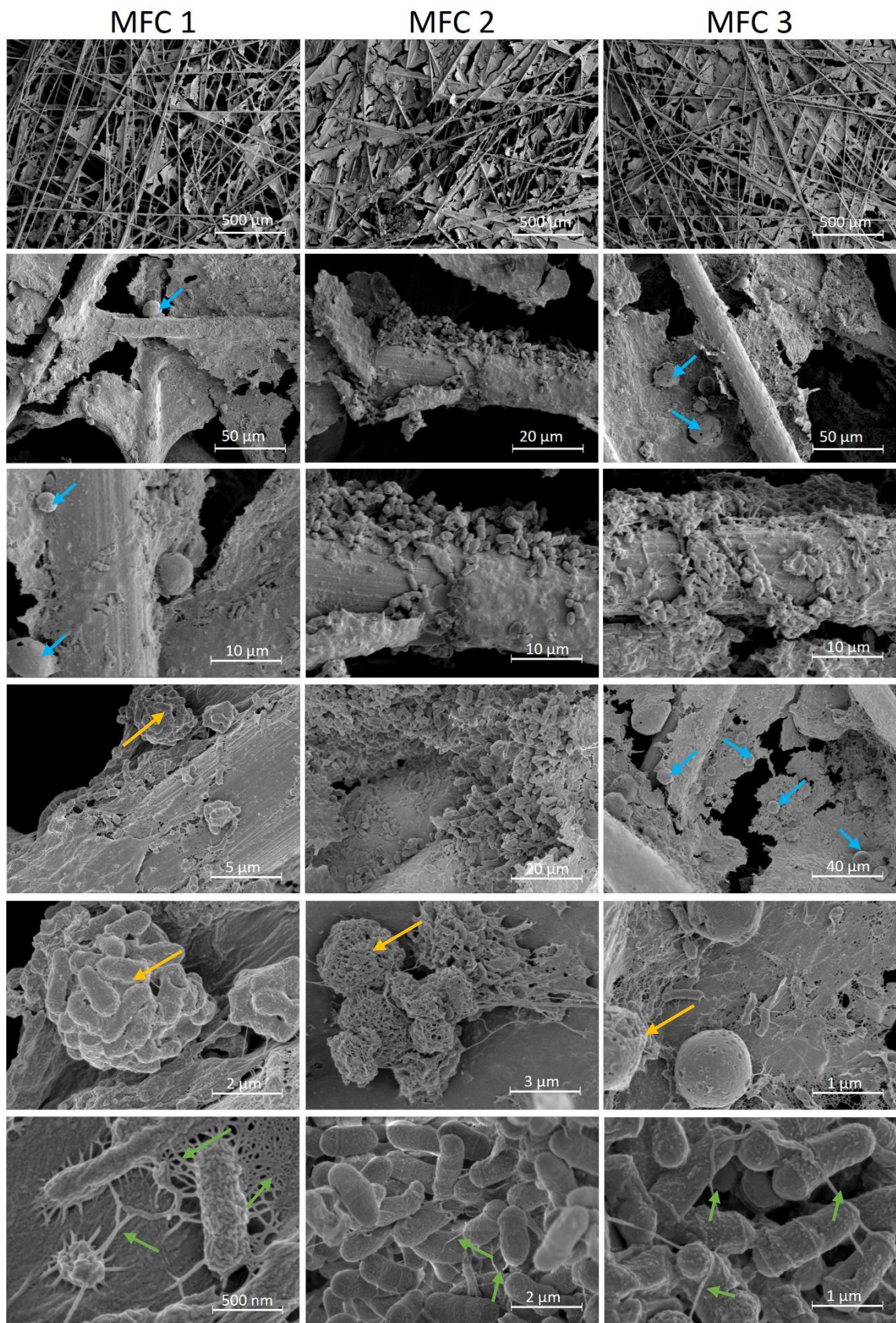
W mniejszych ilościach zidentyfikowano *Gordonia terrae* (2,0 %), *Pseudomonas stutzeri* (1,3 %), *Chryseobacterium koreense* (0,6 %) oraz *Acidovorax caeni* (0,5 %). *Gordonia terrae* jest opisywany w literaturze jako gatunek zdolny do biodegradacji węglowodorów ropopochodnych oraz wskazuje się na jego potencjał w procesach bioremediacji [293]. Z kolei *Pseudomonas stutzeri* jest gatunkiem łączącym kilka kluczowych cech istotnych w kontekście pracy ogniw MFC zasilanych związkami ropopochodnymi. Wykazano,

że bakterie z tego rodzaju posiadają zdolność do degradacji związków organicznych, są egzoelektrogenne oraz są zdolne do syntezy biosurfaktantów. Li i in. [294] udowodnili, że *P. stutzeri* może przekazywać elektrony na anodę za pośrednictwem cytochromów i mediatorów redoks, takich jak ryboflawiny, co potwierdza jego potencjał jako katalizatora anodowego. Ponadto Shekhar i in. [295] opisali zdolność tego gatunku do syntezy biosurfaktantów, które zwiększają biodostępność hydrofobowych frakcji ropopochodnych, wspierając tym samym proces biodegradacji. Oba te gatunki, pomimo mniejszego udziału procentowego w komorze anodowej, mogły znacząco wspierać procesy biodegradacji i zwiększać wydajność pracy ogniwa. *Chryseobacterium koreense* i *Acidovorax caeni* nie są tak dobrze udokumentowane pod kątem egzoelektrogenności, produkcji biosurfaktantów czy degradacji związków ropopochodnych. Ich obecność może świadczyć o roli pomocniczej, np. w przetwarzaniu produktów pośrednich lub stabilizacji struktury społeczności mikroorganizmów anodowych.

Warto podkreślić, że aż 72,02 % sekwencji przypisano do grupy niezidentyfikowanych gatunków. Może to świadczyć o obecności unikalnej, dotychczas nieopisanej społeczności mikroorganizmów, potencjalnie zdolnych do produkcji biosurfaktantów, generacji prądu oraz rozkładu związków ropopochodnych. Odkrycie to wskazuje na możliwość istnienia nowych, nieznanych jeszcze drobnoustrojów o istotnym znaczeniu dla funkcjonowania mikrobiologicznych ogniw paliwowych. Zjawisko to wymaga jednak dokładniejszych badań oraz zastosowania uzupełniających technik identyfikacyjnych, które pozwolą lepiej scharakteryzować dotychczas nieopisane szczepy.

4.3.2.5. Analiza morfologii biofilmu bakteryjnego

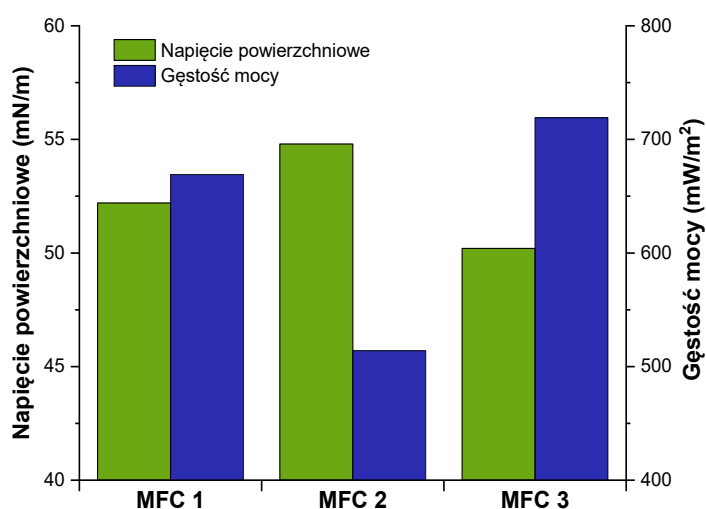
Mikrofotografie skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) biofilmów anodowych, wykonane po zakończeniu okresu pracy, przedstawiono na **Rysunku 54**. We wszystkich układach biofilm tworzył zwartą, wielowarstwową strukturę silnie zakotwiczoną w matrycy włókien węglowych, przy jednoczesnym zróżnicowaniu tekstury oraz gęstości populacji komórek. Największą grubość i zagęszczenie wykazywał układ MFC 3. Na pozostałych anodach gęstość komórek była nieco niższa, lecz pokrycie powierzchni pozostawało ciągłe. Morfologia komórek była zróżnicowana: dominowały formy pałeczkowate, ale obecne były również komórki kuliste. Zaobserwowano sferyczne agregaty komórek drobnoustrojów (żółte strzałki). Struktury te mogą enkapsulować hydrofobowy substrat, co potencjalnie zwiększa jego lokalną dostępność i ułatwia degradację. W próbkach MFC 1 i MFC 3 uwidoczniono krople substratu ropy naftowej (niebieskie strzałki), co wskazuje na miejscową akumulację substratu i jego bezpośredni kontakt z biofilmem anodowym. W przypadku MFC 3 krople były drobniejsze i bardziej równomiernie rozmieszczone, co może świadczyć o efektywniejszej emulgacji prowadzonej przez biosurfaktanty i lepszej biodostępności substratu dla biofilmu. W ostatnim wierszu obrazów SEM zaznaczono obecność przewodzących nanowłókien białkowych egzoelektrogenów (zielone strzałki), co wskazuje na istotny udział bezpośredniego transferu elektronów (DET) do anody i może tłumaczyć utrzymującą się wysoką gęstość mocy produkowaną w badanych układach.



Rysunek 54 Analiza morfologii biofilmu anodowego, zdjęcia SEM. Oznaczenia: niebieskie strzałki: krople substratu, żółte strzałki: sferyczne skupiska bakterii, zielone strzałki: przewodzące nanowłókna białkowe egzoelektrogenów.

4.3.2.6. Analiza biosurfaktantów uzyskanych w wyniku bioelektrosyntezy

Aktywność syntezy biosurfaktantów w badanym układzie monitorowano na podstawie zmian napięcia powierzchniowego anoditów. Na **Rysunku 55** przedstawiono porównanie minimalnych wartości napięcia powierzchniowego anoditów z maksymalnymi gęstościami mocy uzyskanymi podczas eksperymentu. Dla próby kontrolnej, zawierającej medium MSM z dodatkiem ropy naftowej oraz octanu, napięcie powierzchniowe wynosiło $68,6 \pm 2,1$, Najniższe napięcie powierzchniowe anoditu o wartości 50,2 mN/m, zarejestrowano dla MFC 3, następnie dla MFC 1 (52,2 mN/m) oraz dla MFC 2 (54,8 mN/m).

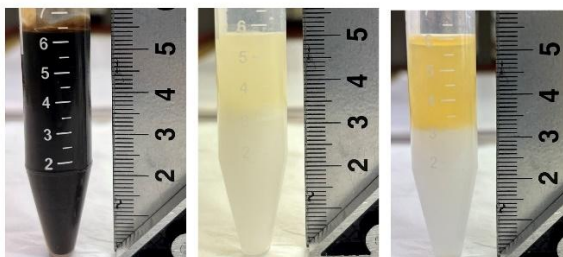


Rysunek 55 Analiza porównawcza najniższych wartości napięcia powierzchniowego oraz maksymalnych wartości gęstości mocy zarejestrowanych podczas eksperymentu. Oznaczenie próbek: MFC 1 – wzbogacone konsorcjum anodowe z kanału ściekowego stacji paliw, MFC 2 – wzbogacone konsorcjum anodowe z separatora ropopochodnych, MFC 3 – wzbogacone konsorcjum anodowe z gleby tropikalnej.

Zaobserwowano wyraźną zależność pomiędzy obniżeniem napięcia powierzchniowego a wzrostem gęstości mocy, co wskazuje, że aktywność biosurfaktantów mogła istotnie wpływać na efektywność procesu bioelektrosyntezy. W kontekście zastosowanego substratu (ropy naftowej), obniżenie napięcia powierzchniowego mogło prowadzić do zwiększenia biodostępności związków hydrofobowych dla mikroorganizmów, ułatwiając ich metabolizowanie i tym samym intensyfikując przepływ elektronów w układzie. Uzyskane wyniki sugerują, że w ogniwach MFC o wyższej gęstości mocy zachodziła jednocześnie bardziej aktywna produkcja biosurfaktantów, co potwierdza możliwość synergicznego oddziaływania pomiędzy procesami metabolicznymi mikroorganizmów, poprawą biodostępności substratu oraz wzrostem wydajności elektrochemicznej układu.

W celu potwierdzenia obecności związków powierzchniowo czynnych w anodzie wykonano również testy emulsyfikacji (E_{24}), a uzyskane wyniki przedstawiono w postaci fotografii na **Rysunku 56**. Analizie poddano anolit pochodzący z MFC 3 (początkowo inokulowany wzbogaconym konsorcjum anodowym z gleby tropikalnej), zasilanego ropą

naftową oraz octanem. Uzyskane wyniki wykazały wysoką aktywność emulgującą wobec wszystkich testowanych substratów hydrofobowych. Wskaźnik E_{24} wyniósł 100 % dla ropy naftowej i oleju roślinnego oraz 96 % dla kwasu oleinowego. Tak wysokie wartości wskaźnika emulsyfikacji potwierdzają obecność biosurfaktantów wytwarzanych przez mikroorganizmy zasiedlające komorę anodową. Ich aktywność mogła sprzyjać rozproszeniu kropli węglowodorów i zwiększeniu biodostępności substratu dla biofilmu anodowego, co w konsekwencji mogło prowadzić do wyższej efektywności procesów biodegradacji.



Rysunek 56 Testy emulsyfikacji anolitów z MFC 3 (wzbogacone konsorcjum anodowe z gleby tropikalnej), zasilanego ropą naftową oraz octanem. Od lewej: ropa naftowa ($E_{24}=100\%$), olej roślinny ($E_{24}=100\%$) i kwas oleinowy ($E_{24}=96\%$).

W niniejszym eksperymencie test emulsyfikacji (E_{24}) wykonany dla anolitów z mikrobiologicznych ogniw paliwowych wykazał bardzo wysokie wartości emulsyfikacji w zakresie 96-100 % po 24 godzinach inkubacji. Tak wysoki indeks wskazuje na silne właściwości powierzchniowo czynne biosurfaktantów syntetyzowanych *in situ* w środowisku anodowym oraz ich znaczący wpływ na biodostępność frakcji węglowodorowych. Dla porównania, w dostępnej literaturze uzyskiwano znacznie niższe wartości tego parametru. W pracy Naaz i in. [296], w której zastosowano MFC z modyfikowaną anodą nanocząstkami Fe_2O_3 , wartości E_{24} wynosiły 87-89 %, natomiast w klasycznych hodowlach bakteryjnych odnotowano istotnie niższe wartości, wynoszące około 65 % [297].

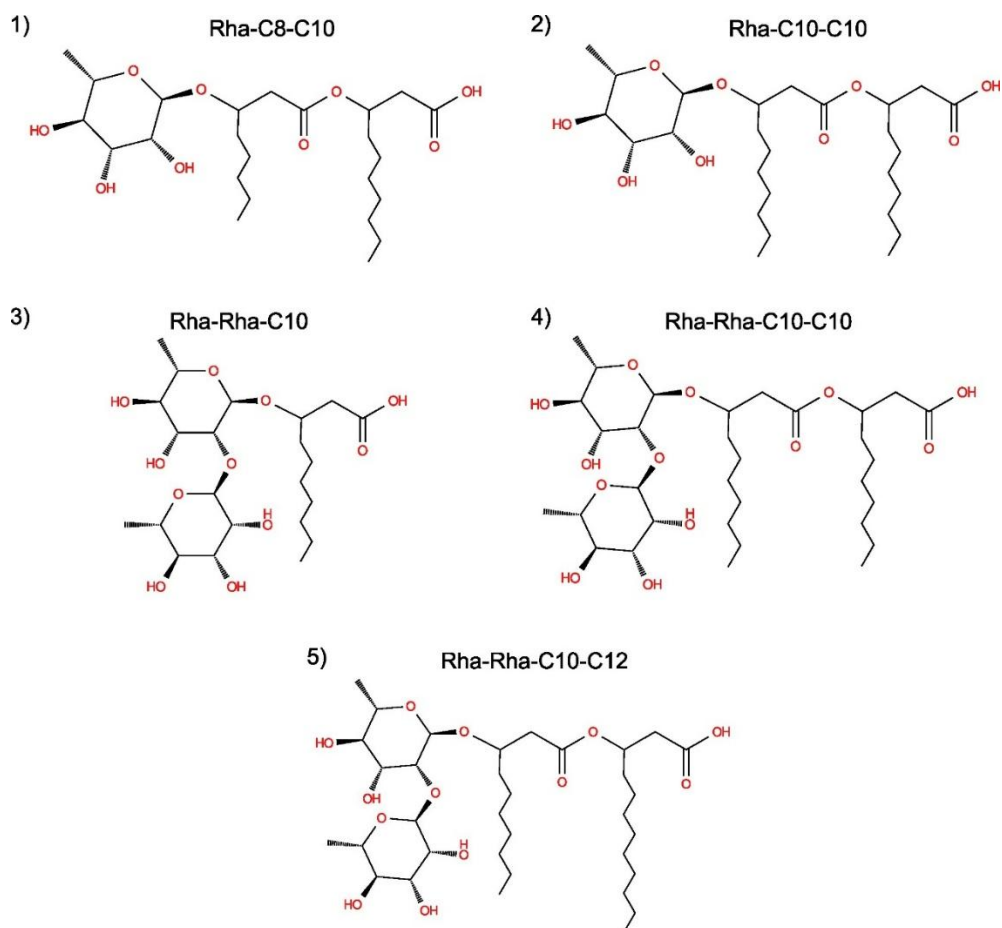
Uzyskane w niniejszej pracy wyniki potwierdzają, że biosurfaktanty syntetyzowane przez mikroorganizmy konsorcjów anodowych charakteryzują się wyższą aktywnością emulgującą niż dotychczas raportowane w literaturze, co może świadczyć o ich szczególnej skuteczności w zwiększaniu biodostępności frakcji ropopochodnych i wspieraniu procesów biodegradacji w układach bioelektrochemicznych.

W celu identyfikacji chemicznej biosurfaktantów obecnych w anolicie przeprowadzono ich ekstrakcję metodą SPE z wykorzystaniem fazy C18, a następnie analizę przy użyciu techniki LC-MS/MS w trybie jonizacji ujemnej. Analiza widm masowych pozwoliła na identyfikację pięciu struktur ramnolipidowych, obejmujących zarówno monoramnolipidy, jak i diramnolipidy. Obecność tych związków potwierdzono na podstawie wartości stosunku masy do ładunku (m/z) zgodnych z danymi referencyjnymi dostępnymi w literaturze. Wartości m/z oraz odpowiadające im czasy retencji dla poszczególnych zidentyfikowanych ramnolipidów zestawiono w **Tabeli 16**.

Tabela 16 Biosurfaktanty zidentyfikowane w próbkach anolitów z MFC degradujących ropę naftową i octan. Oznaczenie próbek: MFC 1 – wzbogacone konsorcjum anodowe z kanału ściekowego stacji paliw, MFC 2 – wzbogacone konsorcjum anodowe z separatora ropopochodnych, MFC 3 – wzbogacone konsorcjum anodowe z gleby tropikalnej.

L.p.	m/z	Ramnolipidy	Wzór sumaryczny	Czas retencji [min]	ID z bazy Lipidmaps	MFC
1	475,2907	Rha-C8-C10/Rha-C10-C8	C ₂₄ H ₄₄ O ₉	2,94	LMFA13030010	MFC1, MFC2, MFC3
2	503,3220	Rha-C10-C10	C ₂₆ H ₄₈ O ₉	2,76	LMFA13030001	MFC1, MFC3
3	479,2492	Rha-Rha-C10	C ₂₂ H ₄₀ O ₁₁	2,65	LMFA13030006	MFC3
4	649,3799	Rha-Rha-C10-C10	C ₃₂ H ₅₈ O ₁₃	2,65	LMFA13030005	MFC1, MFC2, MFC3
5	677,4112	Rha-Rha-C10-C12/Rha-Rha-C12-C10	C ₃₄ H ₆₂ O ₁₃	2,85	-	MFC1, MFC2, MFC3

W wyniku analizy LC-MS/MS zidentyfikowano pięć dominujących struktur ramnolipidowych, różniących się długością łańcuchów węglowodorowych oraz ilością pierścieni ramnozowych. Wśród nich obecne były monoramnolipidy i diramnolipidy. Trzy spośród zidentyfikowanych ramnolipidów: *Rha-C8-C10*, *Rha-Rha-C10-C10* oraz *Rha-Rha-C10-C12*, występowały we wszystkich analizowanych próbkach (MFC 1, MFC 2 i MFC 3), co wskazuje na ich powszechną biosyntezę w badanych układach. Monoramnolipid *Rha-C10-C10* był unikalny dla MFC 1 i MFC 3, natomiast diramnolipid *Rha-Rha-C10* wykryto wyłącznie w MFC 3. Otrzymane wartości stosunku masy do ładunku (m/z) oraz czasy retencji były zgodne z danymi referencyjnymi z bazy LIPID MAPS, co potwierdza wiarygodność identyfikacji. Struktury zidentyfikowanych ramnolipidów przedstawiono na **Rysunku 57**. Największe zróżnicowanie profilu ramnolipidów stwierdzono w MFC 3, co może świadczyć o intensywniejszej biosyntezie związków powierzchniowo czynnych przez mikroorganizmy zasiedlające ten układ.



Rysunek 57 Wzory strukturalne ramnolidów zidentyfikowanych w próbkach anolitów pochodzących z MFC wykorzystywanych do degradacji ropy naftowej oraz octanu sodu.

4.3.2.7. Podsumowanie i wnioski

Celem przeprowadzonego etapu badań było sprawdzenie, jak wzbogacone konsorcja mikroorganizmów anodowych zachowują się w większych układach MFC, przy jednoczesnej ocenie ich zdolności do biodegradacji frakcji ropopochodnych, syntezy biosurfaktantów oraz generacji energii elektrycznej. W tym celu zwiększono skalę układów poprzez ponad czterokrotne zwiększenie objętości roboczej komory anodowej oraz trzykrotne zwiększenie powierzchni aktywnej anody. Dane zestawiono w **Tabeli 17**, obejmujące m.in. maksymalną gęstość mocy generowaną przez układ oraz najniższe napięcie powierzchniowe zarejestrowane dla próbek anolitów podczas okresu eksperymentalnego, co pozwala porównać parametry pracy MFC przed i po podniesieniu skali układu.

Po zwiększeniu skali układów, gęstość mocy wzrosła o 281 % w MFC 1, o 3,8 % w MFC 2 oraz o 256 % w MFC 3, przy czym najwyższe parametry elektrochemiczne uzyskano w MFC 3 zaszczerpionym wzbogaconym konsorcjum z gleby tropikalnej. Wraz ze wzrostem gęstości mocy obserwowano obniżenie napięcia powierzchniowego, co wskazuje na zwiększoną produkcję związków powierzchniowo czynnych, ułatwiających formowanie biofilmu i poprawiających biodostępność węglowodorów.

Tabela 17 Porównanie parametrów charakteryzujących wydajność MFC przed oraz po podniesieniu skali układów.

Nr MFC	Inokulum	Moc (W/m ³)	Moc (mW/m ²)	Usunięcie ChZT (%)	CE (%)	Stopień degradacji (%)	Najniższe napięcie powierzchniowe (mN/m)
MFC 6*	Kanał ściekowy w okolicy stacji paliw	6,3	120	-	-	-	63,0
MFC 1	Wzbogacone konsorcjum anodowe z kanału ściekowego stacji paliw	24	669	88	57	80,9	52,2
MFC 8*	Separator substancji ropopochodnych na stacji paliw	18,3	350	-	-	-	61,7
MFC 2	Wzbogacone konsorcjum anodowe z separatora ropopochodnych	19	514	91	62	60	54,8
MFC 4*	Gleba tropikalna (Sri Lanka)	7,3	140	-	-	-	62,1
MFC 3	Wzbogacone konsorcjum anodowe z gleby tropikalnej	26	719	86	66	86,4	50,2

*wyniki uzyskane dla układów przed podniesieniem skali pochodzą z rozdziału 4.3.1.

Maksymalna gęstość mocy w MFC 3 wyniosła 26 W/m³ (719 mW/m²), co stanowi najwyższą wartość uzyskaną dotychczas dla MFC pracujących na produktach ropopochodnych. W literaturze dostępne są tylko dwie prace eksperymentalne w podobnym temacie i pochodzą one z lat 2022-2023. W porównaniu z wcześniejszymi pracami, w których maksymalne wartości mocy wynosiły odpowiednio 6,3 W/m³ [283] oraz 10,2 W/m³ [298], uzyskany wynik był ponad 2,5-krotnie wyższy. Wysoką efektywność MFC 3 tłumaczy połączenie trzech czynników: zastosowanie wzbogaconych konsorcjów mikroorganizmów przystosowanych do pracy w MFC, wprowadzenie kosubstratu w postaci octanu stymulującego metabolizm egzoelektrogenów oraz intensywna produkcja biosurfaktantów.

Wykrycie ramnolipidów (mono- oraz diramnolipidów) we wszystkich analizowanych układach potwierdza zdolność zastosowanych konsorcjów do syntezy biosurfaktantów *in situ* przy wykorzystaniu frakcji ropopochodnych jako substratu. Produkowane związki zwiększały biodostępność hydrofobowych substratów, wspierały formowanie i stabilizację biofilmu anodowego, a tym samym poprawiały parametry elektrochemiczne

układów. Należy podkreślić, że ich obecność wpływała na wartości oznaczeń ChZT, co doprowadziło do rozbieżności pomiędzy efektywnością usunięcia ChZT a rzeczywistym stopniem biodegradacji ustalonym metodą GC-MS. Najwyższy stopień biodegradacji odnotowano w MFC 3 (wzbogacone konsorcjum z gleby tropikalnej), natomiast najwyższe usunięcie ChZT w MFC 2 (wzbogacone konsorcjum z separatora ropopochodnych), co potwierdza, że klasyczne wskaźniki obciążenia organicznego mogą przeszacowywać faktyczny poziom pozostałego zanieczyszczenia w obecności biosurfaktantów.

Analiza społeczności anodowej wykazała dominację taksonów egzoelektrogennych, w tym *Geobacter anodireducens* oraz *Arcobacter faecis*, którego udział może sugerować nową, dotąd nieopisaną rolę w procesach transferu elektronów. Gatunki takie jak *Pseudomonas stutzeri* i *Gordonia terrae* wskazują na możliwą synergiczną interakcję pomiędzy procesami degradacji węglowodorów, syntezą biosurfaktantów i aktywnością elektrochemiczną. Wysoki udział niezidentyfikowanych gatunków (72 %) sugeruje obecność nowych, dotąd nieopisanych drobnoustrojów istotnych dla funkcjonowania układu. Zjawisko to wskazuje na potrzebę pogłębionych badań funkcjonalnych i molekularnych, które pozwolą lepiej scharakteryzować ich rolę w procesach bioelektrochemicznych.

W dłuższym okresie pracy czynnikiem ograniczającym wydajność układu okazała się strona katodowa. Narastający opór wewnętrzny oraz procesy biofoulingu obniżały efektywność konwersji energii, mimo stabilnej aktywności anodowej. Wskazuje to na konieczność równoległej optymalizacji zarówno składu mikrobiologicznego mikrobiomu anodowego, jak i materiałów tworzących katodę.

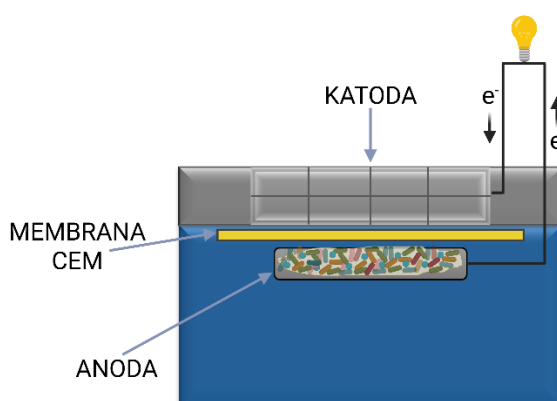
Otrzymane wyniki stanowią pierwszy kompleksowy dowód na to, że równoczesna biodegradacja frakcji ropopochodnych, biosynteza biosurfaktantów i generacja energii elektrycznej mogą być skutecznie realizowane w jednym układzie bioelektrochemicznym. Wskazują również na duży potencjał tej technologii w zastosowaniach środowiskowych i energetycznych. Integracja precyzyjnej kontroli konsorcjów mikroorganizmów z optymalizacją konstrukcji elektrod może w przyszłości umożliwić opracowanie stabilnych i wysokoefektywnych systemów MFC przeznaczonych do bioremediacji zanieczyszczeń ropopochodnych oraz jednoczesnej produkcji energii.

4.4. Biodegradacja oleju posmażalniczego w MFC

Eksperyment został przeprowadzony w ramach współpracy wewnętrznej w zespole Laboratorium Mikrobiologicznych Układów Elektrochemicznych (LMES). Pełne dane eksperymentalne, obejmujące charakterystykę elektrochemiczną oraz parametry pracy ogniów, zostały opublikowane w pracy de Rosset i in. [8]. W niniejszej rozprawie skoncentrowano się na wynikach istotnych dla analizy i identyfikacji biosurfaktantów oraz oceny społeczności mikrobiologicznej. Do kluczowych osiągnięć autorki niniejszej dysertacji należy opracowanie protokołu analizy LC-MS/MS umożliwiającego identyfikację ramnolipidów w próbkach anolitów, a także przeprowadzenie profilowania taksonomicznego mikrobiomu anodowego.

4.4.1. Inokulacja MFC oraz przebieg eksperymentu

W eksperymencie zastosowano horyzontalne, jednokomorowe mikrobiologiczne ogniwa paliwowe z katodą powietrzną (**Rysunek 58**), skonstruowane zgodnie ze specyfikacją przedstawioną w **Tabeli 2** w rozdziale 3.1 niniejszej rozprawy. Powierzchnia geometryczna anody wynosiła 9 cm². Do inokulacji ogniów użyto mieszaniny (1:1) dwóch osadów czynnych pobranych z komór tlenowych miejskiej oczyszczalni ścieków (Ścinawka Dolna, Polska). Początkowo zastosowano opór zewnętrzny (R_{zew}) o wartości 2 k Ω , który w dalszym przebiegu eksperymentu był regulowany na podstawie wyników uzyskiwanych podczas cyklicznych testów polaryzacyjnych. Po 6 dniach inokulacji osad został zastąpiony świeżym podłożem mineralnym (MSM), zawierającym pięć wariantów stężeń NH₄Cl: 0, 0,05, 0,2, 0,5 oraz 1,0 g/L. Skład medium mineralnego opisano szczegółowo w rozdziale 3.3. Jako jedyne źródło węgla zastosowano posmażalniczny olej roślinny w stężeniu 0,1 % (v/v), o gęstości 0,905 g/cm³. Ogniwa prowadzono w trybie wsadowym z częstością wymiany medium co 1-2 dni (średni czas retencji HRT = 39,1 ± 13,8 h). Eksperyment prowadzono w temperaturze pokojowej 25 °C przez 220 dni. W tym czasie rejestrowano parametry elektrochemiczne w sposób ciągły oraz okresowo wykonywano testy LSV i EIS. Próbkę anolitu do analizy biosurfaktantów i mikrobiomu anodowego pobierano w fazie ustabilizowanej pracy, po wcześniejszym osiągnięciu maksymalnej aktywności biosyntezy.

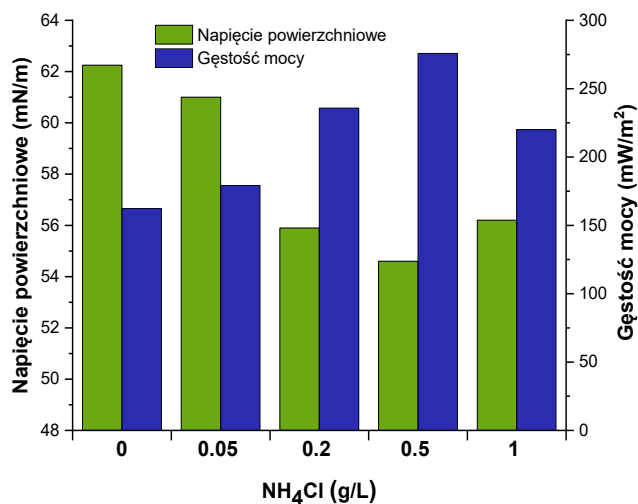


Rysunek 58 Konstrukcja horyzontalnego MFC zastosowanego w eksperymencie.

4.4.2. Wydajność MFC

W celu oceny wpływu stężenia azotu w elektrolicie na wydajność bioelektrochemiczną układu MFC, przeanalizowano maksymalne wartości gęstości mocy generowanej w pięciu wariantach zawierających NH_4Cl w zakresie od 0 do 1,0 g/L. Równolegle monitorowano aktywność syntezy biosurfaktantów w układzie, poprzez monitorowanie spadków napięcia powierzchniowego anodolitów.

Rysunek 59 przedstawia porównanie maksymalnej gęstości mocy oraz odpowiadającego jej minimalnego napięcia powierzchniowego, uzyskanych w poszczególnych wariantach stężeń NH_4Cl . Są to wartości obliczone jako średnia arytmetyczna uzyskana z trzech powtórzeń. Widoczna jest wyraźna odwrotna zależność między tymi parametrami: wzrost wydajności elektrochemicznej układu wiąże się ze spadkiem napięcia powierzchniowego, co wskazuje na intensyfikację biosyntezy związków powierzchniowo czynnych. Najwyższą gęstość mocy, wynoszącą $275,78 \text{ mW/m}^2$ ($12,4 \text{ W/m}^3$), odnotowano dla ogniwa w wariantcie zawierającym $0,5 \text{ g/L}$ NH_4Cl . Co istotne, w tym samym wariantcie jeden z replikatów osiągnął maksymalną wartość w całym eksperymencie, równą $389,2 \text{ mW/m}^2$ ($17,5 \text{ W/m}^3$). W tym samym układzie zarejestrowano również najniższe napięcie powierzchniowe anodytu, osiągające wartość $54,6 \text{ mN/m}$. Zależność ta potwierdza istnienie silnej zależności pomiędzy aktywnością biosyntezy surfaktantów a efektywnością elektrochemicznego transferu elektronów. Produkcja biosurfaktantów przyczyniała się do zwiększenia biodostępności hydrofobowego substratu oraz poprawy adhezji i przewodnictwa biofilmu anodowego, co bezpośrednio przekładało się na wzrost generowanej mocy.



Rysunek 59 Maksymalna gęstość mocy (mW/m^2) oraz minimalne napięcie powierzchniowe (mN/m) anodytu uzyskane w mikrobiologicznych ogniwach paliwowych zasilanych posmażalniczym olejem roślinnym, w zależności od stężenia azotu (NH_4Cl) w podłożu mineralnym. Dane przedstawiają wartości średnie dla trzech powtórzeń dla poszczególnych wariantów zawierających 0, 0,05, 0,2, 0,5 oraz 1,0 g/L NH_4Cl .

W pozostałych wariantach obserwowano istotnie niższe wartości zarówno dla parametrów elektrochemicznych, jak i właściwości powierzchniowych. Zarówno deficyt azotu (0-0,2 g/L), jak i jego nadmiar (1,0 g/L) negatywnie wpływały na funkcjonowanie układu. W warunkach niedoboru ograniczony był rozwój biofilmu anodowego na skutek zahamowania wzrostu komórek bakteryjnych [297]. W środowisku o wysokim stężeniu NH_4Cl dochodziło do aktywacji dehydrogenaz, co w konsekwencji doprowadziło do przesunięcia dominujących szlaków metabolicznych w stronę szlaków degradacyjnych [298]. Skutkowało to obniżeniem wydajności elektrochemicznej oraz spadkiem syntezy biosurfaktantów.

Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono, że stężenie NH_4Cl w anodzie równe 0,5 g/L stanowi warunek optymalny dla jednoczesnej intensyfikacji syntezy biosurfaktantów i generacji mocy w układzie MFC. Z tego względu, wszystkie dalsze analizy związane z identyfikacją i charakterystyką biosurfaktantów przeprowadzono wyłącznie dla próbek pochodzących z tego wariantu eksperymentalnego.

4.4.3. Analiza biosurfaktantów uzyskanych w wyniku bioelektrosyntezy

Analiza biosurfaktantów obejmowała zarówno identyfikację składu chemicznego związków powierzchniowo czynnych, jak i oznaczenia ich właściwości fizykochemicznych.

Próbki anolitu wykazywały wyraźne właściwości powierzchniowo czynne. Minimalne napięcie powierzchniowe rejestrowane w cyklu zasilania wynosiło 54,6 mN/m. Równolegle oznaczono indeks emulsyfikacji E_{24} , który osiągał wartość 95,4 %, co wskazywało na zdolność anolitu do tworzenia stabilnych emulsji olej-woda. Emulsje pozostawały nienaruszone przez co najmniej 24 godziny, bez widocznego rozwarstwienia. Oceniono również właściwości pianotwórcze anolitów. W przeprowadzonych testach stwierdzono, że biosurfaktanty wykazywały zdolność do tworzenia piany w warunkach intensywnego mieszania wodnego roztworu próbki, a powstała piana była trwała w czasie. Objętość piany po 60 minutach utrzymywała się na poziomie 82 ± 3 % względem objętości początkowej. Testy przeprowadzono w warunkach temperatury pokojowej, przy ustalonym czasie wstrząsania (60 s) i objętości próbki (25 mL). W celu identyfikacji chemicznej biosurfaktantów przeprowadzono ekstrakcję biosurfaktantów metodą SPE na fazie C18, a następnie analizę LC-MS/MS w trybie jonizacji ujemnej. W wyniku analizy zidentyfikowano jedenaście struktur ramnolipidowych, w tym monoramnolipidy i diramnolipidy. Obecność tych cząsteczek potwierdzono na podstawie wartości m/z odpowiadających literaturowym danym referencyjnym. Wartości stosunków masy do ładunku (m/z) oraz czasy retencji odpowiadające każdemu ze zidentyfikowanych związków zostały zestawione w **Tabeli 18**.

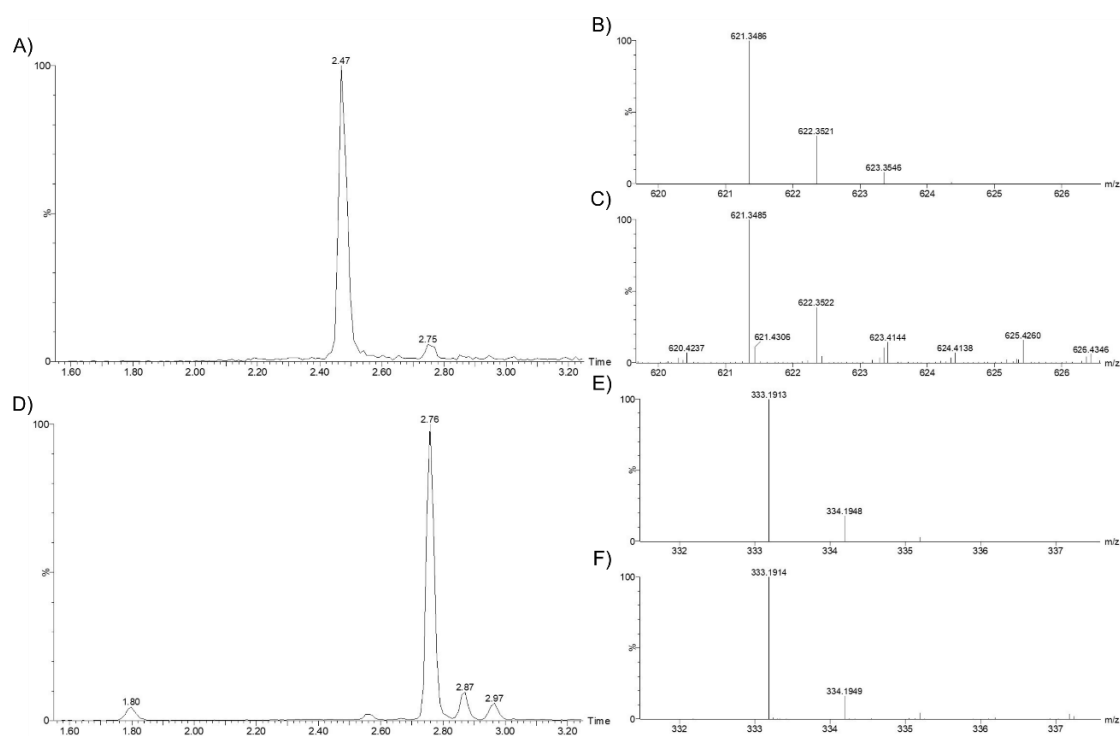
Tabela 18 Zestawienie wyników analizy LC-MS/MS przeprowadzonej dla biosurfaktantów należących do mono- i diramnolipidów, wykrytych w próbce anolitu.

L.p.	m/z	Ramnolipidy	Wzór sumaryczny	Czas retencji [min]	ID z bazy Lipidmaps
1	333,1915	Rha-C10	C ₁₆ H ₃₀ O ₇	1,80	LMFA13030003
2	475,2907	Rha-C8-C10/Rha-C10-C8	C ₂₄ H ₄₄ O ₉	2,56	LMFA13030010
3	473,2802	Rha-C8:1-C10/Rha-C10-C8:1	C ₂₄ H ₄₂ O ₉	2,55	-
4	503,3220	Rha-C10-C10	C ₂₆ H ₄₈ O ₉	2,76	LMFA13030001
5	529,3376	Rha-C10-C12:1/Rha-C12:1-C10	C ₂₈ H ₅₀ O ₉	2,87	LMFA13030016
6	531,3521	Rha-C10-C12/Rha-C12-C10	C ₂₈ H ₅₂ O ₉	2,97	LMFA13030013
7	479,2492	Rha-Rha-C10	C ₂₂ H ₄₀ O ₁₁	1,72	LMFA13030006
8	621,3485	Rha-Rha-C10-C8/Rha-Rha-C8-C10	C ₃₀ H ₅₄ O ₁₃	2,47	-
9	649,3799	Rha-Rha-C10-C10	C ₃₂ H ₅₈ O ₁₃	2,65	LMFA13030005
10	675,3937	Rha-Rha-C10-C12:1/Rha-Rha-C12:1-C10	C ₃₄ H ₆₀ O ₁₃	2,76	-
11	677,4112	Rha-Rha-C10-C12/Rha-Rha-C12-C10	C ₃₄ H ₆₂ O ₁₃	2,85	-

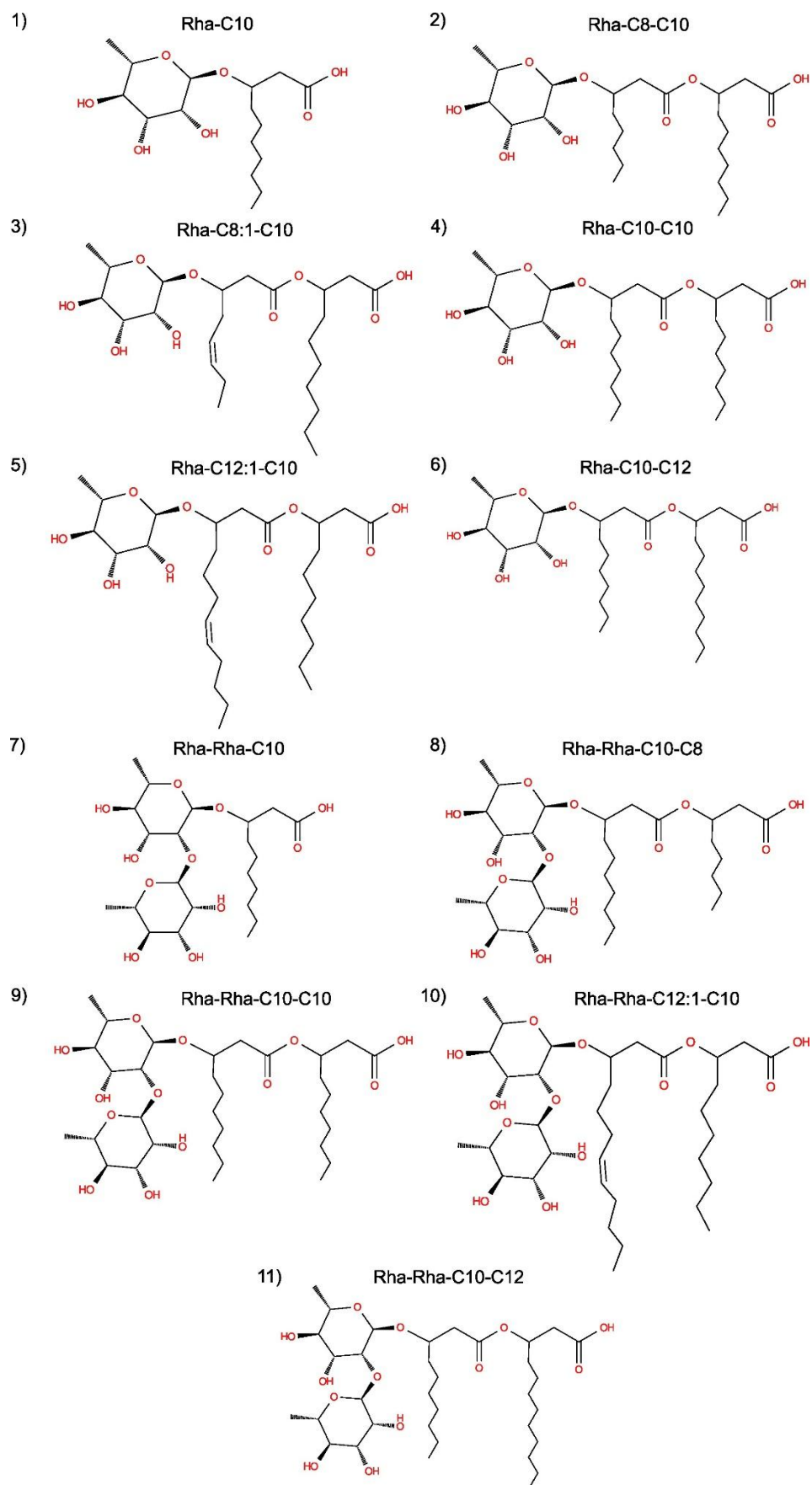
W obrębie frakcji monoramnolipidów wykryto obecność sześciu związków różniących się długością i stopniem nasycenia łańcuchów acylowych, w tym: Rha-C10, Rha-C10-C10, Rha-C8-C10/Rha-C10-C8, Rha-C10-C12/Rha-C12-C10, Rha-C8:1-C10/Rha-C10-C8:1 oraz Rha-C10-C12:1/Rha-C12:1-C10. Przykładowy chromatogram oraz widma masowe, jednego z dominujących związków w tej grupie (Rha-C10), przedstawiono na **Rysunku 60A, B, C**. W grupie diramnolipidów zidentyfikowano

5 odmiennych struktur, obejmujących: Rha-Rha-C10, Rha-Rha-C10-C8/Rha-Rha-C8-C10, Rha-Rha-C10-C10, Rha-Rha-C10-C12:1/Rha-Rha-C12:1-C10 oraz Rha-Rha-C10-C12/Rha-Rha-C12-C10. Na **Rysunku 60D, E, F** przedstawiono również chromatogram oraz widma masowe charakterystyczne dla jednego z przedstawicieli tej grupy, tj. Rha-Rha-C10-C8/Rha-Rha-C8-C10. Struktury zidentyfikowanych biosurfaktantów z grupy mono- i diramnoflipidów przedstawiono na **Rysunku 61**.

Dodatkowo charakter glikolipidowy badanych cząsteczek został potwierdzony analizą TLC z wykorzystaniem testu orcynowego oraz barwienia jodem. Na płytkach zaobserwowano wyraźne strefy odpowiadające ramnoflipidom jedno- i dwuramnozowym. Przeprowadzono również test ninhydrynowy w celu identyfikacji peptydów oraz wolnych aminokwasów, jednak uzyskano wynik negatywny.



Rysunek 60 Analiza ramnoflipidów metodą LC-MS/MS: A) Wydzielony chromatogram jonowy dla Rha-C10 należącego do grupy monoramnoflipidów B) modelowe widmo masowe c, C) eksperymentalne widmo masowe dla Rha-C10, D) wydzielony chromatogram jonowy dla Rha-Rha-C10-C8/Rha-Rha-C8-C10 z grupy diramnoflipidów, E) modelowe widmo masowe dla Rha-Rha-C10-C8/Rha-Rha-C8-C10, F) eksperymentalne widmo masowe potwierdzające obecność Rha-Rha-C10-C8/Rha-Rha-C8-C10.

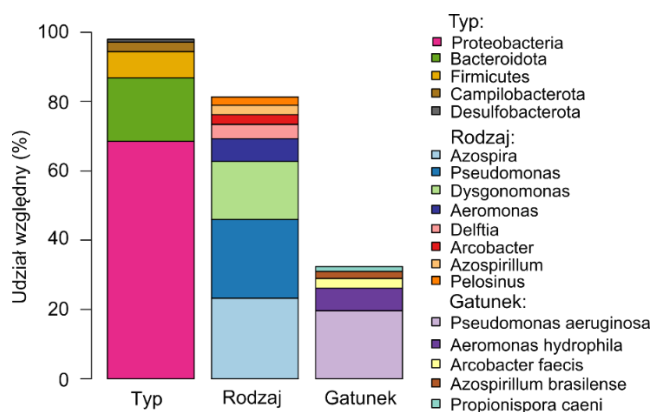


Rysunek 61 Wzory strukturalne ramnolipidów zidentyfikowanych w próbkach anolitów pochodzących z MFC wykorzystywanych do degradacji oleju posmażalniczego.

4.4.4. Analiza struktury społeczności mikroorganizmów

W celu identyfikacji taksonomicznej społeczności mikroorganizmów zasiedlających anodę mikrobiologicznego ogniwa paliwowego, przeprowadzono analizę sekwencji genu 16S rRNA. Do badań wykorzystano biomasę oraz anolit pochodzące z układów o najwyższej wydajności bioelektrochemicznej, tj. z wariantu zawierającego 0,5 g/L NH₄Cl. Analiza umożliwiła określenie składu taksonomicznego społeczności mikrobiologicznej obecnej zarówno w biofilmie anodowym jak i w społeczności planktonicznej (**Rysunek 62**).

Na poziomie typu dominowały trzy grupy bakterii: *Proteobacteria* (68,53 %), *Bacteroidota* (18,28 %) oraz *Firmicutes* (7,57 %). Struktura ta odpowiada profilom mikrobiologicznym charakterystycznym dla społeczności egzoelektrogenów w układach MFC, opisywanych również w literaturze [14], [299]. Bakterie należące do typu *Proteobacteria* są szczególnie istotne z uwagi na ich zdolność do uczestnictwa w transferze elektronów oraz przekształcaniu związków organicznych w warunkach beztlenowych. Na poziomie rodzaju największy udział odnotowano dla przedstawicieli *Azospira* (23,6 %), *Pseudomonas* (22,71 %), *Dysgonomonas* (16,73 %) oraz *Aeromonas* (6,61 %). Mikroorganizmy z rodzaju *Azospira* wykazują właściwości denitryfikacyjne i zdolność do wykorzystywania elektrody jako alternatywnego akceptora elektronów w środowisku ubogim w tlen [300]. Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* są natomiast znane z produkcji metabolitów wtórnych, w tym fenazyń, które pełnią funkcję mediatorów redoks w układach MFC oraz biosurfaktantów takich jak ramnolipidy [153], [301]. Obecność bakterii z rodzaju *Dysgonomonas* została wcześniej powiązana ze zwiększoną wydajnością generowania mocy w MFC, co może świadczyć o ich potencjalnej roli w ułatwianiu przepływu elektronów do anody [302].



Rysunek 62 Wykresy słupkowe przedstawiające względny udział procentowy bakterii na poziomie typu, rodzaju i gatunku w mikrobiomie anodowym MFC zasilanym olejem posmażalniczym.

Na poziomie gatunkowym stwierdzono dominację *Pseudomonas aeruginosa*, osiągającą udział względny 19,60 %. Gatunek ten znany jest jako efektywny producent ramnolipidów, co zostało potwierdzone w niniejszym eksperymencie poprzez analizę LC-MS/MS. Jego obecność w społeczności anodowej wskazuje na zintegrowany udział

tego mikroorganizmu zarówno w generowaniu prądu jak i w biosyntezie związków powierzchniowo czynnych. Drugim dominującym gatunkiem był *Aeromonas hydrophila* (6,58 %). Przedstawiciele tego gatunku to fakultatywne beztlenowce, powszechnie występujące w środowiskach wodnych. *A. hydrophila* jest egzoelektrogenem i wykazuje zdolność transferu elektronów na powierzchnię anodę [190]. Ponadto, *A. hydrophila* wykazuje zdolność do degradacji substancji hydrofobowych (np. olej napędowy) oraz syntezy biosurfaktantów glikolipopeptydowych, co wykazano w pracy Pandeya i in. [303] dla szczepu RP1 izolowanego ze ścieków przemysłowych. Współwystępowanie tych dwóch taksonów może wskazywać na synergistyczne interakcje w komorze anodowej, sprzyjające zarówno stabilizacji struktury mikrobiologicznej, jak i zwiększeniu wydajności procesów elektrofermentacyjnych.

4.4.5. Podsumowanie i wnioski

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów potwierdzają możliwość skutecznej biodegradacji posmażalniczego oleju roślinnego w układzie MFC z równoczesną produkcją biosurfaktantów oraz generacją energii elektrycznej. Optymalne warunki dla obu procesów: produkcji energii i biosyntezy związków powierzchniowo czynnych uzyskano przy stężeniu NH_4Cl równym 0,5 g/L w podłożu mineralnym. Wariant ten charakteryzował się najwyższą zarejestrowaną gęstością mocy (389 mW/m^2 ; $17,5 \text{ W/m}^3$ dla indywidualnego układu) w porównaniu z dotychczasowymi doniesieniami dotyczącymi produkcji biosurfaktantów z oleju posmażalniczego w MFC. Dodatkowo, zarejestrowano najniższe napięcie powierzchniowe anolitu ($54,6 \text{ mN/m}$), wysoki indeks emulsyfikacji ($E_{24} = 95,4 \%$) oraz stabilność i trwałość piany. W warunkach tych zidentyfikowano jedenaście związków należących do grupy mono- i diramnofolidów, co potwierdzono za pomocą analiz LC-MS/MS oraz TLC.

Sekwencjonowanie 16S rRNA ujawniło dominację taksonów *Proteobacteria*, *Bacteroidota* i *Firmicutes*, a na poziomie rodzaju największy udział miały *Azospira*, *Pseudomonas*, *Dysgonomonas* i *Aeromonas*. W szczególności gatunki *Pseudomonas aeruginosa* i *Aeromonas hydrophila* odegrały istotną rolę w strukturze biofilmu anodowego. Oba mikroorganizmy wykazują właściwości egzoelektrogenne, potrafią wytwarzać związki powierzchniowo czynne oraz mają udokumentowaną zdolność degradacji związków hydrofobowych.

Opracowany w ramach niniejszej rozprawy, dedykowany protokół analityczny, łączący ekstrakcję na fazie stałej (SPE) z analizą LC-MS/MS, umożliwił bezpośrednią identyfikację ramnofolidów w próbkach anolitu z układów MFC. Praca ta po raz pierwszy w literaturze ukazuje bezpośredni związek pomiędzy produkcją energii a syntezą biosurfaktantów, a stężeniem azotu w anolicie. Dodatkowo osiągnięto najwyższą jak dotąd zarejestrowaną moc w systemach MFC generujących biosurfaktanty z roślinnego oleju posmażalniczego (389 mW/m^2 ; $17,5 \text{ W/m}^3$), co stanowi ponad 260-krotne zwiększenie w porównaniu do wartości $0,0664 \text{ W/m}^3$ odnotowanej w dotychczasowej literaturze [304].

5. PODSUMOWANIE

W niniejszej rozprawie wykazano, że mikrobiologiczne ogniwa paliwowe mogą być skutecznie wykorzystywane jako zintegrowane układy do jednoczesnej biodegradacji węglowodorów, produkcji biosurfaktantów *in situ* oraz generowania energii elektrycznej. Udowodniono, że skład taksonomiczny i funkcjonalność anodowych społeczności mikroorganizmów są ściśle zależne od rodzaju substratu, pochodzenia inokulum, zastosowania kosubstratów oraz przyłożonego potencjału anody, a czynniki te determinują zarówno efektywność degradacji zanieczyszczeń, jak i wydajność bioelektrochemiczną układów.

W części poświęconej biodegradacji benzenu wykazano, że zastosowanie strategii inokulacji opartej na czystych szczepach, wzbogacanych osadem czynnym oraz suplementacji glukozy jako kosubstratu, prowadzi do ukształtowania stabilnych i wysokoaktywnych społeczności anodowych zdolnych do całkowitej degradacji benzenu. Wykazano, że mikrobiomy rozwijające się w obecności benzenu charakteryzowały się wyższą bioróżnorodnością niż społeczności nieeksponowane na ten związek. Uzyskane gęstości mocy (21-120 mW/m²) były najwyższymi dotychczas raportowanymi w literaturze dla układów MFC zasilanych benzenem i przewyższały wartości wcześniej opisywane nawet 18-krotnie. Analiza składu taksonomicznego wykazała, że w układach z benzenem najwyższą obfitość osiągały mikroorganizmy zdolne do jego degradacji oraz zewnątrzkomórkowego transferu elektronów, w tym *Citrobacter freundii*, *Comamonas testosteroni*, *Arcobacter faecis*, *Myroides odoratus* oraz *Dysgonomonas sp.*, co świadczy o możliwości zastosowania ich w bioremediacji związków aromatycznych.

Kolejna część pracy wykazała, że przyłożony potencjał anodowy wpływa istotnie na strukturę, bioróżnorodność i funkcjonalność społeczności mikroorganizmów anodowych w MFC zasilanych olejem napędowym. Ujemna polaryzacja anody (-0,3 V) sprzyjała tworzeniu bardziej złożonych i funkcjonalnie wyspecjalizowanych biofilmów, co przekładało się na najwyższe wartości gęstości mocy. Społeczności rozwijające się przy tym potencjale charakteryzowały się wyższą bioróżnorodnością oraz zwiększonym udziałem mikroorganizmów zdolnych do bezpośredniego transferu elektronów i degradacji węglowodorów, w tym *Geobacter*, *Comamonas*, *Petrimonas*, *Rhodococcus* i *Desulfovibrio*. Wyniki te potwierdzają, że przyłożony potencjał anodowy pełni kluczową rolę w kształtowaniu funkcjonalności mikrobiomu anodowego i efektywności bioelektrochemicznej MFC.

W następnej części eksperymentalnej wykazano, że pochodzenie inokulum i zastosowanie kosubstratu mają istotny wpływ na wydajność MFC oraz funkcjonalność anodowych społeczności mikroorganizmów. Zastosowanie strategii kosubstratowej opartej na suplementacji octanem sodu pozwoliło na blisko czterokrotny wzrost średniej gęstości mocy w porównaniu do układów bez kosubstratu, osiągając rekordową wartość 350 mW/m² dla mikroflory wzbogaconej z separatora związków ropopochodnych. Spadki napięcia powierzchniowego anolitów pokrywały się z fazami wzrostu generowanej mocy, co wskazuje na rolę biosurfaktantów w zwiększaniu biodostępności

substratów i poprawie wydajności układów. Analiza bioinformatyczna ujawniła obecność licznych genów związanych z tlenową i beztlenową degradacją węglowodorów alifatycznych oraz aromatycznych w analizowanych metagenomach. Najwyższą ich obfitość odnotowano w próbkach z terenów górskich, w tym z rzeki polodowcowej, co wskazuje na zdolność tych konsorcjów do degradacji węglowodorów. Wśród markerów funkcjonalnych ilościowo dominowały: *nahB*, kodujący dioksygenazę cis-dihydrodiolową naftalenu zaangażowaną w degradację wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych; *tmoF*, kodujący podjednostkę monooksygenazy toluenowej uczestniczącej w utlenianiu węglowodorów monoaromatycznych; *ladA*, kodujący monooksygenazę alkanową inicjującą tlenową degradację długołańcuchowych alkanów oraz *ahyA*, związany z beztlenową degradacją alkanów. Wyniki potwierdzają szeroki potencjał metaboliczny badanych konsorcjów oraz ich znaczenie w procesach bioremediacji i funkcjonowaniu układów bioelektrochemicznych.

W kolejnej części pracy wykazano, że zwiększenie skali układów MFC wraz z zastosowaniem wzbogaconych konsorcjów mikroorganizmów istotnie poprawiało wydajność systemów. W MFC zaszczipionym wzbogaconym w MFC konsorcjum z gleby tropikalnej, osiągnięto maksymalną gęstość mocy 719 mW/m², co stanowi najwyższą wartość dotychczas uzyskaną w systemach pracujących na frakcjach ropopochodnych. Wzrost gęstości mocy towarzyszył obniżeniu napięcia powierzchniowego anodów, wskazując na intensywną produkcję biosurfaktantów *in situ*, które zwiększały biodostępność węglowodorów i wspierały formowanie stabilnego biofilmu anodowego. Analiza społeczności mikrobiologicznej wykazała dominację taksonów egzoelektrogennych (*Geobacter anodireducens*, *Arcobacter faecis*) oraz gatunków uczestniczących w degradacji węglowodorów i syntezie biosurfaktantów (*Pseudomonas stutzeri*, *Gordonia terrae*), a wysoki udział niezidentyfikowanych mikroorganizmów wskazuje na obecność nowych, potencjalnie istotnych dla funkcjonowania MFC drobnoustrojów. Wyniki te potwierdzają, że równoczesna biodegradacja frakcji ropopochodnych, produkcja biosurfaktantów i generacja energii elektrycznej może być skutecznie realizowana w skalowanych systemach bioelektrochemicznych.

Ostatni etap pracy dotyczył eksperymentu związanego z wykorzystaniem oleju posmażalniczego jako substratu do syntezy biosurfaktantów w MFC. Przeprowadzono charakterystykę biosurfaktantów, w tym opracowano protokół analityczny w oparciu o metodę LC-MS/MS, umożliwiającą identyfikację ramnolipidów w próbkach anodów. W wyniku analiz zidentyfikowano jedenastce biosurfaktantów z grupy mono- i diramnolipidów. Analiza mikrobiomu wykazała dominację *Pseudomonas aeruginosa* i *Aeromonas hydrophila*, kluczowych w tworzeniu biofilmu, transferze elektronów i produkcji ramnolipidów. W porównaniu z frakcjami ropopochodnymi, olej posmażalniczy okazał się bardziej efektywnym substratem do biosyntezy surfaktantów, czego dowodem była większa różnorodność zidentyfikowanych związków powierzchniowo czynnych.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wykazano, że mikrobiologiczne

ogniwa paliwowe stanowią efektywną platformę do jednoczesnej biodegradacji zanieczyszczeń hydrofobowych, produkcji biosurfaktantów *in situ* oraz generowania energii elektrycznej. Skład taksonomiczny i funkcjonalność anodowych społeczności mikroorganizmów zależą od rodzaju substratu, pochodzenia inokulum, zastosowania kosubstratów oraz przyłożonego potencjału anody, co determinuje zarówno efektywność degradacji zanieczyszczeń, jak i wydajność bioelektrochemiczną MFC. Wyniki wskazują na współzależność pomiędzy degradacją węglowodorów, syntezą związków powierzchniowo czynnych i aktywnością elektrochemiczną, co pozwala lepiej zrozumieć zależności między mikrobiomem anodowym a funkcjonowaniem MFC w kontekście bioremediacji i wytwarzania energii.

6. DOROBEK NAUKOWY

6.1. Publikacje naukowe związane z rozprawą doktorską

1. **Natalia Tyszkiewicz**, Jaak Truu, Piotr Młynarz, Grzegorz Pasternak; „The influence of benzene on the composition, diversity and performance of the anodic bacterial community in glucose-fed microbial fuel cells”; *Frontiers in Microbiology*. 2024, vol. 15, art. 1384463, s. 1-12. (IF = 4,5, 100 pkt. MNiSW)
2. Bartosz Widera, **Natalia Tyszkiewicz**, Jaak Truu, Piotr Rutkowski, Piotr Młynarz, Grzegorz Pasternak; „Relationship between biodiversity and power generated by anodic bacteria enriched from petroleum-contaminated soil at various potentials”; *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2024, vol. 194, art. 105849, s. 1-13. (IF = 4,1, 140 pkt. MNiSW)
3. Aleksander M. de Rosset, **Natalia Tyszkiewicz**, Jerzy Ł. Wiśniewski, Natalia Pudełko-Malik, Piotr Rutkowski, Piotr Młynarz, Grzegorz Pasternak; „Bioelectrochemical synthesis of rhamnolipids and energy production and its correlation with nitrogen in air-cathode microbial fuel cells”; *Journal of Environmental Management*. 2024, vol. 365, art. 121514, s. 1-12. (IF = 8,4, 200 pkt. MNiSW)
4. Grzegorz Pasternak, Aleksander M. de Rosset, **Natalia Tyszkiewicz**, Bartosz Widera, John Greenman*, Ioannis Ieropoulos; „Prevention and removal of membrane and separator biofouling in bioelectrochemical systems: a comprehensive review”; *iScience*. 2022, vol. 25, nr 7, art. 104510, s. 1-21. (IF = 5,8, 20 pkt. MNiSW)

6.2. Wystąpienia konferencyjne

1. **Natalia Tyszkiewicz**, Piotr Młynarz, Grzegorz Pasternak; „Hexadecane biodegradation by electroactive consortia in microbial fuel cells”; W: *Interdisciplinary Doctoral Symposium : Rajd Doktoranta 2024, Przesieka, 17-19 maja 2024 : book of abstracts / eds. Daria Minta [i in.]*. Wrocław: Wrocław University of Science and Technology Publishing House, 2024. s. 42-42.
2. **Natalia Tyszkiewicz**, Jaak Truu, Piotr Młynarz, Grzegorz Pasternak; „Metaprofiling of microbial communities in benzene-enriched MFCs”; W: *Phoenix Mid-Term Conference on Bioelectrochemical Systems (BES), 29 lutego 2024, Rzym, Włochy: book of abstracts / European Cooperation in Science and Technology (COST), Phoenix. [B.m. : b.w., 2024]*. s. 6-6.
3. **Natalia Tyszkiewicz**, Bartosz Widera, Angela Peeb, Jaak Truu, Grzegorz Pasternak; „Metagenomic analysis of various microbial consortia degrading petroleum compounds in MFCs”; W: *Electromicrobiology 2023, 24-26 maja 2023, Aarhus, Dania / Center for Electromicrobiology, Aarhus*

University. [B.m. : b.w., 2023. s. 81-81.

4. **Natalia Tyszkiewicz**, Piotr Młynarz, Grzegorz Pasternak; „Microbial fuel cells towards biosurfactants production and petroleum compounds degradation”; W: Interdisciplinary Doctoral Symposium: Rajd Doktoranta 2023, Przesieka, 12-14 maja 2023 : book of abstracts / [eds. Natalia Tyszkiewicz, Izabela Walendzik, Dawid J. Kramski]. Wrocław : Wrocław University of Science and Technology Publishing House, 2023. s. 43-43.
5. **Natalia Tyszkiewicz**, Aleksander M. de Rosset, Jerzy Ł. Wiśniewski, Piotr Młynarz, Grzegorz Pasternak; „Identification of biosurfactants produced in microbial fuel cells using LC-MS/MS method”; W: Metabolomics Circle: 9th Conference of the Polish Metabolomic Society, 27-28 stycznia, 2023, Wrocław : book of abstracts / eds. Natalia Tyszkiewicz [i in.]. Wrocław: Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 2023. s. 30-30.
6. **Natalia Tyszkiewicz**, Grzegorz Pasternak; „Microorganisms enriched from soil in Sri Lanka as power producers in crude oil-fed MFC.” W: ISMET 8 2022 Global Conference, The International Society for Microbial Electrochemistry and Technology, Chania, Crete, Greece, 19-23 września 2022 : e-book of abstracts / eds. N. Kalogerakis, A. Esteve-Núñez. Chania : Technical University of Crete, cop. 2022. s. 110-110.
7. **Natalia Tyszkiewicz**, Piotr Młynarz, Grzegorz Pasternak; „Application of microbial fuel cells for contaminants degradation and current generation” W: PANIC Summer School 2022 : PhoBiA Annual Nanophotonics International Conference, 30 maja – 3 czerwca 2022, Wrocław, Poland / [eds. Dominika Benkowska-Biernacka i in.]. Wrocław : Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 2022. s. 59-59.
8. **Natalia Tyszkiewicz**, Grzegorz Pasternak; „Bioelectrochemical degradation of crude oil by microbial consortia derived from contaminated sites”; W: MEEP 2022 Special Symposium on Microbial, Enzymatic & Bio-Photovoltaic Electrochemical Reactors, Fuel Cells and Electrolyser Systems, 6-7 lipca 2022, Lucerne/Switzerland] : book of abstracts / eds. Johannes Gescher, 2022. s. 38-38.
9. **Natalia Tyszkiewicz**, Piotr Młynarz, Grzegorz Pasternak; „Determination of microbial exo-metabolome during electricity production in bioelectrochemical systems using untargeted NMR spectroscopy”; W: The 8th Conference of Polish Metabolomic Society Metabolomics Circle 2021, Katowice, Poland, 17-19 listopada 2022 / [Polish Metabolomic Society]. Katowice: 2021. s. 22-22.
10. **Natalia Tyszkiewicz**, Piotr Młynarz, Grzegorz Pasternak; „Comparative analysis of microbial fuel cells operated with different microbial consortia using benzene and glucose as carbon sources” ; W: Electromicrobiology 2021, 3-5 listopada

2021, Aarhus, Denmark / Center for Electromicrobiology, Aarhus University. [B.m. : b.w., 2021]. s. 39-39.

11. **Natalia Tyszkiewicz**, Grzegorz Pasternak; „Co-metabolism of benzene and glucose in microbial fuel cells by synthetic communities”; W: 5th European Meeting of the International Society for Microbial Electrochemistry and Technology, 13-15 września 2021, online / ISMET International Society for Microbial Electrochemistry and Technology. [B.m. : b.w., 2021]. s. 156-156.
12. **Natalia Tyszkiewicz**, Grzegorz Pasternak; „Isolation of electroactive bacteria from microbial fuel cells operated with petroleum products and waste frying oil”; W: ChemBiotIC, Chemistry & Biotechnology International Conference: 24-25 czerwca 2021, Wrocław, Poland / Politechnika Wrocławska. [Wrocław: Oficyna Wydawnicza PWr, 2021]. s. 74-74.

6.3. Udział w projektach i grantach naukowych

- Wykonawca projektu „Mechanizmy bioelektrochemicznej transformacji materiałów odpadowych z przemysłu naftowego do biosurfaktantów”, Kierownik projektu: dr hab. inż. Grzegorz Pasternak, prof. Uczelni, jednostka realizująca: Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny, Projekt finansowany z NCN, 2019/33/B/NZ9/02774.
- Uzyskanie i realizacja grantu naukowego z projektu NAWA STER InterDocSchool zrealizowany w Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Estonia. Nazwa projektu: „Badania metagenomiczne społeczności drobnoustrojów oparte na sekwencji nukleotydów całych metagenomów.”, Realizacja: 30.01.2023 - 01.03.2023.
- Uzyskanie i realizacja grantu naukowego z projektu Short-Term Scientific Mission Grant, E-COST-GRANT-CA19123-6a34969d, Projekt: PHOENIX CA19123, zrealizowany w Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Estonia; tytuł: „Metagenomic analysis of microbial consortia in MFCs degrading benzene”, Realizacja: 26.02.2022 r. - 12.03.2022 r.

6.4. Nagrody i wyróżnienia

- Travel grant na konferencję Electromicrobiology 2021 w Aarhus, Dania 3-5 listopada 2021 r., instytucja przyznająca: Federation of European Microbiological Societies (FEMS).
- Wyróżnienie Rektora za działalność na rzecz środowiska doktoranckiego Politechniki Wrocławskiej w roku akademickim 2021/2022.
- Travel grant na konferencję Electromicrobiology 2023 w Aarhus, Dania 24-26 maja 2023 r., instytucja przyznająca: Federation of European Microbiological Societies (FEMS).

- Nagroda Primus za aktywność publikacyjną wśród doktorantów Politechniki Wrocławskiej w roku 2024.
- Nagroda Rektora za działalność organizacyjną na rzecz Uczelni zrealizowaną w roku akademickim 2023/2024.
- Nagroda Rektora za osiągnięcie naukowe związane z realizowaną rozprawą doktorską uzyskane w roku akademickim 2024/2025.
- Stypendium naukowe z własnego funduszu na stypendia Politechniki Wrocławskiej w konkursie w semestrze letnim 2024/2025.

6.5. Pozostała działalność naukowa i organizacyjna

Organizacja konferencji:

- Metabolomics Circle : 9th Conference of the Polish Metabolomic Society, 27-28 stycznia , 2023 na Politechnice Wrocławskiej.
- Interdisciplinary Doctoral Symposium: Rajd Doktoranta 2023, Przesieka, 12-14 maja 2023.
- Interdisciplinary Doctoral Symposium: Rajd Doktoranta 2024, Przesieka, 17-19 maja 2024.

Redakcja materiałów konferencyjnych:

- **Natalia Tyszkiewicz** [Red.], Karolina A. Mielko [Red.], Monika Sapeta [Red.], Mariya Stravska [Red.]; Metabolomics Circle: 9th Conference of the Polish Metabolomic Society, 27-28 stycznia, 2023, Wrocław : book of abstracts. Wrocław: Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 2023. 46 s.
- **Natalia Tyszkiewicz** [Red.], Izabela Walendzik [Red.], Dawid J. Kramski [Red.]; Interdisciplinary Doctoral Symposium: Rajd Doktoranta 2023, Przesieka, 12-14 maja 2023: book of abstracts; Wrocław : Wrocław University of Science and Technology Publishing House, 2023. s. 43-43.

Uczestnictwo w pracach komisji naukowych:

- Członkini Komisji konkursowej oceniającej wnioski o granty w programie „Wsparcie projektów badawczych 2025” organizowanym przez Politechnikę Wrocławską.

Działalność na rzecz środowiska doktoranckiego na Uczelni oraz w kraju:

- **Członkini Rady Doktorantów Politechniki Wrocławskiej (2021-2024)**

2023/2024 – Przewodnicząca, 2022/2023 – Wiceprzewodnicząca, 2021/2022 – Sekretarz

Główne osiągnięcia i zakres działalności:

- zainicjowanie, współtworzenie i koordynacja wdrożenia programu grantowego „Minigranty” dla doktorantów Szkoły Doktorskiej PWr;
- zainicjowanie i główna koordynacja ogólnopolskiego wydarzenia integracyjno-naukowego „Rajd Doktoranta 2023” wraz z konferencją „Interdisciplinary Doctoral Symposium”;
- kierowanie pracami Rady Doktorantów oraz reprezentowanie środowiska doktoranckiego w Senacie Uczelni;
- zarządzanie budżetem Rady Doktorantów oraz pozyskiwanie środków finansowych na działalność projakościową;
- nadzór nad opracowaniem i aktualizacją regulaminów oraz procedur obowiązujących w Szkole Doktorskiej PWr;
- reprezentowanie Uczelni oraz współtworzenie wydarzeń krajowych organizowanych przez Porozumienie Doktorantów Uczelni Technicznych oraz Krajową Reprezentację Doktorantów.

- **Członkini Zespołu ds. popularyzacji nauki Krajowej Reprezentacji Doktorantów (2023-2024)**

Zakres działalności:

- współtworzenie ogólnopolskich inicjatyw popularyzujących naukę;
- prowadzenie naukowego profilu popularyzatorskiego „phd.vibes” w mediach społecznościowych;
- współorganizacja ogólnopolskiego konkursu „Popularyzacja nie boli 2.0”.

7. SPIS TABEL I RYSUNKÓW

Tabele:

TABELA 1 NAJWAŻNIEJSZE ZMIENNE: PROJEKTOWE, OPERACYJNE I WYDAJNOŚCIOWE, STOSOWANE W BADANIACH UKŁADÓW BIOELEKTROCHEMICZNYCH.	30
TABELA 2 DANE DOTYCZĄCE KONSTRUKCJI I DZIAŁANIA UKŁADÓW BES.	46
TABELA 3 CHARAKTERYSTYKA MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO WYKORZYSTANEGO W EKSPERYMENTACH.	47
TABELA 4 CHARAKTERYSTYKA STARTERÓW I PROGRAMÓW QPCR.	53
TABELA 5 PRZYPISANIE SYGNAŁÓW ¹ H NMR DLA METABOLITÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH ZIDENTYFIKOWANYCH W ANOLITACH POBRANYCH Z UKŁADÓW MFC.	66
TABELA 6 LICZBA KOPII DNA BAKTERII I ARCHEONÓW W SPOŁECZNOŚCIACH MIKROORGANIZMÓW KOMÓR ANODOWYCH MFC ZASILANYCH GLUKOZĄ (GRUPA A) ORAZ MIESZANINĄ BENZENU I GLUKOZY (GRUPA B), OZNACZONA METODĄ QPCR.	73
TABELA 7 ZESTAWIENIE WARTOŚCI MAKSYMALNYCH MOCY, MAKSYMALNYCH GĘSTOŚCI MOCY, USUNIĘCIA CHEMICZNEGO ZAPOTRZEBOWANIA NA TLEN (CHZT) ORAZ EFEKTYWNOŚCI KULOMBOWSKIEJ (CE) Z CAŁEGO EKSPERYMENTU DLA POSZCZEGÓLNYCH OGNIW.	75
TABELA 8 WYNIKI TESTU ISTOTNOŚCI RÓŻNIC TUKEYA HSD PRZEPROWADZONEGO NA PODSTAWIE WARTOŚCI ALFA-RÓŻNORODNOŚCI (INDEKS CHAO1) NA POZIOMIE GATUNKU. WYJAŚNIENIA: *RÓŻNICA ISTOTNA STATYSTYCZNIE; ** RÓŻNICA NIEISTOTNA STATYSTYCZNIE.	81
TABELA 9 ZESTAWIENIE PARAMETRÓW ELEKTROCHEMICZNYCH, BIORÓŻNORODNOŚCI ORAZ FUNKcjONALNEGO SKŁADU ANODOWYCH SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW W MFC W ZALEŻNOŚCI OD POTENCJAŁU ANODY.	85
TABELA 10 RODZAJE, MIEJSCE POZYSKANIA I TYP INOKULATÓW ZASTOSOWANYCH W EKSPERYMENCIE BIODEGRADACJI ROPY NAFTOWEJ.	88
TABELA 11 PORÓWNANIE MAKSYMALNYCH WARTOŚCI GĘSTOŚCI MOCY GENEROWANYCH PRZEZ OGNIWA MFC1-9 DLA SERII A I B.	92
TABELA 12 UDZIAŁ WZGLĘDNY BAKTERII I ARCHEONÓW (%) W SPOŁECZNOŚCIACH ANODOWYCH POSZCZEGÓLNYCH OGNIW MFC, OBLICZONY WZGLĘDEM WSZYSTKICH ODCZYTÓW W PRÓBCE. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – JEZIORO POKOPALNIAŃ, MFC 2 – ŁODOWIEC, MFC 3 – RZĘKA POŁODOWCOWA, MFC 4 – GLEBA TROPIKALNA, MFC 5 – WULKAN BŁOTNY, MFC 6 – KANAŁ ŚCIEKOWY W OKOLICY STACJI PALIW, MFC 7 – OKOLICE SKRZYŃKI ROZŁADUNKU PALIW NA STACJI PALIW, MFC 8 – SEPARATOR SUBSTANCJI ROPOPOCHODNYCH NA STACJI PALIW, MFC 9 – PARKING MIEJSKI.	94
TABELA 13 LISTA GENÓW ORAZ KODOWANYCH PRZEZ NIE ENZYMOÓW ZWIĄZANYCH Z DEGRADACJĄ WĘGLOWODORÓW.	109
TABELA 14 SUMA WARTOŚCI RPKG DLA POSZCZEGÓLNYCH GRUP GENÓW DEGRADACYJNYCH W METAGENOMACH MFC 1 - MFC 9B. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – JEZIORO POKOPALNIAŃ, MFC 2 – ŁODOWIEC, MFC 3 – RZĘKA POŁODOWCOWA, MFC 4 – GLEBA TROPIKALNA, MFC 5 – WULKAN BŁOTNY, MFC 6 – KANAŁ ŚCIEKOWY W OKOLICY STACJI PALIW, MFC 7 – OKOLICE SKRZYŃKI ROZŁADUNKU PALIW NA STACJI PALIW, MFC 8 – SEPARATOR SUBSTANCJI ROPOPOCHODNYCH NA STACJI PALIW, MFC 9 – PARKING MIEJSKI.	111
TABELA 15 ZESTAWIENIE PIERWOTNYCH I NOWYCH OZNACZEŃ KONSORCJÓW ZASTOSOWANYCH DO INOKULACJI MFC.	125
TABELA 16 BIOSURFAKTANTY ZIDENTYFIKOWANE W PRÓBKACH ANOLITÓW Z MFC DEGRADUJĄCYCH ROPĘ NAFTOWĄ I OCTAN. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE	

Z KANAŁU ŚCIEKOWEGO STACJI PALIW, MFC 2 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z SEPARATORA ROPOPOCHODNYCH, MFC 3 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z GLEBY TROPIKALNEJ.	141
TABELA 17 PORÓWNANIE PARAMETRÓW CHARAKTERYZUJĄCYCH WYDAJNOŚĆ MFC PRZED ORAZ PO PODNIESIENIU SKALI UKŁADÓW.	143
TABELA 18 ZESTAWIENIE WYNIKÓW ANALIZY LC-MS/MS PRZEPROWADZONEJ DLA BIOSURFAKTANTÓW NALEŻĄCYCH DO MONO- I DIRAMNOLIPIDÓW, WYKRYTYCH W PRÓBCE ANOLITU.....	148
Rysunki:	
RYSUNEK 1 PODZIAŁ WĘGLOWODORÓW ROPOPOCHODNYCH (WR) NA GŁÓWNE GRUPY: ALIFATYCZNE, CYKLOALIFATYCZNE, AROMATYCZNE ORAZ POZOSTAŁE FRAKCJE (ASFALTENY, WOSKI, SMOŁY, ŻYWICE).....	18
RYSUNEK 2 SCHEMAT BUDOWY DWUKOMOROWEGO MFC.	23
RYSUNEK 3 MECHANIZMY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO TRANSFERU ELEKTRONÓW: BEZPOŚREDNI POPRZECYTOCHROMY ORAZ NANOWŁÓKNO ORAZ POŚREDNI POPRZECY MEDIATOR.....	32
RYSUNEK 4 CYKL FORMOWANIA SIĘ BIOFILMU BAKTERYJNEGO NA ANODZIE W MIKROBIOLOGICZNYM OGNIWIE PALIWOWYM.....	34
RYSUNEK 5 PRZYKŁADOWE STRUKTURY CHEMICZNE BIOSURFAKTANTÓW Z GRUPY GLIKOLIPIDÓW: A) MONORAMNOLIPID, B) DIRAMNOLIPID.....	39
RYSUNEK 6 PRZYKŁADOWA STRUKTURA CHEMICZNA BIOSURFAKTANTU FOSFOLIPIDOWEGO: FOSFOLIPIDU.....	40
RYSUNEK 7 STRUKTURY CHEMICZNE PRZYKŁADOWYCH BIOSURFAKTANTÓW Z GRUPY LIPOPEPTYDÓW: A) SURFAKTYNA, ORAZ BIOSURFAKTANTÓW POLIMEROWYCH: B) EMULSAN.....	40
RYSUNEK 8 ZALEŻNOŚĆ POMIĘDZY STĘŻENIEM BIOSURFAKTANTÓW W ROZTWORZE A NAPIĘCIEM POWIERZCHNIOWYM ORAZ BIODOSTĘPNOŚCIĄ WĘGLOWODORÓW.	41
RYSUNEK 9 SCHEMAT ANALIZY BIOINFORMATYCZNEJ DANYCH SEKWENCJONOWANIA WYSOKOPRZEPUSTOWEGO TYPU SHOTGUN.....	51
RYSUNEK 10 SCHEMAT ANALIZY GENOMOWEJ PROWADZĄCEJ DO IDENTYFIKACJI GENÓW FUNKcjONALNYCH ZWIĄZANYCH Z DEGRADACJĄ WĘGLOWODORÓW.....	52
RYSUNEK 11 SCHEMAT PRZEDSTAWIAJĄCY METODĘ EKSTRAKCJI BIOSURFAKTANTÓW Z ANOLITÓW POBRANYCH Z OGNIW METODĄ SPE DO ANALIZY LC-MS/MS. WYJAŚNIENIA SKRÓTÓW: ACN – ACETONITRYL, CH ₃ OH – METANOL, H ₂ O – WODA.....	55
RYSUNEK 12 SCHEMAT KONSTRUKCJI JEDNOKOMOROWEGO MFC ZASTOSOWANEGO W EKSPERYMENCIE.	58
RYSUNEK 13 WYKRESY ZMIAN GĘSTOŚCI MOCY GENEROWANEJ PRZECY OGNIWA MFC W FUNKCJI CZASU: A) SERIA ZASILANA GLUKOZĄ, B) SERIA ZASILANA BENZENEM ORAZ GLUKOZĄ. WYJAŚNIENIE OZNACZEŃ: 1 – ZMIANA SUBSTRATÓW NA GLUKOZĘ ORAZ BENZEN I GLUKOZĘ; 2 – WZBOGACENIE KOMÓR ANODOWYCH OSADEM CZYNNYM.	60
RYSUNEK 14 MAKSYMALNE WARTOŚCI GĘSTOŚCI MOCY UZYSKANE W TESTACH LSV (A, B). KRZYWE POLARYZACJI ANOD I KATOD OGNIW MFC (C,D) W WARUNKACH MAKSYMALNEJ WYDAJNOŚCI: 1A, 2A, 3A, 5A, 2B I 5B – DZIEŃ 120; 4A, 1B, 3B I 4B – DZIEŃ 150. LINIE ODPOWIADAJĄCE POTENCJAŁOM ANODOWYM OZNACZONO KOLORAMI O NIŻSZYM NASYCENIU. WYJAŚNIENIE SKRÓTU: SHE – STANDARDOWA ELEKTRODA WODOROWA.....	62
RYSUNEK 15 WARTOŚCI EFEKTYWNOŚCI KULOMBOWSKIEJ (CE) ORAZ STOPNIA USUNIĘCIA CHZT ZMIERZONE PO TRZECH MIESIĄCACH TRWANIA EKSPERYMENTU.....	64

RYSUNEK 16 PORÓWNANIE WIDM $1D\ ^1H$ NMR (SEKWENCJA CPMGPR1D): A) POŻYWKĄ MSM Z GLUKOZĄ (GÓRNE WIDMO) ORAZ REPREZENTATYWNA PRÓBKA Z MFC 1A (DOLNE WIDMO); OZNACZENIA: 1 - GLUKOZA, 2 - MAŚLAN, 3 - PROPIONIAN, 4 - ETANOL, 5 - OCTAN, 6 - BURSZTYNIAN, 7 - GLICEROL, 8 - MRÓWCZAN; B) POŻYWKĄ Z BENZENEM I GLUKOZĄ (GÓRNE WIDMO) ORAZ REPREZENTATYWNA PRÓBKA Z MFC 4B (DOLNE WIDMO); OZNACZENIA: 1 - GLUKOZA, 2 - BENZEN, 3 - ETANOL, 4 - OCTAN, 5 - BURSZTYNIAN, 6 - 5-AMINOLEWULINIAN, 7 - DIMETYLOAMINA, 8 - METANOL, 9 - GLICEROL, 10 - MRÓWCZAN.....	66
RYSUNEK 17 ANALIZA STRUKTURY SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW W SPOŁECZNOŚCIACH ANODOWYCH DEGRADUJĄCYCH GLUKOZĘ (GRUPA A) ORAZ BENZEN I GLUKOZĘ (GRUPA B): A) WZGLĘDNY UDZIAŁ PROCENTOWY POSZCZEGÓLNYCH TYPÓW BAKTERII; B) WZGLĘDNY UDZIAŁ PROCENTOWY POSZCZEGÓLNYCH RODZAJÓW BAKTERII; C) MAPA CIEPLNA PREZENTUJĄCA NAJLICZNIEJ WYSTĘPUJĄCE RODZAJE BAKTERII W BADANYCH PRÓBKACH.....	68
RYSUNEK 18 ANALIZA STRUKTURY SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW UKAZUJĄCA WZGLĘDNY UDZIAŁ PROCENTOWY OKREŚLONEGO GATUNKU BAKTERII W SPOŁECZNOŚCIACH ANODOWYCH DEGRADUJĄCYCH GLUKOZĘ (GRUPA A) ORAZ BENZEN I GLUKOZĘ (GRUPA B).....	69
RYSUNEK 19 ANALIZA STRUKTURY SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW W SPOŁECZNOŚCIACH ANODOWYCH DEGRADUJĄCYCH GLUKOZĘ (GRUPA A) ORAZ BENZEN I GLUKOZĘ (GRUPA B). A) ANALIZA GŁÓWNYCH SKŁADOWYCH W OPARCIU O NAJLICZNIEJSZE RODZAJE BAKTERII; B) WYKRESY PUDEŁKOWE OBRAZUJĄCE ROZKŁAD ALFA-RÓŻNORODNOŚCI MIKROORGANIZMÓW (INDEKS CHAO1) NA POZIOMIE TAKSONOMICZNYM RODZAJU.	72
RYSUNEK 20 SCHEMAT KONSTRUKCJI JEDNOKOMOROWEGO MFC ZASTOSOWANEGO W EKSPERYMENCIE.	76
RYSUNEK 21 WYKRES SŁUPKOWY PRZEDSTAWIAJĄCY MAKSYMALNE GĘSTOŚCI MOCY UZYSKANE W TESTACH WOLTAMPEROMETRII LINIOWEJ (LSV) W 10., 15. ORAZ 18. TYGODNIU TRWANIA EKSPERYMENTU.....	78
RYSUNEK 22 ANALIZA STRUKTURY SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW PRZEDSTAWIAJĄCE WYKRESY SŁUPKOWE WZGLĘDNEJ LICZEBNOŚCI TAKSONÓW NA POZIOMIE TYPU W PRÓBKACH PLANKTONICZNYCH I BIOFILMU ANODOWEGO Z MFC ORAZ W PRÓBCE INOKULUM PIERWOTNEGO. WYJAŚNIENIA SYMBOLI: INOKULUM – MIKROBIOM POCZĄTKOWY; T1 – MIKROBIOM PLANKTONICZNY ZEBRANY PO 10. TYGODNIACH PRACY UKŁADU; T2 – MIKROBIOM PLANKTONICZNY ZEBRANY PO 15. TYGODNIACH PRACY UKŁADU; A – MIKROBIOM ANODOWY ZEBRANY W 18. TYGODNIU, POD KONIEC EKSPERYMENTU.....	79
RYSUNEK 23 ANALIZA STRUKTURY SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW PRZEDSTAWIONA NA WYKRESIE PCA, OPRACOWANYM NA PODSTAWIE WZGLĘDNEGO UDZIAŁU TAKSONÓW NA POZIOMIE RODZAJU. WYJAŚNIENIA SYMBOLI: INOKULUM – MIKROBIOM POCZĄTKOWY; T1 – MIKROBIOM PLANKTONICZNY ZEBRANY PO 10. TYGODNIACH PRACY UKŁADU; T2 – MIKROBIOM PLANKTONICZNY ZEBRANY PO 15. TYGODNIACH PRACY UKŁADU; A – MIKROBIOM ANODOWY ZEBRANY W 18. TYGODNIU, POD KONIEC EKSPERYMENTU.....	80
RYSUNEK 24 ANALIZA STRUKTURY SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW PRZEDSTAWIAJĄCA WYKRESY PUDEŁKOWE OBRAZUJĄCE ROZKŁAD ALFA-RÓŻNORODNOŚCI MIKROORGANIZMÓW (INDEKS CHAO1) NA POZIOMIE TAKSONOMICZNYM GATUNKU W TRZECH GRUPACH DOŚWIADCZALNYCH. WYJAŚNIENIA SYMBOLI: T1 – MIKROBIOM PLANKTONICZNY ZEBRANY PO 10. TYGODNIACH PRACY UKŁADU; T2 – MIKROBIOM PLANKTONICZNY ZEBRANY PO 15. TYGODNIACH PRACY UKŁADU A – MIKROBIOM ANODOWY ZEBRANY W 18. TYGODNIU, POD KONIEC EKSPERYMENTU.	81
RYSUNEK 25 ANALIZA STRUKTURY SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW PRZEDSTAWIAJĄCA: A) MAPĘ CIEPLNĄ WZGLĘDNEJ LICZEBNOŚCI DZIESIĘCIU NAJLICZNIEJ REPREZENTOWANYCH RODZAJÓW BAKTERII W PRÓBKACH PLANKTONICZNYCH ORAZ BIOFILMU ANODOWEGO Z MFC; B) MAPĘ CIEPLNĄ WZGLĘDNEJ LICZEBNOŚCI RODZAJÓW BAKTERII EGZOELEKTROGENNYCH, ZDOLNYCH DO BIODEGRADACJI ZWIĄZKÓW ROPOPOCHODNYCH ORAZ SYNTEZY BIOSURFAKTANTÓW	

(NA PODSTAWIE DANYCH LITERATUROWYCH) W TYCH SAMYCH TYPACH PRÓBEK. WYJAŚNIENIA SYMBOLI: INOKULUM – MIKROBIOM POCZĄTKOWY; T1 – MIKROBIOM PLANKTONICZNY ZEBRANY PO 10. TYGODNIACH PRACY UKŁADU; T2 – MIKROBIOM PLANKTONICZNY ZEBRANY PO 15. TYGODNIACH PRACY UKŁADU; A – MIKROBIOM ANODOWY ZEBRANY W 18. TYGODNIU, POD KONIEC EKSPERYMENTU.....	83
RYSUNEK 26 ANALIZA SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW: DENDROGRAM PRZEDSTAWIAJĄCY WYNIKI ANALIZY SKUPIEŃ HIERARCHICZNYCH PRÓBEK PLANKTONICZNYCH ORAZ BIOFILMU ANODOWEGO Z MFC, OPRACOWANEJ NA PODSTAWIE WZGLĘDNEJ LICZEBNOŚCI BAKTERII NA POZIOMIE RODZAJU. WYJAŚNIENIA SYMBOLI: INOKULUM – MIKROBIOM POCZĄTKOWY; T1 – MIKROBIOM PLANKTONICZNY ZEBRANY PO 10. TYGODNIACH PRACY UKŁADU; T2 – MIKROBIOM PLANKTONICZNY ZEBRANY PO 15. TYGODNIACH PRACY UKŁADU; A – MIKROBIOM ANODOWY ZEBRANY W 18. TYGODNIU, POD KONIEC EKSPERYMENTU.....	84
RYSUNEK 27 KONSTRUKCJA HORYZONTALNEGO, JEDNOKOMOROWEGO MFC Z KATODĄ POWIETRZNĄ ZASTOSOWANEGO W EKSPERYMENCIE.....	87
RYSUNEK 28 WYKRESY PRZEDSTAWIAJĄCE ZMIANY GĘSTOŚCI MOCY W CZASIE TRWANIA EKSPERYMENTU DLA OGNIW ZASILANYCH ROPĄ NAFTOWĄ I OCTANEM (SERIA A) ORAZ WYŁĄCZNIE ROPĄ NAFTOWĄ (SERIA B). OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – JEZIORO POKOPALNIANE, MFC 2 – LODOWIEC, MFC 3 – RZĘKA POŁODOWCOWA, MFC 4 – GLEBA TROPICALNA, MFC 5 – WULKAN BŁOTNY, MFC 6 – KANAŁ ŚCIEKOWY W OKOLICY STACJI PALIW, MFC 7 – OKOLICE SKRZYŃKI ROZŁADUNKU PALIW NA STACJI PALIW, MFC 8 – SEPARATOR SUBSTANCJI ROPOPOCHODNYCH NA STACJI PALIW, MFC 9 – PARKING MIEJSKI.....	90
RYSUNEK 29 WYKRES PREZENTUJĄCY MINIMALNE WARTOŚCI NAPIĘCIA POWIERZCHNIOWEGO ANOLITÓW Z SERII A I B, ZAREJESTROWANE W TRAKCIE CAŁEGO PRZEBIEGU EKSPERYMENTU. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – JEZIORO POKOPALNIANE, MFC 2 – LODOWIEC, MFC 3 – RZĘKA POŁODOWCOWA, MFC 4 – GLEBA TROPICALNA, MFC 5 – WULKAN BŁOTNY, MFC 6 – KANAŁ ŚCIEKOWY W OKOLICY STACJI PALIW, MFC 7 – OKOLICE SKRZYŃKI ROZŁADUNKU PALIW NA STACJI PALIW, MFC 8 – SEPARATOR SUBSTANCJI ROPOPOCHODNYCH NA STACJI PALIW, MFC 9 – PARKING MIEJSKI.....	93
RYSUNEK 30 ANALIZA STRUKTURY SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW PRZEDSTAWIAJĄCA WZGLĘDNY UDZIAŁ PROCENTOWY: A) TRZECH NAJLICZNIJSZYCH TYPÓW ARCHEONÓW ORAZ B) SZĘŚCIU NAJLICZNIJSZYCH RODZAJÓW ARCHEONÓW, W SPOŁECZNOŚCIACH ANODOWYCH UCZESTNICZĄCYCH W DEGRADACJI ROPY NAFTOWEJ I OCTANU. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – JEZIORO POKOPALNIANE, MFC 2 – LODOWIEC, MFC 3 – RZĘKA POŁODOWCOWA, MFC 4 – GLEBA TROPICALNA, MFC 5 – WULKAN BŁOTNY, MFC 6 – KANAŁ ŚCIEKOWY W OKOLICY STACJI PALIW, MFC 7 – OKOLICE SKRZYŃKI ROZŁADUNKU PALIW NA STACJI PALIW, MFC 8 – SEPARATOR SUBSTANCJI ROPOPOCHODNYCH NA STACJI PALIW, MFC 9 – PARKING MIEJSKI.....	95
RYSUNEK 31 ANALIZA STRUKTURY SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW PRZEDSTAWIAJĄCA WZGLĘDNY UDZIAŁ PROCENTOWY PIĘCIU NAJLICZNIJSZYCH TYPÓW BAKTERII (ORAZ KLAS W PRZYPADKU TYPU PROTEOBACTERIA) W SPOŁECZNOŚCIACH ANODOWYCH UCZESTNICZĄCYCH W BIODEGRADACJI ROPY NAFTOWEJ I OCTANU. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – JEZIORO POKOPALNIANE, MFC 2 – LODOWIEC, MFC 3 – RZĘKA POŁODOWCOWA, MFC 4 – GLEBA TROPICALNA, MFC 5 – WULKAN BŁOTNY, MFC 6 – KANAŁ ŚCIEKOWY W OKOLICY STACJI PALIW, MFC 7 – OKOLICE SKRZYŃKI ROZŁADUNKU PALIW NA STACJI PALIW, MFC 8 – SEPARATOR SUBSTANCJI ROPOPOCHODNYCH NA STACJI PALIW, MFC 9 – PARKING MIEJSKI.....	96
RYSUNEK 32 A) ANALIZA STRUKTURY SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW ŚRODOWISK GÓRSKICH PRZEDSTAWIAJĄCA WZGLĘDNY UDZIAŁ PROCENTOWY NAJLICZNIJSZYCH DZIESIĘCIU RODZAJÓW BAKTERII W SPOŁECZNOŚCIACH ANODOWYCH ODPOWIEDZIALNYCH ZA DEGRADACJĘ ROPY NAFTOWEJ I OCTANU. B) DIAGRAM VENNA PRZEDSTAWIAJĄCY PORÓWNANIE SKŁADU TAKSONOMICZNEGO (POZIOM RODZAJU) SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW POMIĘDZY POSZCZEGÓLNYMI PRÓBKAMI, PRZY UWZGLĘDNIENIU TYLKO TAKSONÓW O WZGLĘDNYM UDZIALE	

- >0,05 %. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – JEZIORO POKOPALNIANE, MFC 2 – LODOWIEC, MFC 3 – RZEKA POŁODOWCOWA..... 98
- RYSUNEK 33 A) ANALIZA STRUKTURY SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW POCHODZĄCYCH Z GLEB AZJATYCKICH PRZEDSTAWIAJĄCA WZGLĘDNY UDZIAŁ PROCENTOWY NAJLICZNIJSZYCH DZIESIĘCIU RODZAJÓW BAKTERII W SPOŁECZNOŚCIACH ANODOWYCH ODPOWIEDZIALNYCH ZA DEGRADACJĘ ROPY NAFTOWEJ I OCTANU. B) DIAGRAM VENNA PRZEDSTAWIAJĄCY PORÓWNANIE SKŁADU TAKSONOMICZNEGO (POZIOM RODZAJU) SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW POMIĘDZY POSZCZEGÓLNYMI PRÓBKAMI, PRZY UWZGLĘDNIENIU TYLKO TAKSONÓW O WZGLĘDNYM UDZIALE >0,05 %. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 4 – GLEBA TROPIKALNA, MFC 5 – WULKAN BŁOTNY. 100
- RYSUNEK 34 ANALIZA STRUKTURY SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW PRZEDSTAWIAJĄCA WZGLĘDNY UDZIAŁ PROCENTOWY NAJLICZNIJSZYCH DZIESIĘCIU RODZAJÓW POSZCZEGÓLNYCH RODZAJÓW BAKTERII W SPOŁECZNOŚCIACH ANODOWYCH ODPOWIEDZIALNYCH ZA DEGRADACJĘ ROPY NAFTOWEJ I OCTANU: ŚRODOWISKA SKAŻONE ZWIĄZKAMI ROPOPOCHODNYMI. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 6 – KANAŁ ŚCIEKOWY W OKOLICY STACJI PALIW, MFC 7 – OKOLICE SKRZYNKI ROZŁADUNKU PALIW NA STACJI PALIW, MFC 8 – SEPARATOR SUBSTANCJI ROPOPOCHODNYCH NA STACJI PALIW, MFC 9 – PARKING MIEJSKI. 101
- RYSUNEK 35 A) DIAGRAM VENNA PRZEDSTAWIAJĄCY PORÓWNANIE SKŁADU TAKSONOMICZNEGO (POZIOM RODZAJU) SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW POMIĘDZY POSZCZEGÓLNYMI PRÓBKAMI POCHODZĄCYMI ZE ŚRODOWISK SKAŻONYCH ZWIĄZKAMI ROPOPOCHODNYMI, PRZY UWZGLĘDNIENIU TYLKO TAKSONÓW O WZGLĘDNYM UDZIALE >0,05 %. B) DIAGRAM VENNA PRZEDSTAWIAJĄCY PORÓWNANIE SKŁADU TAKSONOMICZNEGO (POZIOM RODZAJU) SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW POMIĘDZY PRÓBKAMI MFC 9A I MFC 9B, PRZY UWZGLĘDNIENIU TYLKO TAKSONÓW O WZGLĘDNYM UDZIALE >0,05 %. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 6 – KANAŁ ŚCIEKOWY W OKOLICY STACJI PALIW, MFC 7 – OKOLICE SKRZYNKI ROZŁADUNKU PALIW NA STACJI PALIW, MFC 8 – SEPARATOR SUBSTANCJI ROPOPOCHODNYCH NA STACJI PALIW, MFC 9 – PARKING MIEJSKI. 104
- RYSUNEK 36 DIAGRAM VENNA PRZEDSTAWIAJĄCY PORÓWNANIE SKŁADU TAKSONOMICZNEGO SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW NA POZIOMIE RODZAJU POMIĘDZY GRUPAMI PRÓBEK. NA DIAGRAMIE UWZGLĘDNIONO WYŁĄCZNIE RODZAJE BAKTERII WSPÓLNE DLA WSZYSTKICH PRÓBEK W OBRĘBIE DANEJ GRUPY (O WZGLĘDNYM UDZIALE > 0,05 %). 105
- RYSUNEK 37 ANALIZA STRUKTURY SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW PRZEDSTAWIAJĄCA WYKRESY PUNKTOWE I PUDEŁKOWE OBRAZUJĄCE ROZKŁAD ALFA-RÓŻNORODNOŚCI (INDEKS CHAO1) NA POZIOMIE TAKSONOMICZNYM RODZAJU W TRZECH GRUPACH DOŚWIADCZALNYCH: ŚRODOWISKA GÓRSKIE, GLEBA AZJATYCKA ORAZ ŚRODOWISKA SKAŻONE ROPOPOCHODNYMI. WYKRES A) PRZEDSTAWIA WARTOŚCI WSKAŹNIKA CHAO1 W POSZCZEGÓLNYCH PRÓBKACH; OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – JEZIORO POKOPALNIANE, MFC 2 – LODOWIEC, MFC 3 – RZEKA POŁODOWCOWA, MFC 4 – GLEBA TROPIKALNA, MFC 5 – WULKAN BŁOTNY, MFC 6 – KANAŁ ŚCIEKOWY W OKOLICY STACJI PALIW, MFC 7 – OKOLICE SKRZYNKI ROZŁADUNKU PALIW NA STACJI PALIW, MFC 8 – SEPARATOR SUBSTANCJI ROPOPOCHODNYCH NA STACJI PALIW, MFC 9 – PARKING MIEJSKI. WYKRES B) ILUSTRUJE PORÓWNANIE ROZKŁADU ALFA-RÓŻNORODNOŚCI POMIĘDZY GRUPAMI. ZASTOSOWANO TEST WELCH'A (ANOVA) Z ANALIZĄ PORÓWNAŃ POST-HOC W CELU WYKRYCIA ISTOTNYCH RÓŻNIC STATYSTYCZNYCH. P-VALUE:0,002, [ANOVA] F-VALUE: 16,243. 106
- RYSUNEK 38 DENDROGRAM POKAZUJĄCY PODOBIENSTWO TAKSONOMICZNE SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW W MFC, WYGENEROWANY NA PODSTAWIE WZGLĘDNEJ LICZEBNOŚCI TAKSONÓW NA POZIOMIE RODZAJU. DO OBLICZENIA MACIERZY NIEPODOBIENSTWA ZASTOSOWANO INDEKS BRAYA-CURTISA, A DO GRUPOWANIA HIERARCHICZNEGO METODĘ WARD. KOLORY OZNACZAJĄ TYP INOKULUM UŻYTEGO DO ZASZCZEPIANIA OGNIW: NIEBIESKI – ŚRODOWISKA GÓRSKIE, ZIELONY – GLEBY AZJATYCKIE, CZERWONY – ŚRODOWISKA SKAŻONE ZWIĄZKAMI ROPOPOCHODNYMI. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – JEZIORO POKOPALNIANE, MFC 2 – LODOWIEC, MFC 3 – RZEKA POŁODOWCOWA, MFC 4 – GLEBA TROPIKALNA, MFC 5 – WULKAN

BŁOTNY, MFC 6 – KANAŁ ŚCIEKOWY W OKOLICY STACJI PALIW, MFC 7 – OKOLICE SKRZYNKI ROZŁADUNKU PALIW NA STACJI PALIW, MFC 8 – SEPARATOR SUBSTANCJI ROPOPOCHODNYCH NA STACJI PALIW, MFC 9 – PARKING MIEJSKI.....	107
RYSUNEK 39 WYKRES PCA W OPARCIU O DZIESIĘĆ NAJLICZNIEJSZYCH RODZAJÓW Z KAŻDEJ SPOŁECZNOŚCI ANODOWEJ W EKSPERYMENCIE. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – JEZIORO POKOPALNIANE, MFC 2 – LODOWIEC, MFC 3 – RZEKA POŁODOWCOWA, MFC 4 – GLEBA TROPIKALNA, MFC 5 – WULKAN BŁOTNY, MFC 6 – KANAŁ ŚCIEKOWY W OKOLICY STACJI PALIW, MFC 7 – OKOLICE SKRZYNKI ROZŁADUNKU PALIW NA STACJI PALIW, MFC 8 – SEPARATOR SUBSTANCJI ROPOPOCHODNYCH NA STACJI PALIW, MFC 9 – PARKING MIEJSKI.....	108
RYSUNEK 40 MAPA CIEPLNA PRZEDSTAWIAJĄCA ZNORMALIZOWANE WARTOŚCI (RPKG) GENÓW ZAANGAŻOWANYCH W DEGRADACJĘ WĘGLOWODORÓW ALIFATYCZNYCH. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – JEZIORO POKOPALNIANE, MFC 2 – LODOWIEC, MFC 3 – RZEKA POŁODOWCOWA, MFC 4 – GLEBA TROPIKALNA, MFC 5 – WULKAN BŁOTNY, MFC 6 – KANAŁ ŚCIEKOWY W OKOLICY STACJI PALIW, MFC 7 – OKOLICE SKRZYNKI ROZŁADUNKU PALIW NA STACJI PALIW, MFC 8 – SEPARATOR SUBSTANCJI ROPOPOCHODNYCH NA STACJI PALIW, MFC 9 – PARKING MIEJSKI.....	113
RYSUNEK 41 MAPA CIEPLNA PRZEDSTAWIAJĄCA ZNORMALIZOWANE WARTOŚCI (RPKG) GENÓW ZAANGAŻOWANYCH W DEGRADACJĘ WĘGLOWODORÓW MONOAROMATYCZNYCH. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – JEZIORO POKOPALNIANE, MFC 2 – LODOWIEC, MFC 3 – RZEKA POŁODOWCOWA, MFC 4 – GLEBA TROPIKALNA, MFC 5 – WULKAN BŁOTNY, MFC 6 – KANAŁ ŚCIEKOWY W OKOLICY STACJI PALIW, MFC 7 – OKOLICE SKRZYNKI ROZŁADUNKU PALIW NA STACJI PALIW, MFC 8 – SEPARATOR SUBSTANCJI ROPOPOCHODNYCH NA STACJI PALIW, MFC 9 – PARKING MIEJSKI.....	114
RYSUNEK 42 MAPA CIEPLNA PRZEDSTAWIAJĄCA ZNORMALIZOWANE WARTOŚCI (RPKG) GENÓW ZAANGAŻOWANYCH W DEGRADACJĘ WIELOPIERŚCIENIOWYCH WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH (WWA). OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – JEZIORO POKOPALNIANE, MFC 2 – LODOWIEC, MFC 3 – RZEKA POŁODOWCOWA, MFC 4 – GLEBA TROPIKALNA, MFC 5 – WULKAN BŁOTNY, MFC 6 – KANAŁ ŚCIEKOWY W OKOLICY STACJI PALIW, MFC 7 – OKOLICE SKRZYNKI ROZŁADUNKU PALIW NA STACJI PALIW, MFC 8 – SEPARATOR SUBSTANCJI ROPOPOCHODNYCH NA STACJI PALIW, MFC 9 – PARKING MIEJSKI.....	117
RYSUNEK 43 MAPA CIEPLNA PRZEDSTAWIAJĄCA ZNORMALIZOWANE WARTOŚCI (RPKG) GENÓW ZAANGAŻOWANYCH W BEZTLENOWĄ DEGRADACJĘ WĘGLOWODORÓW. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – JEZIORO POKOPALNIANE, MFC 2 – LODOWIEC, MFC 3 – RZEKA POŁODOWCOWA, MFC 4 – GLEBA TROPIKALNA, MFC 5 – WULKAN BŁOTNY, MFC 6 – KANAŁ ŚCIEKOWY W OKOLICY STACJI PALIW, MFC 7 – OKOLICE SKRZYNKI ROZŁADUNKU PALIW NA STACJI PALIW, MFC 8 – SEPARATOR SUBSTANCJI ROPOPOCHODNYCH NA STACJI PALIW, MFC 9 – PARKING MIEJSKI.....	118
RYSUNEK 44 ANALIZA GŁÓWNYCH SKŁADOWYCH (PCA) PRZEDSTAWIAJĄCA ZRÓŻNICOWANIE FUNKCJONALNE SPOŁECZNOŚCI MIKROORGANIZMÓW W OGNIWACH MFC NA PODSTAWIE PROFILU GENÓW ZWIĄZANYCH Z DEGRADACJĄ ZWIĄZKÓW ROPOPOCHODNYCH. (A) DWUWYMIAROWY WYKRES PCA UWZGLĘDNIAJĄCY PIERWSZĄ I DRUGĄ SKŁADOWĄ GŁÓWNAJĄ (PC1 I PC2). (B) TRÓJWYMIAROWY WYKRES PCA UWZGLĘDNIAJĄCY TRZY PIERWSZE SKŁADOWE GŁÓWNE (PC1, PC2 I PC3). OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – JEZIORO POKOPALNIANE, MFC 2 – LODOWIEC, MFC 3 – RZEKA POŁODOWCOWA, MFC 4 – GLEBA TROPIKALNA, MFC 5 – WULKAN BŁOTNY, MFC 6 – KANAŁ ŚCIEKOWY W OKOLICY STACJI PALIW, MFC 7 – OKOLICE SKRZYNKI ROZŁADUNKU PALIW NA STACJI PALIW, MFC 8 – SEPARATOR SUBSTANCJI ROPOPOCHODNYCH NA STACJI PALIW, MFC 9 – PARKING MIEJSKI.....	121
RYSUNEK 45 KONSTRUKCJA JEDNOKOMOROWEGO MFC ZASTOSOWANEGO W EKSPERYMENCIE.	126
RYSUNEK 46 GĘSTOŚĆ MOCY GENEROWANA PRZEZ OGNIWA MFC 1, 2, 3, REJESTROWANA W CZASIE RZECZYWISTYM. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z KANAŁU ŚCIEKOWEGO STACJI PALIW, MFC 2 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE	

Z SEPARATORA ROPOPOCHODNYCH, MFC 3 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z GLEBY TROPIKALNEJ.	127
RYSUNEK 47 ZMIANY GĘSTOŚCI MOCY W CZASIE (A) ORAZ ODPOWIADAJĄCE IM WARTOŚCI REZYSTANCJI WEWNĘTRZNEJ UKŁADU (B) UZYSKANE Z POMIARÓW WOLTAMPEROMETRII LINIOWEJ DLA MFC 1, MFC 2 I MFC 3 W TRAKCIE TRWANIA EKSPERYMENTU. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z KANAŁU ŚCIEKOWEGO STACJI PALIW, MFC 2 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z SEPARATORA ROPOPOCHODNYCH, MFC 3 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z GLEBY TROPIKALNEJ.	129
RYSUNEK 48 WYKRESY NYQUISTA UZYSKANE Z TESTÓW SPEKTROSKOPII IMPEDANCYJNEJ (EIS) W 4 I 12 MIESIĄCU PRACY POSZCZEGÓLNYCH OGNIW. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z KANAŁU ŚCIEKOWEGO STACJI PALIW, MFC 2 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z SEPARATORA ROPOPOCHODNYCH, MFC 3 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z GLEBY TROPIKALNEJ.	130
RYSUNEK 49 ANALIZA DANYCH Z TESTÓW SPEKTROSKOPII IMPEDANCYJNEJ (EIS) Z WYKORZYSTANIEM MODELU OBWODU RÓWNOWAŻNEGO (ECM), PRZEDSTAWIONEGO NA ŚRODKU WYKRESU, UZYSKANYCH PO 4 I 12 MIESIĄCACH PRACY OGNIW. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z KANAŁU ŚCIEKOWEGO STACJI PALIW, MFC 2 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z SEPARATORA ROPOPOCHODNYCH, MFC 3 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z GLEBY TROPIKALNEJ.	130
RYSUNEK 50 WOLTAMOGRAMY CYKLICZNE DLA MFC 1, MFC 2 ORAZ MFC 3 W 4. I 12. MIESIĄCU EKSPERYMENTU. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z KANAŁU ŚCIEKOWEGO STACJI PALIW, MFC 2 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z SEPARATORA ROPOPOCHODNYCH, MFC 3 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z GLEBY TROPIKALNEJ.	132
RYSUNEK 51 EFEKTYWNOŚĆ KULOMBOWSKA (CE, PRZEDSTAWIONA W FORMIE SŁUPKÓW) ORAZ USUNIĘCIE CHZT (PRZEDSTAWIONE W FORMIE KWADRATÓW), ZMIERZONE PO SIĘDMIU MIESIĄCACH TRWANIA EKSPERYMENTU. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z KANAŁU ŚCIEKOWEGO STACJI PALIW, MFC 2 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z SEPARATORA ROPOPOCHODNYCH, MFC 3 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z GLEBY TROPIKALNEJ.	133
RYSUNEK 52 A) WZGLĘDNY STOPIEŃ USUNIĘCIA WSZYSTKICH ZWIĄZKÓW WYKRYTYCH ZA POMOCĄ METODY GC-MS, B) WZGLĘDNA ZMIANA POWIERZCHNI SYGNAŁÓW WYKRYTYCH ZWIĄZKÓW W ANOLITACH MFC DEGRADUJĄCYCH ROPEŃ NAFTOWĄ I OCTAN. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z KANAŁU ŚCIEKOWEGO STACJI PALIW, MFC 2 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z SEPARATORA ROPOPOCHODNYCH, MFC 3 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z GLEBY TROPIKALNEJ.....	135
RYSUNEK 53 ANALIZA SPOŁECZNOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ NA POZIOMACH TAKSONOMICZNYCH: TYPU, RODZAJU I GATUNKU WE WZBOGACONYM KONSORCJUM ANODOWYM Z GLEBY TROPIKALNEJ (MFC 3).....	136
RYSUNEK 54 ANALIZA MORFOLOGII BIOFILMU ANODOWEGO, ZDJĘCIA SEM. OZNACZENIA: NIEBIESKIE STRZAŁKI: KROPLE SUBSTRATU, ŻÓLTE STRZAŁKI: SFERYCZNE SKUPISKA BAKTERII, ZIELONE STRZAŁKI: PRZEWODZĄCE NANOWŁÓKNA BIAŁKOWE EGZOELEKTROGENÓW.....	138
RYSUNEK 55 ANALIZA PORÓWNAWCZA NAJNIŻSZYCH WARTOŚCI NAPIĘCIA POWIERZCHNIOWEGO ORAZ MAKSYMALNYCH WARTOŚCI GĘSTOŚCI MOCY ZAREJESTROWANYCH PODCZAS EKSPERYMENTU. OZNACZENIE PRÓBEK: MFC 1 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z KANAŁU ŚCIEKOWEGO STACJI PALIW, MFC 2 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z SEPARATORA ROPOPOCHODNYCH, MFC 3 – WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z GLEBY TROPIKALNEJ.	139

RYSUNEK 56 TESTY EMULSYFIKACJI ANOLITÓW Z MFC 3 (WZBOGACONE KONSORCJUM ANODOWE Z GLEBY TROPIKALNEJ), ZASILANEGO ROPĄ NAFTOWĄ ORAZ OCTANEM. OD LEWEJ: ROPA NAFTOWA (E24=100%), OLEJ ROŚLINNY (E24=100%) I KWAS OLEINOWY (E24=96%).	140
RYSUNEK 57 WZORY STRUKTURALNE RAMNOLIPIDÓW ZIDENTYFIKOWANYCH W PRÓBKACH ANOLITÓW POCHODZĄCYCH Z MFC WYKORZYSTYWANYCH DO DEGRADACJI ROPY NAFTOWEJ ORAZ OCTANU SODU.	142
RYSUNEK 58 KONSTRUKCJA HORYZONTALNEGO MFC ZASTOSOWANEGO W EKSPERYMENCIE.....	145
RYSUNEK 59 MAKSYMALNA GĘSTOŚĆ MOCY (MW/M ²) ORAZ MINIMALNE NAPIĘCIE POWIERZCHNIOWE (MN/M) ANOLITU UZYSKANE W MIKROBIOLOGICZNYCH OGNIWACH PALIWOWYCH ZASILANYCH POSMAŻALNICZYM OLEJEM ROŚLINNYM, W ZALEŻNOŚCI OD STĘŻENIA AZOTU (NH ₄ CL) W PODŁOŻU MINERALNYM. DANE PRZEDSTAWIAJĄ WARTOŚCI ŚREDNIE DLA TRZECH POWTÓRZEŃ DLA POSZCZEGÓLNYCH WARIANTÓW ZAWIERAJĄCYCH 0, 0,05, 0,2, 0,5 ORAZ 1,0 G/L NH ₄ CL.	146
RYSUNEK 60 ANALIZA RAMNOLIPIDÓW METODĄ LC-MS/MS: A) WYDZIELONY CHROMATOGRAM JONOWY DLA RHA-C10 NALEŻĄCEGO DO GRUPY MONORAMNOLIPIDÓW B) MODELOWE WIDMO MASOWE C, C) EKSPERYMENTALNE WIDMO MASOWE DLA RHA-C10, D) WYDZIELONY CHROMATOGRAM JONOWY DLA RHA-RHA-C10-C8/RHA-RHA-C8-C10 Z GRUPY DIRAMNOLIPIDÓW, E) MODELOWE WIDMO MASOWE DLA RHA-RHA-C10-C8/RHA-RHA-C8-C10, F) EKSPERYMENTALNE WIDMO MASOWE POTWIERDZAJĄCE OBECNOŚĆ RHA-RHA-C10-C8/RHA-RHA-C8-C10.	149
RYSUNEK 61 WZORY STRUKTURALNE RAMNOLIPIDÓW ZIDENTYFIKOWANYCH W PRÓBKACH ANOLITÓW POCHODZĄCYCH Z MFC WYKORZYSTYWANYCH DO DEGRADACJI OLEJU POSMAŻALNICZEGO.	150
RYSUNEK 62 WYKRESY SŁUPKOWE PRZEDSTAWIAJĄCE WZGLĘDNY UDZIAŁ PROCENTOWY BAKTERII NA POZIOMIE TYPU, RODZAJU I GATUNKU W MIKROBIOMIE ANODOWYM MFC ZASILANYM OLEJEM POSMAŻALNICZYM.	151

8. BIBLIOGRAFIA

- [1] S. J. Varjani, E. Gnansounou, i A. Pandey, „Comprehensive review on toxicity of persistent organic pollutants from petroleum refinery waste and their degradation by microorganisms”, *Chemosphere*, t. 188, s. 280–291, 2017, doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.09.005.
- [2] W. H. Foo, W. Y. Chia, D. Y. Y. Tang, S. S. N. Koay, S. S. Lim, i K. W. Chew, „The conundrum of waste cooking oil: Transforming hazard into energy”, *J. Hazard. Mater.*, t. 417, s. 126129, wrz. 2021, doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2021.126129.
- [3] B. A. Mekonnen, T. A. Aragaw, i M. B. Genet, „Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: a review on principles, degradation mechanisms, and advancements”, *Front. Environ. Sci.*, t. 12, s. 1354422, luty 2024, doi: 10.3389/fenvs.2024.1354422.
- [4] Y. He, Q. Zhou, F. Mo, T. Li, i J. Liu, „Bioelectrochemical degradation of petroleum hydrocarbons: A critical review and future perspectives”, *Environmental Pollution*, t. 306, s. 119344, sie. 2022, doi: 10.1016/J.ENVPOL.2022.119344.
- [5] T. Li, R. Li, i Q. Zhou, „The application and progress of bioelectrochemical systems (BESs) in soil remediation: A review”, *Green Energy & Environment*, t. 6, nr 1, s. 50–65, luty 2021, doi: 10.1016/J.GEE.2020.06.026.
- [6] R. Boopathy, „Anaerobic biodegradation of no. 2 diesel fuel in soil: a soil column study”, *Bioresour. Technol.*, t. 94, nr 2, s. 143–151, wrz. 2004, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2003.12.006.
- [7] J. Lan *i in.*, „An overview of bioelectrokinetic and bioelectrochemical remediation of petroleum-contaminated soils”, *Environmental Science and Ecotechnology*, t. 16, s. 100278, paź. 2023, doi: 10.1016/J.ESE.2023.100278.
- [8] A. de Rosset *i in.*, „Bioelectrochemical synthesis of rhamnolipids and energy production and its correlation with nitrogen in air-cathode microbial fuel cells”, *J. Environ. Manage.*, t. 365, s. 121514, sie. 2024, doi: 10.1016/J.JENVMAN.2024.121514.
- [9] X. Wang, Z. Cai, Q. Zhou, Z. Zhang, i C. Chen, „Bioelectrochemical stimulation of petroleum hydrocarbon degradation in saline soil using U-tube microbial fuel cells”, *Biotechnol. Bioeng.*, t. 109, nr 2, s. 426–433, luty 2012, doi: 10.1002/bit.23351.
- [10] J. M. Morris, S. Jin, B. Crimi, i A. Pruden, „Microbial fuel cell in enhancing anaerobic biodegradation of diesel”, *Chemical Engineering Journal*, t. 146, nr 2, s. 161–167, luty 2009, doi: 10.1016/J.CEJ.2008.05.028.
- [11] S. S. Kumar *i in.*, „Microbial fuel cells (MFCs) for bioelectrochemical treatment of different wastewater streams”, *Fuel*, t. 254, s. 115526, paź. 2019, doi: 10.1016/j.fuel.2019.05.109.

- [12] G. Mohanakrishna, I. M. Abu-Reesh, i R. I. Al-Raoush, „Biological anodic oxidation and cathodic reduction reactions for improved bioelectrochemical treatment of petroleum refinery wastewater”, *J. Clean. Prod.*, t. 190, s. 44–52, lip. 2018, doi: 10.1016/j.jclepro.2018.04.141.
- [13] X. Zhang *i in.*, „Bioelectric field accelerates the conversion of carbon and nitrogen in soil bioelectrochemical systems”, *J. Hazard. Mater.*, t. 388, s. 121790, kwi. 2020, doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2019.121790.
- [14] H. Guo *i in.*, „The oil removal and the characteristics of changes in the composition of bacteria based on the oily sludge bioelectrochemical system”, *Sci. Rep.*, t. 10, nr 1, s. 1–10, grudz. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-72405-9.
- [15] A. Sharma, „Hazardous Effects of Petrochemical Industries: A Review”, *Recent Advances in Petrochemical Science*, t. 3, nr 2, wrz. 2017, doi: 10.19080/RAPSCI.2017.03.555607.
- [16] R. J. Clews, „Fundamentals of the Petroleum Industry”, *Project Finance for the International Petroleum Industry*, s. 83–99, sty. 2016, doi: 10.1016/B978-0-12-800158-5.00005-0.
- [17] I. C. Ossai, A. Ahmed, A. Hassan, i F. S. Hamid, „Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review”, *Environ. Technol. Innov.*, t. 17, s. 100526, luty 2020, doi: 10.1016/J.ETI.2019.100526.
- [18] R. Bachmann, A. Johnson, i R. Edyvean, „Biotechnology in the petroleum industry: An overview”, *Int. Biodeterior. Biodegradation*, t. 86, s. 225–237, sty. 2014, doi: 10.1016/j.ibiod.2013.09.011.
- [19] M. I. Ramirez, A. P. Arevalo, S. Sotomayor, i N. Bailon-Moscoso, „Contamination by oil crude extraction – Refinement and their effects on human health”, *Environmental Pollution*, t. 231, s. 415–425, grudz. 2017, doi: 10.1016/J.ENVPOL.2017.08.017.
- [20] F. Abbasian, R. Lockington, M. Mallavarapu, i R. Naidu, „A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria”, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2015 176:3, t. 176, nr 3, s. 670–699, maj 2015, doi: 10.1007/S12010-015-1603-5.
- [21] H. Guo *i in.*, „Effects of petroleum contamination on soil microbial numbers, metabolic activity and urease activity”, *Chemosphere*, 2012.
- [22] H. Gao, M. Wu, H. Liu, Y. Xu, i Z. Liu, „Effect of petroleum hydrocarbon pollution levels on the soil microecosystem and ecological function”, *Environmental Pollution*, t. 293, sty. 2022, doi: 10.1016/j.envpol.2021.118511.
- [23] S. An *i in.*, „Groundwater-level fluctuation effects on petroleum hydrocarbons in vadose zones and their potential risks: Laboratory studies”, *J. Hazard. Mater.*, t. 463, s. 132837, luty 2024, doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2023.132837.

- [24] H. Bahadar, S. Mostafalou, i M. Abdollahi, „Current understandings and perspectives on non-cancer health effects of benzene: A global concern”, 15 kwiecień 2014, *Academic Press Inc.* doi: 10.1016/j.taap.2014.02.012.
- [25] C. Roth GmbH, „Karta charakterystyki: Benzen”, Dostęp: 17 styczeń 2025. [Online]. Dostępne na: <http://www.imp.l>
- [26] N. Tyszkiewicz, J. Truu, P. Młynarz, i G. Pasternak, „The influence of benzene on the composition, diversity and performance of the anodic bacterial community in glucose-fed microbial fuel cells”, *Front. Microbiol.*, t. 15, s. 1384463, lip. 2024, doi: 10.3389/FMICB.2024.1384463/BIBTEX.
- [27] W. E. Luttrell i N. L. Conley, „Benzene”, *J. Chem. Health Saf.*, t. 18, nr 4, s. 32–33, lip. 2011, doi: 10.1016/J.JCHAS.2011.05.005.
- [28] S. V. Vulimiri, M. M. Pratt, S. Kulkarni, S. Beedanagari, i B. Mahadevan, „Reproductive and developmental toxicity of solvents and gases”, *Reproductive and Developmental Toxicology*, s. 339–355, sty. 2022, doi: 10.1016/B978-0-323-89773-0.00018-7.
- [29] S. Ganesan, H. Sen Siow, A. O. Esan, S. Nadarajah, i N. L. Abdul Manaff, „Introduction”, *Production of Biodiesel from Non-Edible Sources: Technological Updates*, s. 1–38, sty. 2022, doi: 10.1016/B978-0-12-824295-7.00003-6.
- [30] J. G. Speight, „Gas and Oil in Tight Formations”, *Deep Shale Oil and Gas*, s. 1–61, sty. 2017, doi: 10.1016/B978-0-12-803097-4.00001-2.
- [31] A. M. Aitani, „Oil Refining and Products”, *Encyclopedia of Energy*, s. 715–729, sty. 2004, doi: 10.1016/B0-12-176480-X/00259-X.
- [32] A. K. Ringsmuth, M. J. Landsberg, i B. Hankamer, „Can photosynthesis enable a global transition from fossil fuels to solar fuels, to mitigate climate change and fuel-supply limitations?”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, t. 62, s. 134–163, wrz. 2016, doi: 10.1016/J.RSER.2016.04.016.
- [33] S. Griffiths, B. K. Sovacool, J. Kim, M. Bazilian, i J. M. Uratani, „Decarbonizing the oil refining industry: A systematic review of sociotechnical systems, technological innovations, and policy options”, *Energy Res. Soc. Sci.*, t. 89, s. 102542, lip. 2022, doi: 10.1016/J.ERSS.2022.102542.
- [34] R. C. Prince, „Oil spill dispersants: Boon or bane?”, *Environ. Sci. Technol.*, t. 49, nr 11, s. 6376–6384, cze. 2015, doi: 10.1021/acs.est.5b00961.
- [35] S. Matallana-Surget *i in.*, „Clarifying the murk: unveiling bacterial dynamics in response to crude oil pollution, Corexit-dispersant, and natural sunlight in the Gulf of Mexico”, *Front. Mar. Sci.*, t. 10, s. 1337886, sty. 2023, doi: 10.3389/FMARS.2023.1337886.
- [36] S. C. Gad, „Diesel Fuel”, *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, s. 115–118, sty. 2014, doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00837-X.
- [37] M. A. Betiha, A. M. Rabie, H. S. Ahmed, A. A. Abdelrahman, i M. F. El-Shahat, „Oxidative desulfurization using graphene and its composites for fuel containing

- thiophene and its derivatives: An update review”, *Egyptian Journal of Petroleum*, t. 27, nr 4, s. 715–730, grudz. 2018, doi: 10.1016/J.EJPE.2017.10.006.
- [38] E. Kwao-Boateng, E. G. Ankudey, L. Darkwah, i K. O. Danquah, „Assessment of diesel fuel quality”, *Heliyon*, t. 10, nr 2, s. e24733, sty. 2024, doi: 10.1016/J.HELİYON.2024.E24733.
- [39] V. Beghetto, „Waste Cooking Oils into High-Value Products: Where Is the Industry Going?”, *Polymers (Basel)*, t. 17, nr 7, s. 887, kwi. 2025, doi: 10.3390/polym17070887.
- [40] E. W. Hammond, „VEGETABLE OILS | Types and Properties”, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, s. 5899–5904, sty. 2003, doi: 10.1016/B0-12-227055-X/01225-6.
- [41] L. Ellen de Mendonça Lima, B. Leal Lima Maciel, i T. Souza Passos, „Oil Frying Processes and Alternative Flour Coatings: Physicochemical, Nutritional, and Sensory Parameters of Meat Products”, 2024, doi: 10.3390/foods13040512.
- [42] H. Sanli, M. Canakci, i E. Alptekin, „Characterization of Waste Frying Oils Obtained from Different Facilities”, w *World Renewable Energy Congress*, 2011. Dostęp: 20 styczeń 2025. [Online]. Dostępne na: DOI: 10.3384/ecp11057479
- [43] E. Choe i D. B. Min, „Chemistry of deep-fat frying oils”, *J. Food Sci.*, t. 72, nr 5, cze. 2007, doi: 10.1111/J.1750-3841.2007.00352.X.
- [44] „Greenea. Dostępne online: https://www.theicct.org/sites/default/files/publications/Greenea%20Report%20Household%20UCO%20Collection%20in%20the%20EU_ICCT_20160629.pdf (dostęp: 20 stycznia 2025 r.)”.
- [45] W. H. Foo *i in.*, „Recent advances in the conversion of waste cooking oil into value-added products: A review”, *Fuel*, t. 324, s. 124539, wrz. 2022, doi: 10.1016/J.FUEL.2022.124539.
- [46] H. Liu, R. Ramnarayanan, i B. E. Logan, „Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell”, *Environ. Sci. Technol.*, t. 38, nr 7, s. 2281–2285, kwi. 2004, doi: 10.1021/ES034923G.
- [47] X. Cao *i in.*, „A new method for water desalination using microbial desalination cells”, *Environ. Sci. Technol.*, t. 43, nr 18, s. 7148–7152, wrz. 2009, doi: 10.1021/ES901950J.
- [48] M. Ramírez-Moreno, A. Esteve-Núñez, i J. M. Ortiz, „Study of microbial desalination cell performance with different saline streams: Analysis of current efficiency and freshwater production”, *J. Environ. Chem. Eng.*, t. 11, nr 1, s. 109240, luty 2023, doi: 10.1016/J.JECE.2022.109240.
- [49] B. Tartakovsky, M. F. Manuel, V. Neburchilov, H. Wang, i S. R. Guiot, „Biocatalyzed hydrogen production in a continuous flow microbial fuel cell with a gas phase cathode”, *J. Power Sources*, t. 182, nr 1, s. 291–297, lip. 2008, doi: 10.1016/J.JPOWSOUR.2008.03.062.

- [50] B. E. Logan *i in.*, „Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter”, *Environ. Sci. Technol.*, t. 42, nr 23, s. 8630–8640, grudz. 2008, doi: 10.1021/ES801553Z.
- [51] D. R. Bond, D. E. Holmes, L. M. Tender, i D. R. Lovley, „Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments”, *Science*, t. 295, nr 5554, s. 483–485, sty. 2002, doi: 10.1126/SCIENCE.1066771.
- [52] L. Lu, H. Yazdi, S. Jin, Y. Zuo, P. H. Fallgren, i Z. J. Ren, „Enhanced bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil using pilot-scale bioelectrochemical systems”, *J. Hazard. Mater.*, t. 274, s. 8–15, cze. 2014, doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2014.03.060.
- [53] M. M. Ghangrekar i P. Chatterjee, „A Systematic Review on Bioelectrochemical Systems Research”, 2017, doi: 10.1007/s40726-017-0071-7.
- [54] Y. Jiang i R. J. Zeng, „Expanding the product spectrum of value added chemicals in microbial electrosynthesis through integrated process design - A review”, *Bioresour. Technol.*, t. 269, s. 503–512, grudz. 2018, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2018.08.101.
- [55] S. Cheng, D. Xing, D. F. Call, i B. E. Logan, „Direct biological conversion of electrical current into methane by electromethanogenesis”, *Environ. Sci. Technol.*, t. 43, nr 10, s. 3953–3958, maj 2009, doi: 10.1021/ES803531G.
- [56] Y. Kim i B. E. Logan, „Series assembly of microbial desalination cells containing stacked electro dialysis cells for partial or complete seawater desalination”, *Environ. Sci. Technol.*, t. 45, nr 13, s. 5840–5845, lip. 2011, doi: 10.1021/ES200584Q.
- [57] H. Pradhan i M. M. Ghangrekar, „Organic matter and dissolved salts removal in a microbial desalination cell with different orientation of ion exchange membranes”, *Desalination Water Treat.*, t. 54, nr 6, s. 1568–1576, maj 2015, doi: 10.1080/19443994.2014.888682.
- [58] B. E. Logan, „Microbial Fuel Cells”, *Microbial Fuel Cells*, s. 1–200, sty. 2008, doi: 10.1002/9780470258590.
- [59] B. E. Logan *i in.*, „Microbial fuel cells: Methodology and technology”, *Environ. Sci. Technol.*, t. 40, nr 17, s. 5181–5192, wrz. 2006, doi: 10.1021/ES0605016.
- [60] Y. Hindatu, M. S. M. Annuar, i A. M. Gumel, „Mini-review: Anode modification for improved performance of microbial fuel cell”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, t. 73, s. 236–248, cze. 2017, doi: 10.1016/J.RSER.2017.01.138.
- [61] A. A. Yaqoob, M. N. M. Ibrahim, M. Rafatullah, Y. S. Chua, A. Ahmad, i K. Umar, „Recent Advances in Anodes for Microbial Fuel Cells: An Overview”, *Materials*, t. 13, nr 9, s. 2078, maj 2020, doi: 10.3390/MA13092078.
- [62] X. Fan, Y. Zhou, X. Jin, R. Bin Song, Z. Li, i Q. Zhang, „Carbon material-based anodes in the microbial fuel cells”, *Carbon Energy*, t. 3, nr 3, s. 449–472, lip. 2021, doi: 10.1002/CEY2.

- [63] S. Kalathil, S. A. Patil, i D. Pant, „Microbial fuel cells: Electrode materials”, *Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry*, s. 309–318, sty. 2018, doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.13459-6.
- [64] I. Ieropoulos, J. Greenman, i C. Melhuish, „Microbial fuel cells based on carbon veil electrodes: Stack configuration and scalability”, *Int. J. Energy Res.*, t. 32, nr 13, s. 1228–1240, paź. 2008, doi: 10.1002/ER.1419.
- [65] S. Qiu, Z. Guo, F. Naz, Z. Yang, i C. Yu, „An overview in the development of cathode materials for the improvement in power generation of microbial fuel cells”, *Bioelectrochemistry*, t. 141, s. 107834, paź. 2021, doi: 10.1016/J.BIOELECTCHEM.2021.107834.
- [66] H. Roy *i in.*, „Microbial Fuel Cell Construction Features and Application for Sustainable Wastewater Treatment”, *Membranes (Basel)*., t. 13, nr 5, s. 490, maj 2023, doi: 10.3390/MEMBRANES13050490/S1.
- [67] R. Kumar, L. Singh, i A. W. Zularisam, „Microbial fuel cells: Types and applications”, *Waste Biomass Management - A Holistic Approach*, s. 367–384, sty. 2017, doi: 10.1007/978-3-319-49595-8_16/TABLES/2.
- [68] M. Shabani, H. Younesi, M. Pontié, A. Rahimpour, M. Rahimnejad, i A. A. Zinatizadeh, „A critical review on recent proton exchange membranes applied in microbial fuel cells for renewable energy recovery”, *J. Clean. Prod.*, t. 264, s. 121446, sie. 2020, doi: 10.1016/J.JCLEPRO.2020.121446.
- [69] X. Zhang, X. Li, X. Zhao, i Y. Li, „Factors affecting the efficiency of a bioelectrochemical system: A review”, 2019, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/c9ra03605a.
- [70] S. Thakur, R. K. Calay, M. Y. Mustafa, F. E. Eregno, i R. R. Patil, „Importance of substrate type and its constituents on overall performance of microbial fuel cells”, *Curr. Res. Biotechnol.*, t. 9, s. 100272, sty. 2025, doi: 10.1016/J.CRBIOT.2025.100272.
- [71] J. M. Sonawane, R. Mahadevan, A. Pandey, i J. Greener, „Recent progress in microbial fuel cells using substrates from diverse sources”, *Heliyon*, t. 8, nr 12, s. e12353, grudz. 2022, doi: 10.1016.
- [72] D. Pant, G. Van Bogaert, L. Diels, i K. Vanbroekhoven, „A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production”, *Bioresour. Technol.*, t. 101, nr 6, s. 1533–1543, mar. 2010, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2009.10.017.
- [73] P. Fatehbasharad, S. Aliasghari, I. Shaterzadeh Tabrizi, J. A. Khan, i G. Boczkaj, „Microbial fuel cell applications for removal of petroleum hydrocarbon pollutants: A review”, *Water Resour. Ind.*, t. 28, s. 100178, grudz. 2022, doi: 10.1016/J.WRI.2022.100178.
- [74] Y. Yu, F. Ndayisenga, Z. Yu, M. Zhao, C. H. Lay, i D. Zhou, „Co-substrate strategy for improved power production and chlorophenol degradation in a microbial fuel

- cell”, *Int. J. Hydrogen Energy*, t. 44, nr 36, s. 20312–20322, lip. 2019, doi: 10.1016/j.ijhydene.2019.05.221.
- [75] N. Li, R. Kakarla, i B. Min, „Effect of influential factors on microbial growth and the correlation between current generation and biomass in an air cathode microbial fuel cell”, *Int. J. Hydrogen Energy*, t. 41, nr 45, s. 20606–20614, grudz. 2016, doi: 10.1016/j.ijhydene.2016.09.094.
- [76] J. Zhang *i in.*, „Kinetics of substrate degradation and electricity generation in anodic denitrification microbial fuel cell (AD-MFC)”, *Bioresour. Technol.*, t. 149, s. 44–50, 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2013.09.043.
- [77] L. Koók *i in.*, „Improvement of waste-fed bioelectrochemical system performance by selected electro-active microbes: Process evaluation and a kinetic study”, *Biochem. Eng. J.*, t. 137, s. 100–107, wrz. 2018, doi: 10.1016/J.BEJ.2018.05.020.
- [78] S. V. Raghavulu, J. A. Modestra, K. Amulya, C. N. Reddy, i S. Venkata Mohan, „Relative effect of bioaugmentation with electrochemically active and non-active bacteria on bioelectrogenesis in microbial fuel cell”, *Bioresour. Technol.*, t. 146, s. 696–703, paź. 2013, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2013.07.097.
- [79] K. Venkidusamy, M. Megharaj, M. Marzorati, R. Lockington, i R. Naidu, „Enhanced removal of petroleum hydrocarbons using a bioelectrochemical remediation system with pre-cultured anodes”, *Sci. Total Environ.*, t. 539, s. 61–69, sty. 2016, doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2015.08.098.
- [80] J. R. Kim, B. Min, i B. E. Logan, „Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, t. 68, nr 1, s. 23–30, sie. 2005, doi: 10.1007/S00253-004-1845-6.
- [81] M. Sharma *i in.*, „Bioelectrochemical remediation of phenanthrene in a microbial fuel cell using an anaerobic consortium enriched from a hydrocarbon-contaminated site”, *J. Hazard. Mater.*, t. 389, s. 121845, maj 2020, doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2019.121845.
- [82] A. Larrosa-Guerrero, K. Scott, I. M. Head, F. Mateo, A. Ginesta, i C. Godinez, „Effect of temperature on the performance of microbial fuel cells”, *Fuel*, t. 89, nr 12, s. 3985–3994, grudz. 2010, doi: 10.1016/J.FUEL.2010.06.025.
- [83] H. Moon, I. S. Chang, i B. H. Kim, „Continuous electricity production from artificial wastewater using a mediator-less microbial fuel cell”, *Bioresour. Technol.*, t. 97, nr 4, s. 621–627, mar. 2006, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2005.03.027.
- [84] V. B. Oliveira, M. Simões, L. F. Melo, i A. M. F. R. Pinto, „Overview on the developments of microbial fuel cells”, *Biochem. Eng. J.*, t. 73, s. 53–64, kwi. 2013, doi: 10.1016/J.BEJ.2013.01.012.
- [85] A. Koolivand *i in.*, „The effect of petroleum hydrocarbons concentration on competition between oil-degrading bacteria and indigenous compost microorganisms in petroleum sludge bioremediation”, *Environ. Technol. Innov.*, t. 26, s. 102319, maj 2022, doi: 10.1016/J.ETI.2022.102319.

- [86] J. Rousk *i in.*, „Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil”, *ISME Journal*, t. 4, nr 10, s. 1340–1351, paź. 2010, doi: 10.1038/ISMEJ.2010.58,.
- [87] S. Das i M. P. Shah, *Resource Recovery from Industrial Wastewater through Microbial Electrochemical Technologies*. IWA Publishing, 2024. doi: 10.2166/9781789063813.
- [88] A. Banerjee, R. K. Calay, i M. Mustafa, „Review on Material and Design of Anode for Microbial Fuel Cell”, *Energies 2022, Vol. 15, Page 2283*, t. 15, nr 6, s. 2283, mar. 2022, doi: 10.3390/EN15062283.
- [89] Y. Sun, J. Wei, P. Liang, i X. Huang, „Electricity generation and microbial community changes in microbial fuel cells packed with different anodic materials”, *Bioresour. Technol.*, t. 102, nr 23, s. 10886–10891, grudz. 2011, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2011.09.038.
- [90] M. Kokko, S. Epple, J. Gescher, i S. Kerzenmacher, „Effects of wastewater constituents and operational conditions on the composition and dynamics of anodic microbial communities in bioelectrochemical systems”, *Bioresour. Technol.*, t. 258, s. 376–389, cze. 2018, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2018.01.090.
- [91] J. Ren, N. Li, M. Du, Y. Zhang, C. Hao, i R. Hu, „Study on the effect of synergy effect between the mixed cultures on the power generation of microbial fuel cells”, *Bioengineered*, t. 12, nr 1, s. 844–854, sty. 2021, doi: 10.1080/21655979.2021.1883280.
- [92] A. Castellano-Hinojosa, A. González-Martínez, C. Pozo, i J. González-López, „Diversity of electroactive and non-electroactive microorganisms and their potential relationships in microbial electrochemical systems: A review”, *Journal of Water Process Engineering*, t. 50, s. 103199, grudz. 2022, doi: 10.1016/J.JWPE.2022.103199.
- [93] W. Zhi, Z. Ge, Z. He, i H. Zhang, „Methods for understanding microbial community structures and functions in microbial fuel cells: A review”, *Bioresour. Technol.*, t. 171, s. 461–468, lis. 2014, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2014.08.096.
- [94] B. E. Logan, R. Rossi, A. Ragab, i P. E. Saikaly, „Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems”, *Nature Reviews Microbiology 2019 17:5*, t. 17, nr 5, s. 307–319, mar. 2019, doi: 10.1038/s41579-019-0173-x.
- [95] C. M. Paquete, „Electroactivity across the cell wall of Gram-positive bacteria”, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, t. 18, s. 3796–3802, sty. 2020, doi: 10.1016/J.CSBJ.2020.11.021.
- [96] M. He, M. Chen, M. Liu, F. Dong, H. Wei, i D. Wang, „Effects and mechanism of riboflavin on the growth of *Alcaligenes faecalis* under bias conditions”, *RSC Adv.*, t. 9, nr 40, s. 22957–22965, lip. 2019, doi: 10.1039/C9RA04066H.
- [97] A. C. B. Zani *i in.*, „Electrobiochemical skills of *Pseudomonas aeruginosa* species that produce pyocyanin or pyoverdine for glycerol oxidation in a microbial fuel

- cell”, *Chemosphere*, t. 335, s. 139073, wrz. 2023, doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2023.139073.
- [98] Y. Hu, Y. Wang, X. Han, Y. Shan, F. Li, i L. Shi, „Biofilm Biology and Engineering of *Geobacter* and *Shewanella* spp. for Energy Applications”, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, t. 9, nr 786416, 2021, doi: 10.3389/fbioe.2021.786416.
- [99] M. O. Yee, J. Deutzmann, A. Spormann, i A. E. Rotaru, „Cultivating electroactive microbes—from field to bench”, *Nanotechnology*, t. 31, nr 17, s. 174003, luty 2020, doi: 10.1088/1361-6528/AB6AB5.
- [100] D. R. Lovley i D. E. Holmes, „Electromicrobiology: the ecophysiology of phylogenetically diverse electroactive microorganisms”, *Nature Reviews Microbiology* 2021 20:1, t. 20, nr 1, s. 5–19, lip. 2021, doi: 10.1038/s41579-021-00597-6.
- [101] R. Kumar, L. Singh, i A. W. Zularisam, „Exoelectrogens: Recent advances in molecular drivers involved in extracellular electron transfer and strategies used to improve it for microbial fuel cell applications”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, t. 56, s. 1322–1336, kwi. 2016, doi: 10.1016/J.RSER.2015.12.029.
- [102] G. Reguera, „Biological electron transport goes the extra mile”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, t. 115, nr 22, s. 5632–5634, maj 2018, doi: 10.1073/pnas.1806580115.
- [103] A. J. B. Zehnder i B. H. Svensson, „Life without oxygen: what can and what cannot?”, *Experientia*, t. 42, nr 11–12, s. 1197–1205, grudz. 1986, doi: 10.1007/BF01946391/METRICS.
- [104] U. Schröder i F. Harnisch, „Life Electric - Nature as a Blueprint for the Development of Microbial Electrochemical Technologies”, *Joule*, t. 1, nr 2, s. 244–252, paź. 2017, doi: 10.1016/J.JOULE.2017.07.010.
- [105] U. Schröder, F. Harnisch, i L. T. Angenent, „Microbial electrochemistry and technology: terminology and classification”, *Energy Environ. Sci.*, t. 8, nr 2, s. 513–519, luty 2015, doi: 10.1039/C4EE03359K.
- [106] B. E. Logan, „Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells”, *Nature Reviews Microbiology* 2009 7:5, t. 7, nr 5, s. 375–381, mar. 2009, doi: 10.1038/nrmicro2113.
- [107] D. R. Lovley, „Bug juice: harvesting electricity with microorganisms”, *Nature Reviews Microbiology* 2006 4:7, t. 4, nr 7, s. 497–508, 2006, doi: 10.1038/nrmicro1442.
- [108] A. Sydow, T. Krieg, F. Mayer, J. Schrader, i D. Holtmann, „Electroactive bacteria—molecular mechanisms and genetic tools”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, t. 98, nr 20, s. 8481–8495, paź. 2014, doi: 10.1007/s00253-014-6005-z.
- [109] A. Kumar *i in.*, „The ins and outs of microorganism–electrode electron transfer reactions”, *Nature Reviews Chemistry* 2017 1:3, t. 1, nr 3, s. 1–13, mar. 2017, doi: 10.1038/s41570-017-0024.

- [110] G. Reguera, K. D. McCarthy, T. Mehta, J. S. Nicoll, M. T. Tuominen, i D. R. Lovley, „Extracellular electron transfer via microbial nanowires”, *Nature* 2005 435:7045, t. 435, nr 7045, s. 1098–1101, cze. 2005, doi: 10.1038/nature03661.
- [111] V. Thengumthottathil, K. Ponnusamy, i S. Naina Mohamed, „Bioelectrochemical systems: Exploring microbial communities, interactions, and electron transfer”, *Biochem. Eng. J.*, t. 211, s. 109442, lis. 2024, doi: 10.1016/J.BEJ.2024.109442.
- [112] J. A. Pérez-García, F. J. Bacame-Valenzuela, J. Manríquez, F. Castañeda-Zaldívar, i Y. Reyes-Vidal, „Electrochemical analysis of extracellular electron transfer process of *Pseudomonas aeruginosa* NEJ07R using pyocyanin on a carbon electrode”, *J. Environ. Chem. Eng.*, t. 11, nr 5, s. 110708, paź. 2023, doi: 10.1016/J.JECE.2023.110708.
- [113] J. Greenman *i in.*, „Microbial fuel cells and their electrified biofilms”, *Biofilm*, t. 3, grudz. 2021, doi: 10.1016/j.bioflm.2021.100057.
- [114] J. B. Rollefson, C. S. Stephen, M. Tien, i D. R. Bond, „Identification of an extracellular polysaccharide network essential for cytochrome anchoring and biofilm formation in *Geobacter sulfurreducens*”, *J. Bacteriol.*, t. 193, nr 5, s. 1023–1033, mar. 2011, doi: 10.1128/JB.01092-10/SUPPL_FILE/S1FLATFINAL.ZIP.
- [115] B. S. Saharan, N. Beniwal, i J. S. Duhan, „From formulation to function: A detailed review of microbial biofilms and their polymer-based extracellular substances”, *The Microbe*, t. 5, s. 100194, grudz. 2024, doi: 10.1016/J.MICROB.2024.100194.
- [116] G. Pasternak, J. Greenman, i I. Ieropoulos, „Dynamic evolution of anodic biofilm when maturing under different external resistive loads in microbial fuel cells. Electrochemical perspective”, *J. Power Sources*, t. 400, s. 392–401, paź. 2018, doi: 10.1016/j.jpowsour.2018.08.031.
- [117] Y. Yang, M. Xu, J. Guo, i G. Sun, „Bacterial extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems”, *Process Biochemistry*, t. 47, nr 12, s. 1707–1714, grudz. 2012, doi: 10.1016/J.PROCBIO.2012.07.032.
- [118] K. J. Chae, M. J. Choi, J. W. Lee, K. Y. Kim, i I. S. Kim, „Effect of different substrates on the performance, bacterial diversity, and bacterial viability in microbial fuel cells”, *Bioresour. Technol.*, t. 100, nr 14, s. 3518–3525, lip. 2009, doi: 10.1016/j.biortech.2009.02.065.
- [119] C. M. Plugge, W. Zhang, J. C. M. Scholten, i A. J. M. Stams, „Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria”, *Front. Microbiol.*, t. 2, nr MAY, s. 9650, maj 2011, doi: 10.3389/FMICB.2011.00081/BIBTEX.
- [120] W. Miran *i in.*, „Microbial community structure in a dual chamber microbial fuel cell fed with brewery waste for azo dye degradation and electricity generation”, *Environmental Science and Pollution Research*, t. 22, nr 17, s. 13477–13485, wrz. 2015, doi: 10.1007/S11356-015-4582-8/TABLES/1.
- [121] C. S. Kang, N. Eaktasang, D. Y. Kwon, i H. S. Kim, „Enhanced current production by *Desulfovibrio desulfuricans* biofilm in a mediator-less microbial fuel cell”,

- Bioresour. Technol.*, t. 165, nr C, s. 27–30, sie. 2014, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2014.03.148.
- [122] D. J. Lee, X. Liu, i H. L. Weng, „Sulfate and organic carbon removal by microbial fuel cell with sulfate-reducing bacteria and sulfide-oxidising bacteria anodic biofilm”, *Bioresour. Technol.*, t. 156, s. 14–19, mar. 2014, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2013.12.129.
- [123] A. Hussain, A. Hasan, A. Javid, i J. I. Qazi, „Exploited application of sulfate-reducing bacteria for concomitant treatment of metallic and non-metallic wastes: a mini review”, *3 Biotech*, t. 6, nr 2, s. 1–10, grudz. 2016, doi: 10.1007/S13205-016-0437-3/FIGURES/1.
- [124] I. C. B. Rodrigues i V. A. Leão, „Producing electrical energy in microbial fuel cells based on sulphate reduction: a review”, *Environmental Science and Pollution Research*, t. 27, nr 29, s. 36075–36084, paź. 2020, doi: 10.1007/S11356-020-09728-7/TABLES/2.
- [125] A. Vilar-Sanz *i in.*, „Denitrifying Bacterial Communities Affect Current Production and Nitrous Oxide Accumulation in a Microbial Fuel Cell”, *PLoS One*, t. 8, nr 5, s. e63460, maj 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0063460.
- [126] H. Zhao, J. Zhao, F. Li, i X. Li, „Performance of denitrifying microbial fuel cell with biocathode over nitrite”, *Front. Microbiol.*, t. 7, nr MAR, s. 169381, mar. 2016, doi: 10.3389/FMICB.2016.00344/BIBTEX.
- [127] X. Jin, F. Guo, Z. Liu, Y. Liu, i H. Liu, „Enhancing the electricity generation and nitrate removal of microbial fuel cells with a novel denitrifying exoelectrogenic strain EB-1”, *Front. Microbiol.*, t. 9, nr NOV, s. 416585, lis. 2018, doi: 10.3389/FMICB.2018.02633/BIBTEX.
- [128] H. Kashima i J. M. Regan, „Facultative Nitrate Reduction by Electrode-Respiring *Geobacter metallireducens* Biofilms as a Competitive Reaction to Electrode Reduction in a Bioelectrochemical System”, *Environ. Sci. Technol.*, t. 49, nr 5, s. 3195–3202, mar. 2015, doi: 10.1021/ES504882F.
- [129] D. Dzofou Ngoumelah *i in.*, „Effect of model methanogens on the electrochemical activity, stability, and microbial community structure of *Geobacter* spp. dominated biofilm anodes”, *NPJ Biofilms Microbiomes*, t. 10, nr 1, s. 1–13, grudz. 2024, doi: 10.1038.
- [130] M. E. Kokko, A. E. Mäkinen, i J. A. Puhakka, „Anaerobes in Bioelectrochemical Systems”, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, t. 156, s. 263–292, mar. 2016, doi: 10.1007/10_2015_5001.
- [131] T. Catal, K. Li, H. Bermek, i H. Liu, „Electricity production from twelve monosaccharides using microbial fuel cells”, *J. Power Sources*, t. 175, nr 1, s. 196–200, sty. 2008, doi: 10.1016/J.JPOWSOUR.2007.09.083.
- [132] Y. Cao *i in.*, „Electricigens in the anode of microbial fuel cells: pure cultures versus mixed communities”, *Microbial Cell Factories 2019 18:1*, t. 18, nr 1, s. 1–14, luty 2019, doi: 10.1186/S12934-019-1087-Z.

- [133] A. de Rosset, P. Rutkowski, i G. Pasternak, „The effect of surface and porous structure on long-term performance of carbon powder cathodes without binder, during a 300-day trial in microbial fuel cells”, *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, t. 58, s. 103340, sie. 2023, doi: 10.1016/J.SETA.2023.103340.
- [134] B. Widera, N. Tyszkiewicz, J. Truu, P. Rutkowski, P. Młynarz, i G. Pasternak, „Relationship between biodiversity and power generated by anodic bacteria enriched from petroleum-contaminated soil at various potentials”, *Int. Biodeterior. Biodegradation*, t. 194, s. 105849, wrz. 2024, doi: 10.1016/J.IBIOD.2024.105849.
- [135] N. Kosaric i F. Vardar-Sukan, „Biosurfactants: Production and Utilization-Processes, Technologies, and Economics”, lis. 2014, doi: 10.1201/B17599.
- [136] J. Sharma, D. Sundar, i P. Srivastava, „Biosurfactants: Potential Agents for Controlling Cellular Communication, Motility, and Antagonism”, *Front. Mol. Biosci.*, t. 8, s. 727070, paź. 2021, doi: 10.3389/FMOLB.2021.727070.
- [137] W. Tian *i in.*, „Effect of natural and synthetic surfactants on crude oil biodegradation by indigenous strains”, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, t. 129, s. 171–179, lip. 2016, doi: 10.1016/J.ECOENV.2016.03.027.
- [138] V. Abbot, D. Paliwal, A. Sharma, i P. Sharma, „A review on the physicochemical and biological applications of biosurfactants in biotechnology and pharmaceuticals”, *Heliyon*, t. 8, nr 8, s. e10149, sie. 2022, doi: 10.1016/J.HELIYON.2022.E10149.
- [139] P. Thakur, N. K. Saini, V. K. Thakur, V. K. Gupta, R. V. Saini, i A. K. Saini, „Rhamnolipid the Glycolipid Biosurfactant: Emerging trends and promising strategies in the field of biotechnology and biomedicine”, *Microb. Cell Fact.*, t. 20, nr 1, s. 1–15, grudz. 2021, doi: 10.1186/S12934-020-01497-9/TABLES/1.
- [140] A. E. Elshafie *i in.*, „Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in microbial enhanced oil recovery”, *Front. Microbiol.*, t. 6, nr NOV, s. 155392, lis. 2015, doi: 10.3389/FMICB.2015.01324/BIBTEX.
- [141] A. Franzetti, I. Gandolfi, G. Bestetti, T. J. P. Smyth, i I. M. Banat, „Production and applications of trehalose lipid biosurfactants”, *European Journal of Lipid Science and Technology*, t. 112, nr 6, s. 617–627, cze. 2010, doi: 10.1002/EJLT.200900162.
- [142] O. Kappeli i W. R. Finnerty, „Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*”, *J. Bacteriol.*, t. 140, nr 2, s. 707, 1979, doi: 10.1128/JB.140.2.707-712.1979.
- [143] A. Kretschmer, H. Bock, i F. Wagner, „Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes”, *Appl. Environ. Microbiol.*, t. 44, nr 4, s. 864–870, 1982, doi: 10.1128/AEM.44.4.864-870.1982,.
- [144] X. Chen, Y. Lu, M. Shan, H. Zhao, Z. Lu, i Y. Lu, „A mini-review: mechanism of antimicrobial action and application of surfactin”, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, t. 38, nr 8, s. 1–10, sie. 2022, doi: 10.1007/S11274-022-03323-3.

- [145] N. Hamzah, N. Kasmuri, W. Tao, N. Singhal, L. Padhye, i S. Swift, „Effect of rhamnolipid on the physicochemical properties and interaction of bacteria and fungi”, *Brazilian Journal of Microbiology*, t. 51, nr 3, s. 1317–1326, wrz. 2020, doi: 10.1007/S42770-020-00295-0.
- [146] W. H. Noordman i D. B. Janssen, „Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, t. 68, nr 9, s. 4502–4508, wrz. 2002, doi: 10.1128/aem.68.9.4502-4508.2002.
- [147] B. Zhang, L. Wang, Z. Diwu, M. Nie, i H. Nie, „Mechanism of rhamnolipid promoting the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by gram-positive bacteria - Enhance transmembrane transport and electron transfer”, *J. Biotechnol.*, t. 397, s. 51–60, sty. 2025, doi: 10.1016/J.JBIOTECH.2024.11.010.
- [148] S. Martinez, A. Humery, M. C. Groleau, i E. Déziel, „Quorum Sensing Controls Both Rhamnolipid and Polyhydroxyalkanoate Production in *Burkholderia thailandensis* Through ScmR Regulation”, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, t. 8, s. 1033, wrz. 2020, doi: 10.3389/FBIOE.2020.01033/FULL.
- [149] M. Owsianiak *i in.*, „Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants”, *Bioresour. Technol.*, t. 100, nr 3, s. 1497–1500, luty 2009, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2008.08.028.
- [150] R. Thavasi, S. Jayalakshmi, i I. M. Banat, „Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil”, *Bioresour. Technol.*, t. 102, nr 3, s. 3366–3372, luty 2011, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2010.11.071.
- [151] G. Zeng *i in.*, „Effect of monorhamnolipid on the degradation of n-hexadecane by *Candida tropicalis* and the association with cell surface properties”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, t. 90, nr 3, s. 1155–1161, maj 2011, doi: 10.1007/S00253-011-3125-6,.
- [152] S. S. Cameotra i P. Singh, „Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants”, *Int. Biodeterior. Biodegradation*, t. 62, nr 3, s. 274–280, paź. 2008, doi: 10.1016/J.IBIOD.2007.11.009.
- [153] G. Pasternak, T. D. Askitosari, i M. A. Rosenbaum, „Biosurfactants and Synthetic Surfactants in Bioelectrochemical Systems: A Mini-Review”, 13 marzec 2020, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fmicb.2020.00358.
- [154] Y. Zhang *i in.*, „Accelerating anodic biofilms formation and electron transfer in microbial fuel cells: Role of anionic biosurfactants and mechanism”, *Bioelectrochemistry*, t. 117, s. 48–56, paź. 2017, doi: 10.1016/J.BIOELECTHEM.2017.06.002.
- [155] G. Pasternak, J. Greenman, i I. Ieropoulos, „Regeneration of the power performance of cathodes affected by biofouling”, *Appl. Energy*, t. 173, s. 431–437, lip. 2016, doi: 10.1016/J.APENERGY.2016.04.009.

- [156] R. G. Abisado, S. Benomar, J. R. Klaus, A. A. Dandekar, i J. R. Chandler, „Bacterial quorum sensing and microbial community interactions”, *mBio*, t. 9, nr 3, maj 2018, doi: 10.1128/mBio.02331-17.
- [157] T. H. Pham *i in.*, „Metabolites produced by *Pseudomonas* sp. enable a Gram-positive bacterium to achieve extracellular electron transfer”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, t. 77, nr 5, s. 1119–1129, sty. 2008, doi: 10.1007/S00253-007-1248-6/FIGURES/6.
- [158] J. H. Hwang, K. Y. Kim, E. P. Resurreccion, i W. H. Lee, „Surfactant addition to enhance bioavailability of bilge water in single chamber microbial fuel cells (MFCs)”, *J. Hazard. Mater.*, t. 368, s. 732–738, kwi. 2019, doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.02.007.
- [159] X. Li, Q. Zhao, X. Wang, Y. Li, i Q. Zhou, „Surfactants selectively reallocated the bacterial distribution in soil bioelectrochemical remediation of petroleum hydrocarbons”, *J. Hazard. Mater.*, t. 344, s. 23–32, 2018, doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.09.050.
- [160] T. Zheng *i in.*, „Endogenously enhanced biosurfactant production promotes electricity generation from microbial fuel cells”, *Bioresour. Technol.*, t. 197, s. 416–421, grudz. 2015, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2015.08.136.
- [161] „Modified Wolin’s mineral solution”. Dostęp: 26 maj 2025. [Online]. Dostępne na: <https://mediadive.dsmz.de/solutions/241>
- [162] A. Klindworth *i in.*, „Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies”, *Nucleic Acids Res.*, t. 41, nr 1, sty. 2013, doi: 10.1093/nar/gks808.
- [163] N. A. Bokulich *i in.*, „Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2’s q2-feature-classifier plugin”, *Microbiome*, t. 6, nr 1, s. 1–17, maj 2018, doi: 10.1186/S40168-018-0470-Z/TABLES/3.
- [164] S. Andrews i Babraham Bioinformatics - FastQC, „A quality control tool for high throughput sequence data”. Dostęp: 10 marzec 2022. [Online]. Dostępne na: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- [165] M. Martin, „Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads”, *EMBnet. J.*, t. 17, nr 1, s. 10–12, maj 2011, doi: 10.14806/EJ.17.1.200.
- [166] P. Menzel, K. L. Ng, i A. Krogh, „Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju”, *Nature Communications 2016 7:1*, t. 7, nr 1, s. 1–9, kwi. 2016, doi: 10.1038/ncomms11257.
- [167] D. Li, C. M. Liu, R. Luo, K. Sadakane, i T. W. Lam, „MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph”, *Bioinformatics*, t. 31, nr 10, s. 1674–1676, maj 2015, doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTV033.

- [168] R. D. Finn, J. Clements, i S. R. Eddy, „HMMER web server: Interactive sequence similarity searching”, *Nucleic Acids Res.*, t. 39, nr SUPPL. 2, lip. 2011, doi: 10.1093/nar/gkr367.
- [169] M. Kanehisa i S. Goto, „KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”, 2000. [Online]. Dostępne na: <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
- [170] J. D. Thompson, D. G. Higgins, i T. J. Gibson, „CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice”, 1994. [Online]. Dostępne na: <https://academic.oup.com/nar/article/22/22/4673/2400290>
- [171] S. Nayfach i K. S. Pollard, „Average genome size estimation improves comparative metagenomics and sheds light on the functional ecology of the human microbiome”, *Genome Biol.*, t. 16, nr 1, mar. 2015, doi: 10.1186/s13059-015-0611-7.
- [172] J. Chong, P. Liu, G. Zhou, i J. Xia, „Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data”, *Nature Protocols* 2020 15:3, t. 15, nr 3, s. 799–821, sty. 2020, doi: 10.1038/s41596-019-0264-1.
- [173] K. Tiirik, H. Nõlvak, M. Truu, A. Peeb, M. Kõiv-Vainik, i J. Truu, „The Effect of the Effluent from a Small-Scale Conventional Wastewater Treatment Plant Treating Municipal Wastewater on the Composition and Abundance of the Microbial Community, Antibiotic Resistome, and Pathogens in the Sediment and Water of a Receiving Stream”, *Water* 2021, Vol. 13, Page 865, t. 13, nr 6, s. 865, mar. 2021, doi: 10.3390/W13060865.
- [174] Z. Liu, C. Lozupone, M. Hamady, F. D. Bushman, i R. Knight, „Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis”, *Nucleic Acids Res.*, t. 35, nr 18, wrz. 2007, doi: 10.1093/NAR/GKM541.
- [175] L. Dethlefsen, S. Huse, M. L. Sogin, i D. A. Relman, „The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing”, *PLoS Biol.*, t. 6, nr 11, s. e280, lis. 2008, doi: 10.1371/JOURNAL.PBIO.0060280.
- [176] K. A. Mielko, S. J. Jabłoński, M. Łukaszewicz, i P. Młynarz, „Comparison of bacteria disintegration methods and their influence on data analysis in metabolomics”, *Scientific Reports* 2021 11:1, t. 11, nr 1, s. 1–11, paź. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-99873-x.
- [177] C. M. Reddy i J. G. Quinn, „GC-MS analysis of total petroleum hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater samples after the North Cape oil spill”, *Mar. Pollut. Bull.*, t. 38, nr 2, s. 126–135, luty 1999, doi: 10.1016/S0025-326X(98)00106-4.
- [178] G. Pasternak, A. de Rosset, i P. Rutkowski, „Horizontal microbial fuel cell system producing biosurfactants in response to current generation from waste cooking oil as a fuel”, *Energy Convers. Manag.*, t. 281, s. 116807, kwi. 2023, doi: 10.1016/J.ENCONMAN.2023.116807.

- [179] M. Laabei, W. D. Jamieson, S. E. Lewis, S. P. Diggle, i A. T. A. Jenkins, „A new assay for rhamnolipid detection - Important virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, t. 98, nr 16, s. 7199–7209, cze. 2014, doi: 10.1007/S00253-014-5904-3.
- [180] P. Das, S. Mukherjee, i R. Sen, „Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*”, *J. Appl. Microbiol.*, t. 104, nr 6, s. 1675–1684, cze. 2008, doi: 10.1111/J.1365-2672.2007.03701.X.
- [181] A. N. Zargar, S. Mishra, M. Kumar, i P. Srivastava, „Isolation and chemical characterization of the biosurfactant produced by *Gordonia* sp. IITR100”, *PLoS One*, t. 17, nr 4, s. e0264202, kwi. 2022, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0264202.
- [182] L. Szydlowski, J. Ehlich, I. Goryanin, i G. Pasternak, „High-throughput 96-well bioelectrochemical platform for screening of electroactive microbial consortia”, *Chemical Engineering Journal*, t. 427, s. 131692, sty. 2022, doi: 10.1016/J.CEJ.2021.131692.
- [183] I. Ieropoulos, O. Obata, G. Pasternak, i J. Greenman, „Fate of three bioluminescent pathogenic bacteria fed through a cascade of urine microbial fuel cells”, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, t. 46, nr 5, s. 587–599, maj 2019, doi: 10.1007/S10295-019-02153-X.
- [184] J. Winfield, I. Ieropoulos, J. Greenman, i J. Dennis, „The overshoot phenomenon as a function of internal resistance in microbial fuel cells”, *Bioelectrochemistry*, t. 81, nr 1, s. 22–27, kwi. 2011, doi: 10.1016/J.BIOELECTHEM.2011.01.001.
- [185] V. J. Watson i B. E. Logan, „Analysis of polarization methods for elimination of power overshoot in microbial fuel cells”, *Electrochem. commun.*, t. 13, nr 1, s. 54–56, sty. 2011, doi: 10.1016/J.ELECOM.2010.11.011.
- [186] C. I. Torres, A. Kato Marcus, i B. E. Rittmann, „Kinetics of consumption of fermentation products by anode-respiring bacteria”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, t. 77, nr 3, s. 689–697, lis. 2007, doi: 10.1007/s00253-007-1198-z.
- [187] O. Adelaja, T. Keshavarz, i G. Kyazze, „Treatment of phenanthrene and benzene using microbial fuel cells operated continuously for possible in situ and ex situ applications”, *Int. Biodeterior. Biodegradation*, t. 116, s. 91–103, sty. 2017, doi: 10.1016/j.ibiod.2016.10.021.
- [188] H. Luo, G. Liu, R. Zhang, i S. Jin, „Phenol degradation in microbial fuel cells”, *Chemical Engineering Journal*, t. 147, nr 2–3, s. 259–264, kwi. 2009, doi: 10.1016/j.cej.2008.07.011.
- [189] O. Adelaja, T. Keshavarz, i G. Kyazze, „The effect of salinity, redox mediators and temperature on anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in microbial fuel cells”, *J. Hazard. Mater.*, t. 283, s. 211–217, luty 2015, doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.08.066.
- [190] C. A. Pham *i in.*, „A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel

- cell”, *FEMS Microbiol. Lett.*, t. 223, nr 1, s. 129–134, cze. 2003, doi: 10.1016/S0378-1097(03)00354-9.
- [191] Y. Liu, J. Zhang, S. Yang, i H. Yang, „Biodegradation and removal of heavy oil using *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* spp. isolated from oily sludge and wastewater in Xinjiang Oilfield, China”, *J. Environ. Chem. Eng.*, t. 11, nr 3, cze. 2023, doi: 10.1016/j.jece.2023.110123.
- [192] E. A. Edwards *i in.*, „Anaerobic benzene biodegradation linked to the growth of highly specific bacterial clades”, *Environ. Sci. Technol.*, t. 55, nr 12, s. 7970–7980, cze. 2021, doi: 10.1021/acs.est.1c00508.
- [193] P. I. M. Firmino *i in.*, „Applicability of Microaerobic Technology to Enhance BTEX Removal from Contaminated Waters”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, t. 184, nr 4, s. 1187–1199, kwi. 2018, doi: 10.1007/s12010-017-2618-x.
- [194] C. Vogt, S. Kleinstaub, i H. H. Richnow, „Anaerobic benzene degradation by bacteria”, listopad 2011. doi: 10.1111/j.1751-7915.2011.00260.x.
- [195] S. Liu, „Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations”, *Int. J. Food Microbiol.*, t. 83, nr 2, s. 115–131, cze. 2003, doi: 10.1016/S0168-1605(02)00366-5.
- [196] D. Grbic-Galic i T. M. Vogel, „Transformation of Toluene and Benzene by Mixed Methanogenic Cultures”, *Appl. Environ. Microbiol.*, t. 53, nr 2, s. 254–260, 1987, doi: 10.1128/aem.53.2.254-260.1987.
- [197] Y. Jangir, S. French, L. M. Momper, D. P. Moser, J. P. Amend, i M. Y. El-Naggar, „Isolation and characterization of electrochemically active subsurface Delftia and Azonexus species”, *Front. Microbiol.*, t. 7, nr MAY, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.00756.
- [198] W. Pungrasmi, H.-S. Lee, A. Yokota, i A. Ohta, „*Pseudomonas japonica* sp. nov., a novel species that assimilates straight chain alkylphenols”, *Journal of General and Applied Microbiology*, t. 54, s. 61–69, 2008.
- [199] J. A. Pérez-García, F. J. Bacame-Valenzuela, J. Manríquez, F. Castañeda-Zaldívar, i Y. Reyes-Vidal, „Electrochemical analysis of extracellular electron transfer process of *Pseudomonas aeruginosa* NEJ07R using pyocyanin on a carbon electrode”, *J. Environ. Chem. Eng.*, t. 11, nr 5, paź. 2023, doi: 10.1016/j.jece.2023.110708.
- [200] S. Li, J. Jiang, S. H. Ho, S. Zhang, W. Zeng, i F. Li, „Sustainable conversion of antibiotic wastewater using microbial fuel cells: Energy harvesting and resistance mechanism analysis”, *Chemosphere*, t. 313, luty 2023, doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.137584.
- [201] J. Huang, N. Zhu, Y. Cao, Y. Peng, P. Wu, i W. Dong, „Exoelectrogenic Bacterium Phylogenetically Related to *Citrobacter freundii*, Isolated from Anodic Biofilm of a Microbial Fuel Cell”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, t. 175, nr 4, s. 1879–1891, luty 2015, doi: 10.1007/s12010-014-1418-9.

- [202] S. Gupta, B. Pathak, i M. H. Fulekar, „Biodegradation of Benzene under Anaerobic Condition using Enriched Microbial Culture”, w *Biodegradation and Bioconversion of Hydrocarbons*, nr 1, 2017, s. 163–204. doi: 10.1007/978-981-10-0201-4_5.
- [203] H. Hassan, B. Jin, E. Donner, S. Vasileiadis, C. Saint, i S. Dai, „Microbial community and bioelectrochemical activities in MFC for degrading phenol and producing electricity: Microbial consortia could make differences”, *Chemical Engineering Journal*, t. 332, s. 647–657, sty. 2018, doi: 10.1016/j.cej.2017.09.114.
- [204] Y. Yu, Y. Wu, B. Cao, Y. G. Gao, i X. Yan, „Adjustable bidirectional extracellular electron transfer between *Comamonas testosteroni* biofilms and electrode via distinct electron mediators”, *Electrochem. commun.*, t. 59, s. 43–47, lip. 2015, doi: 10.1016/j.elecom.2015.07.007.
- [205] C. Melkonian *i in.*, „High biodiversity in a benzene-degrading nitrate-reducing culture is sustained by a few primary consumers”, *Communications biology, Nature*, 2021, doi: 10.1038/s42003-021-01948-y.
- [206] J. N. Rooney-Varga, R. T. Anderson, J. L. Fraga, D. Ringelberg, i D. R. Lovley, „Microbial Communities Associated with Anaerobic Benzene Degradation in a Petroleum-Contaminated Aquifer”, *Appl. Environ. Microbiol.*, t. 65, nr 7, s. 3056–3063, 1999.
- [207] M. Ejaz *i in.*, „Isolation and characterization of oil-degrading enterobacter sp. From naturally hydrocarbon-contaminated soils and their potential use against the bioremediation of crude oil”, *Applied Sciences (Switzerland)*, t. 11, nr 8, kwi. 2021, doi: 10.3390/app11083504.
- [208] K. E. Duncan, L. E. Dominici, M. A. Nanny, I. A. Davidova, B. H. Harriman, i J. M. Suflita, „Microbial Communities in Model Seawater-Compensated Fuel Ballast Tanks: Biodegradation and Biocorrosion Stimulated by Marine Sediments”, *Corrosion and Materials Degradation*, t. 5, nr 1, s. 1–26, sty. 2024, doi: 10.3390/cmd5010001.
- [209] E. Kaczorek, A. Pacholak, A. Zdarta, i W. Smulek, „The impact of biosurfactants on microbial cell properties leading to hydrocarbon bioavailability increase”, *Colloids and Interfaces*, t. 2, nr 3, wrz. 2018, doi: 10.3390/colloids2030035.
- [210] S. Li, Y. Deng, S. Lian, C. Dai, Q. Ma, i Y. Qu, „Succession of diversity, functions, and interactions of the fungal community in activated sludge under aromatic hydrocarbon stress”, *Environ. Res.*, t. 204, mar. 2022, doi: 10.1016/j.envres.2021.112143.
- [211] C. Peng *i in.*, „Bacterial diversity and competitors for degradation of hazardous oil refining waste under selective pressures of temperature and oxygen”, *J. Hazard. Mater.*, t. 427, kwi. 2022, doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.128201.
- [212] X. Wang, X. Wang, F. Wu, J. Zhang, S. Ai, i Z. Liu, „Microbial community composition and degradation potential of petroleum-contaminated sites under

- heavy metal stress”, *J. Hazard. Mater.*, t. 457, wrz. 2023, doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.131814.
- [213] J. Zhuang *i in.*, „Petroleum pollution changes microbial diversity and network complexity of soil profile in an oil refinery”, *Front. Microbiol.*, t. 14, 2023, doi: 10.3389/fmicb.2023.1193189.
- [214] O. Adelaja, T. Keshavarz, L. Bello, i G. Kyazze, „Anaerobic Biodegradation of Benzene in Microbial Fuel Cells: Influence of Inoculum Type on MFC Performance”, *International Journal of Energy and Sustainable Development*, t. 3, nr 4, s. 105–115, 2018.
- [215] P. Mani, V. T. Fidal, K. Bowman, T. S. Chandra, T. Keshavarz, i G. Kyazze, „Development of an electroactive aerobic biocathode for microbial fuel cell applications”, *Environ. Microbiol. Rep.*, t. 12, nr 5, s. 607–612, paź. 2020, doi: 10.1111/1758-2229.12871.
- [216] E. Palma *i in.*, „Bioelectrochemical treatment of groundwater containing BTEX in a continuous-flow system: Substrate interactions, microbial community analysis, and impact of sulfate as a co-contaminant”, *N. Biotechnol.*, t. 53, s. 41–48, lis. 2019, doi: 10.1016/J.NBT.2019.06.004.
- [217] D. Patel, S. L. Bapodra, D. Madamwar, i C. Desai, „Electroactive bacterial community augmentation enhances the performance of a pilot scale constructed wetland microbial fuel cell for treatment of textile dye wastewater”, *Bioresour. Technol.*, t. 332, s. 125088, lip. 2021, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2021.125088.
- [218] S. Wang, M. Xu, B. Jin, U. J. Wünsch, Y. Su, i Y. Zhang, „Electrochemical and microbiological response of exoelectrogenic biofilm to polyethylene microplastics in water”, *Water Res.*, t. 211, mar. 2022, doi: 10.1016/J.WATRES.2022.118046.
- [219] N. Eaktasang, C. S. Kang, S. J. Ryu, Y. Suma, i H. S. Kim, „Enhanced Current Production by Electroactive Biofilm of Sulfate-Reducing Bacteria in the Microbial Fuel Cell”, *Environmental Engineering Research*, t. 18, nr 4, s. 277–281, 2013, doi: 10.4491/EER.2013.18.4.277.
- [220] X. Jin, F. Guo, Z. Liu, Y. Liu, i H. Liu, „Enhancing the electricity generation and nitrate removal of microbial fuel cells with a novel denitrifying exoelectrogenic strain EB-1”, *Front. Microbiol.*, t. 9, nr NOV, s. 416585, lis. 2018, doi: 10.3389/FMICB.2018.02633/BIBTEX.
- [221] G. Reguera i K. Kashefi, „The electrifying physiology of *Geobacter* bacteria, 30 years on”, *Adv. Microb. Physiol.*, t. 74, s. 1–96, sty. 2019, doi: 10.1016/BS.AMPBS.2019.02.007.
- [222] Y. Qian *i in.*, „Synergistic interactions of *Desulfovibrio* and *Petrimonas* for sulfate-reduction coupling polycyclic aromatic hydrocarbon degradation”, *J. Hazard. Mater.*, t. 407, s. 124385, kwi. 2021, doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2020.124385.
- [223] M. Sharma *i in.*, „Bioelectrochemical remediation of phenanthrene in a microbial fuel cell using an anaerobic consortium enriched from a hydrocarbon-

- contaminated site”, *J. Hazard. Mater.*, t. 389, s. 121845, maj 2020, doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2019.121845.
- [224] Y. H. Hong *i in.*, „Genome sequencing reveals the potential of *Achromobacter* sp. HZ01 for bioremediation”, *Front. Microbiol.*, t. 8, nr AUG, s. 278050, sie. 2017, doi: 10.3389/FMICB.2017.01507/BIBTEX.
- [225] B. Shao *i in.*, „Effects of rhamnolipids on microorganism characteristics and applications in composting: A review”, *Microbiol. Res.*, t. 200, s. 33–44, lip. 2017, doi: 10.1016/J.MICRES.2017.04.005.
- [226] D. E. Holmes, J. Zhou, T. Ueki, T. Woodard, i D. R. Lovley, „Mechanisms for Electron Uptake by *Methanosarcina acetivorans* during Direct Interspecies Electron Transfer”, *mBio*, t. 12, nr 5, paź. 2021, doi: 10.1128/MBIO.02344-21/SUPPL_FILE/MBIO.02344-21-ST005.DOCX.
- [227] T. Nakagawa *i in.*, „*Nitrosopumilus zosteriae* sp. nov., an autotrophic ammonia-oxidizing archaeon of phylum Thaumarchaeota isolated from coastal eelgrass sediments of Japan”, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, t. 71, nr 8, 2021, doi: 10.1099/ijsem.0.004961.
- [228] J. Zhou, J. A. Smith, M. Li, i D. E. Holmes, „Methane production by *Methanotrix thermoacetophila* via direct interspecies electron transfer with *Geobacter metallireducens*”, *mBio*, t. 14, nr 4, s. e0036023, sie. 2023, doi: 10.1128/mbio.00360-23.
- [229] L. Yu, Y. Yuan, C. Rensing, i S. Zhou, „Combined spectroelectrochemical and proteomic characterizations of bidirectional *Alcaligenes faecalis*-electrode electron transfer”, *Biosens. Bioelectron.*, t. 106, nr 26, s. 21–28, maj 2018, doi: 10.1016/j.bios.2018.01.032.
- [230] M. Mahjoubi *i in.*, „The genome of *Alcaligenes aquatilis* strain BU33N: Insights into hydrocarbon degradation capacity”, *PLoS One*, t. 14, nr 9, s. e0221574, wrz. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0221574.
- [231] C. Y. Chen, T. Y. Chen, i Y. C. Chung, „A comparison of bioelectricity in microbial fuel cells with aerobic and anaerobic anodes”, *Environ. Technol.*, t. 35, nr 3, s. 286–293, luty 2014, doi: 10.1080/09593330.2013.826254.
- [232] A. P. Borole, C. Y. Hamilton, T. Vishnivetskaya, D. Leak, i C. Andras, „Improving power production in acetate-fed microbial fuel cells via enrichment of exoelectrogenic organisms in flow-through systems”, *Biochem. Eng. J.*, t. 48, nr 1, s. 71–80, grudz. 2009, doi: 10.1016/j.bej.2009.08.008.
- [233] J. L. Stager, X. Zhang, i B. E. Logan, „Addition of acetate improves stability of power generation using microbial fuel cells treating domestic wastewater”, *Bioelectrochemistry*, t. 118, s. 154–160, grudz. 2017, doi: 10.1016/j.bioelechem.2017.08.002.
- [234] K. P. Katuri *i in.*, „Electroactive biofilms on surface functionalized anodes: The anode respiring behavior of a novel electroactive bacterium, *Desulfuromonas*

- acetexigens”, *Water Res.*, t. 185, nr 12, s. 116284, paź. 2020, doi: 10.1016/j.watres.2020.116284.
- [235] A. P. Borole, C. Y. Hamilton, T. Vishnivetskaya, D. Leak, i C. Andras, „Improving power production in acetate-fed microbial fuel cells via enrichment of exoelectrogenic organisms in flow-through systems”, *Biochem. Eng. J.*, t. 48, nr 1, s. 71–80, grudz. 2009, doi: 10.1016/j.bej.2009.08.008.
- [236] M. Sysoev, K. P. Katuri, D. R. Shaw, P. Mandal, i P. E. Saikaly, „Effect of anode potential on the physiology and extracellular electron transfer of *Desulfuromonas acetexigens*”, *Bioresour. Technol. Rep.*, t. 32, nr 3, s. 102448, grudz. 2025, doi: 10.1016/j.biteb.2025.102448.
- [237] D. Xing, S. Cheng, B. E. Logan, i J. M. Regan, „Isolation of the exoelectrogenic denitrifying bacterium *Comamonas denitrificans* based on dilution to extinction”, *Applied Microbiology and Biotechnology 2009 85:5*, t. 85, nr 5, s. 1575–1587, wrz. 2009, doi: 10.1007/s00253-009-2240-0.
- [238] F. Jiang *i in.*, „Exploration of potential driving mechanisms of *Comamonas testosteroni* in polycyclic aromatic hydrocarbons degradation and remodelled bacterial community during co-composting”, *J. Hazard. Mater.*, t. 458, nr 4, s. 132032, wrz. 2023, doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.132032.
- [239] A. Devanadera *i in.*, „Complete Genome Sequence of an Anaerobic Benzene-Degrading Bacterium, *Azoarcus* sp. Strain DN11”, *Microbiol. Resour. Announc.*, t. 8, nr 11, s. e01699-18, mar. 2019, doi: 10.1128/mra.01699-18.
- [240] R. Rosario-Passapera, R. Keddis, R. Wong, R. A. Lutz, V. Starovoytov, i C. Vetriani, „*Parvibaculum hydrocarboniclasticum* sp. nov., a mesophilic, alkane-oxidizing alphaproteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent on the East Pacific Rise”, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, t. 62, nr Pt 12, s. 2921–2926, 2012, doi: 10.1099/ijms.0.039594-0.
- [241] E. M. Corteselli, M. D. Aitken, i D. R. Singleton, „Description of *Immundisolibacter cernigliae* gen. nov., sp. nov., a high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium within the class Gammaproteobacteria, and proposal of Immundisolibacterales ord. nov. and Immundisolibacteraceae ...”, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, t. 67, nr 4, s. 925, kwi. 2017, doi: 10.1099/ijsem.0.001714.
- [242] A. Bedics *i in.*, „*Acidovorax benzenivorans* sp. nov., a novel aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from a xylene-degrading enrichment culture”, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, t. 74, nr 1, s. 006219, sty. 2024, doi: 10.1099/ijsem.0.006219.
- [243] Y. Q. Li, Y. Xin, C. Li, J. Liu, i T. Huang, „Metagenomics-metabolomics analysis of microbial function and metabolism in petroleum-contaminated soil”, *Brazilian Journal of Microbiology 2023 54:2*, t. 54, nr 2, s. 935–947, maj 2023, doi: 10.1007/s42770-023-01000-7.

- [244] J. Brzeszcz, T. Steliga, P. Ryszka, P. Kaszycki, i P. Kapusta, „Bacteria degrading both n-alkanes and aromatic hydrocarbons are prevalent in soils”, *Environmental Science and Pollution Research* 2023 31:4, t. 31, nr 4, s. 5668–5683, grudz. 2023, doi: 10.1007/s11356-023-31405-8.
- [245] Y. Xiao *i in.*, „Pyrosequencing Reveals a Core Community of Anodic Bacterial Biofilms in Bioelectrochemical Systems from China”, *Front. Microbiol.*, t. 6, nr DEC, s. 1410, 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.01410.
- [246] Z. I. Kimura i S. Okabe, „Acetate oxidation by syntrophic association between *Geobacter sulfurreducens* and a hydrogen-utilizing exoelectrogen”, *The ISME Journal* 2013 7:8, t. 7, nr 8, s. 1472–1482, mar. 2013, doi: 10.1038/ismej.2013.40.
- [247] Y. Q. Li, Y. Xin, C. Li, J. Liu, i T. Huang, „Metagenomics-metabolomics analysis of microbial function and metabolism in petroleum-contaminated soil”, *Brazilian Journal of Microbiology* 2023 54:2, t. 54, nr 2, s. 935–947, maj 2023, doi: 10.1007/s42770-023-01000-7.
- [248] F. Martin *i in.*, „Betaproteobacteria dominance and diversity shifts in the bacterial community of a PAH-contaminated soil exposed to phenanthrene”, *Environmental Pollution*, t. 162, nr 3, s. 345–353, mar. 2012, doi: 10.1016/j.envpol.2011.11.032.
- [249] X. Wang, X. Wang, M. Liu, L. Zhou, Z. Gu, i J. Zhao, „Bioremediation of marine oil pollution by *Brevundimonas diminuta*: effect of salinity and nutrients”, *Desalination Water Treat.*, t. 57, nr 42, s. 19768–19775, wrz. 2016, doi: 10.1080/19443994.2015.1106984.
- [250] R. Morya, D. Salvachúa, i I. S. Thakur, „Burkholderia: An Untapped but Promising Bacterial Genus for the Conversion of Aromatic Compounds”, *Trends Biotechnol.*, t. 38, nr 9, s. 963–975, wrz. 2020, doi: 10.1016/j.tibtech.2020.02.008.
- [251] D. Nosek, O. Samsel, T. Pokój, i A. Cydzik-Kwiatkowska, „Waste volatile fatty acids as a good electron donor in microbial fuel cell with the iron-modified anode”, *International Journal of Environmental Science and Technology* 2023 20:12, t. 20, nr 12, s. 13021–13032, mar. 2023, doi: 10.1007/s13762-023-04850-8.
- [252] D. Nosek i A. Cydzik-Kwiatkowska, „Microbial Structure and Energy Generation in Microbial Fuel Cells Powered with Waste Anaerobic Digestate”, *Energies* 2020, Vol. 13, Page 4712, t. 13, nr 18, s. 4712, wrz. 2020, doi: 10.3390/en13184712.
- [253] Y. Sun, J. Wei, P. Liang, i X. Huang, „Microbial community analysis in biocathode microbial fuel cells packed with different materials”, *AMB Express* 2012 2:1, t. 2, nr 1, s. 21-, mar. 2012, doi: 10.1186/2191-0855-2-21.
- [254] H. Fernández *i in.*, „*Azoarcus* sp. CIB, an Anaerobic Biodegrader of Aromatic Compounds Shows an Endophytic Lifestyle”, *PLoS One*, t. 9, nr 10, s. e110771, paź. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0110771.
- [255] D. Tec-Campos *i in.*, „A genome-scale metabolic model for the denitrifying bacterium *Thauera* sp. MZ1T accurately predicts degradation of pollutants and production of polymers”, *PLoS Comput. Biol.*, t. 21, nr 1, s. e1012736, sty. 2025, doi: 10.1371/journal.pcbi.1012736.

- [256] T. E. Mattes *i in.*, „The genome of *Polaromonas* sp. strain JS666: Insights into the evolution of a hydrocarbon- and xenobiotic-degrading bacterium, and features of relevance to biotechnology”, *Appl. Environ. Microbiol.*, t. 74, nr 20, s. 6405–6416, 2008, doi: 10.1128/AEM.00197-08.
- [257] B. Tiwari, N. Manickam, S. Kumari, i A. Tiwari, „Biodegradation and dissolution of polyaromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas* sp.”, *Bioresour. Technol.*, t. 216, nr 1, s. 1102–1105, wrz. 2016, doi: 10.1016/j.biortech.2016.06.047.
- [258] Y. Jangir, S. French, L. M. Momper, D. P. Moser, J. P. Amend, i M. Y. El-Naggar, „Isolation and characterization of electrochemically active subsurface Delftia and Azonexus species”, *Front. Microbiol.*, t. 7, nr MAY, s. 198915, maj 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.00756.
- [259] Y. Mao, X. Zhang, X. Xia, H. Zhong, i L. Zhao, „Versatile aromatic compound-degrading capacity and microdiversity of *Thauera* strains isolated from a coking wastewater treatment bioreactor”, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, t. 37, nr 9, s. 927–934, wrz. 2010, doi: 10.1007/s10295-010-0740-7.
- [260] A. Peeb, N. P. Dang, M. Truu, H. Nõlvak, C. Petrich, i J. Truu, „Assessment of Hydrocarbon Degradation Potential in Microbial Communities in Arctic Sea Ice”, *Microorganisms*, t. 10, nr 2, s. 328, luty 2022, doi: 10.3390/MICROORGANISMS10020328/S1.
- [261] V. Khot *i in.*, „CANT-HYD: A Curated Database of Phylogeny-Derived Hidden Markov Models for Annotation of Marker Genes Involved in Hydrocarbon Degradation”, *Front. Microbiol.*, t. 12, s. 764058, sty. 2022, doi: 10.3389/FMICB.2021.764058/BIBTEX.
- [262] T. Kotani, T. Yamamoto, H. Yurimoto, Y. Sakai, i N. Kato, „Propane Monooxygenase and NAD⁺-Dependent Secondary Alcohol Dehydrogenase in Propane Metabolism by *Gordonia* sp. Strain TY-5”, *J. Bacteriol.*, t. 185, nr 24, s. 7120–7128, grudz. 2003, doi: 10.1128/JB.185.24.
- [263] M. K. Sluis, L. A. Sayavedra-Soto, i D. J. Arp, „Molecular analysis of the soluble butane monooxygenase from *Pseudomonas butanovora*”, *Microbiology (N Y)*, t. 148, nr 11, s. 3617–3629, lis. 2002, doi: 10.1099.
- [264] K. Yen *i in.*, „Identification of a new gene, *tmoF*, in the *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase”, *J. Bacteriol.*, t. 174, nr 22, s. 7253–7261, 1992, doi: 10.1128/JB.174.22.7253-7261.1992.
- [265] K. A. Canada, S. Iwashita, H. Shim, i T. K. Wood, „Directed evolution of toluene ortho-monooxygenase for enhanced 1-naphthol synthesis and chlorinated ethene degradation.”, *J. Bacteriol.*, t. 184, nr 2, s. 344–9, sty. 2002, doi: 10.1128/JB.184.2.344-349.2002.
- [266] C. Werlen, H. P. E. Kahler, i J. R. Van Der Meer, „The Broad Substrate Chlorobenzene Dioxygenase and cis-Chlorobenzene Dihydrodiol Dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. Strain P51 Are Linked Evolutionarily to the Enzymes for

- Benzene and Toluene Degradation”, *Journal of Biological Chemistry*, t. 271, nr 8, s. 4009–4016, luty 1996, doi: 10.1074/JBC.271.8.4009.
- [267] M. Suzuki, T. Hayakawa, J. P. Shaw, M. Rekik, i S. Harayama, „Primary structure of xylene monooxygenase: Similarities to and differences from the alkane hydroxylation system”, *J. Bacteriol.*, t. 173, nr 5, s. 1690–1695, 1991, doi: 10.1128/JB.173.5.
- [268] T. Iwasaki, K. Miyauchi, E. Masai, i M. Fukuda, „Multiple-subunit genes of the aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase play an active role in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Rhodococcus* sp. strain RHA1”, *Appl. Environ. Microbiol.*, t. 72, nr 8, s. 5396–5402, sie. 2006.
- [269] M. Kalin *i in.*, „Phenol hydroxylase from *Trichosporon cutaneum*: Gene cloning, sequence analysis, and functional expression in *Escherichia coli*”, *J. Bacteriol.*, t. 174, nr 22, s. 7112–7120, 1992, doi: 10.1128/JB.174.22.
- [270] S. A. Denome, D. C. Stanley, E. S. Olson, i K. D. Young, „Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway”, *J. Bacteriol.*, t. 175, nr 21, s. 6890–6901, 1993, doi: 10.1128/JB.175.21.6890-6901.1993.
- [271] A. A. Khan, R. F. U. Wang, W. W. Cao, D. R. Doerge, D. Wennerstrom, i C. E. Cerniglia, „Molecular Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of Genes Encoding a Polycyclic Aromatic Ring Dioxygenase from *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1”, *Appl. Environ. Microbiol.*, t. 67, nr 8, s. 3577–3585, sie. 2001, doi: 10.1128/AEM.67.8.
- [272] L. J. Guan *i in.*, „Crystal structures of apo-DszC and FMN-bound DszC from *Rhodococcus erythropolis* D-1”, *FEBS Journal*, t. 282, nr 16, s. 3126–3135, sie. 2015, doi: 10.1111/FEBS.13216.
- [273] D. Selesi *i in.*, „Combined genomic and proteomic approaches identify gene clusters involved in anaerobic 2-methylnaphthalene degradation in the sulfate-reducing enrichment culture N47”, *J. Bacteriol.*, t. 192, nr 1, s. 295–306, sty. 2010, doi: 10.1128/JB.00874-09.
- [274] H. A. Johnson, D. A. Pelletier, i A. M. Spormann, „Isolation and Characterization of Anaerobic Ethylbenzene Dehydrogenase, a Novel Mo-Fe-S Enzyme”, *J. Bacteriol.*, t. 183, nr 15, s. 4536–4542, 2001, doi: 10.1128/JB.183.15.4536-4542.2001.
- [275] N. Graf, M. Wenzel, i J. Altenbuchner, „Identification and characterization of the vanillin dehydrogenase YfmT in *Bacillus subtilis* 3NA”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, t. 100, nr 8, s. 3511–3521, kwi. 2016, doi: 10.1007/S00253-015-7197-6/FIGURES/6.
- [276] O. U. Mason *i in.*, „Metagenomics reveals sediment microbial community response to Deepwater Horizon oil spill”, *The ISME Journal 2014* 8:7, t. 8, nr 7, s. 1464–1475, sty. 2014, doi: 10.1038/ismej.2013.254.

- [277] Y. Copard, P. Amiotte-Suchet, i C. Di-Giovanni, „Exploring the diversity and functional profile of microbial communities of Brazilian soils with high salinity and oil contamination”, *Heliyon*, t. 10, nr 14, s. e34336, lip. 2024, doi: 10.1016/j.ehpl.2007.03.048.
- [278] L. Ren, J. Zhang, B. Geng, J. Zhao, W. Jia, i L. Cheng, „Ecological Shifts and Functional Adaptations of Soil Microbial Communities Under Petroleum Hydrocarbon Contamination”, *Water (Switzerland)*, t. 17, nr 8, s. 1216, kwi. 2025, doi: 10.3390/W17081216/S1.
- [279] M. Bayatian, A. A. Pourbabaee, i M. A. Amoozegar, „Revealing the composition of bacterial communities in various oil-contaminated soils and investigating their intrinsic traits in hydrocarbon degradation”, *Scientific Reports 2025 15:1*, t. 15, nr 1, s. 1–16, lip. 2025, doi: 10.1038/s41598-025-05519-7.
- [280] A. Espinoza-Tofalos, M. Daghighi, E. Palma, F. Aulenta, i A. Franzetti, „Structure and Functions of Hydrocarbon-Degrading Microbial Communities in Bioelectrochemical Systems”, *Water 2020, Vol. 12, Page 343*, t. 12, nr 2, s. 343, sty. 2020, doi: 10.3390/W12020343.
- [281] J. Luo, Y. Xu, J. Wang, L. Zhang, X. Jiang, i J. Shen, „Coupled biodegradation of p-nitrophenol and p-aminophenol in bioelectrochemical system: Mechanism and microbial functional diversity”, *Journal of Environmental Sciences*, t. 108, s. 134–144, paź. 2021, doi: 10.1016/J.JES.2021.02.017.
- [282] P. L. Fernandes, E. M. Rodrigues, F. R. Paiva, B. A. L. Ayupe, M. J. McInerney, i M. R. Tótola, „Biosurfactant, solvents and polymer production by *Bacillus subtilis* RI4914 and their application for enhanced oil recovery”, *Fuel*, t. 180, s. 551–557, wrz. 2016, doi: 10.1016/J.FUEL.2016.04.080.
- [283] K. Sharma, V. Singh, S. Pandit, B. Sen Thapa, K. Pant, i T. R. Tusher, „Isolation of Biosurfactant-Producing Bacteria and Their Co-Culture Application in Microbial Fuel Cell for Simultaneous Hydrocarbon Degradation and Power Generation”, *Sustainability 2022, Vol. 14, Page 15638*, t. 14, nr 23, s. 15638, lis. 2022, doi: 10.3390/SU142315638.
- [284] N. Sekar i R. P. Ramasamy, „Electrochemical Impedance Spectroscopy for Microbial Fuel Cell Characterization”, *J. Microb. Biochem. Technol.*, t. 0, nr 0, s. 1–14, 2013, doi: 10.4172/1948-5948.s6-004.
- [285] G. Lepage, F. O. Albernaz, G. Perrier, i G. Merlin, „Characterization of a microbial fuel cell with reticulated carbon foam electrodes”, *Bioresour. Technol.*, t. 124, s. 199–207, lis. 2012, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2012.07.067.
- [286] G. Pasternak, A. de Rosset, N. Tyszkiewicz, B. Widera, J. Greenman, i I. Ieropoulos, „Prevention and removal of membrane and separator biofouling in bioelectrochemical systems: a comprehensive review”, *iScience*, t. 25, nr 7, lip. 2022, doi: 10.1016/j.isci.2022.104510.

- [287] D. Zhang *i in.*, „Phenol-degrading anode biofilm with high coulombic efficiency in graphite electrodes microbial fuel cell”, *J. Biosci. Bioeng.*, t. 123, nr 3, s. 364–369, mar. 2017, doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.10.010.
- [288] F. Rojo, „Degradation of alkanes by bacteria”, *Environ. Microbiol.*, t. 11, nr 10, s. 2477–2490, paź. 2009, doi: 10.1111/J.1462-2920.2009.01948.X.
- [289] D. R. Bond i D. R. Lovley, „Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes”, *Appl. Environ. Microbiol.*, t. 69, nr 3, s. 1548–1555, mar. 2003, doi: 10.1128/AEM.69.3.1548-1555.2003.
- [290] K. Whiteduck-Léveillé *i in.*, „Identification, characterization and description of *Arcobacter faecis* sp. nov., isolated from a human waste septic tank”, *Syst. Appl. Microbiol.*, t. 39, nr 2, s. 93–99, mar. 2016, doi: 10.1016/J.SYAPM.2015.12.002.
- [291] V. Fedorovich, M. C. Knighton, E. Pagaling, F. B. Ward, A. Free, i I. Goryanin, „Novel electrochemically active bacterium phylogenetically related to *Arcobacter butzleri*, isolated from a microbial fuel cell”, *Appl. Environ. Microbiol.*, t. 75, nr 23, s. 7326–7334, grudz. 2009, doi: 10.1128/AEM.01345-09.
- [292] D. Sun *i in.*, „Characterization of the genome from *Geobacter anodireducens*, a strain with enhanced current production in bioelectrochemical systems”, *RSC Adv.*, t. 9, nr 44, s. 25890–25899, sie. 2019, doi: 10.1039/C9RA02343G.
- [293] K. I. Ehiosun, S. Godin, V. Vargas, H. Preud’homme, R. Grimaud, i R. Lobinski, „Biodegradation of saturate fraction of crude oil and production of signature carboxylic acids”, *Chemosphere*, t. 339, s. 139773, paź. 2023, doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2023.139773.
- [294] P. Li *i in.*, „Complete genome sequence of *Pseudomonas stutzeri* S116 owning bifunctional catalysis provides insights into affecting performance of microbial fuel cells”, *BMC Microbiol.*, t. 22, nr 1, s. 1–13, grudz. 2022, doi: 10.1186/S12866-022-02552-8/FIGURES/6.
- [295] S. Shekhar, A. Sundaramanickam, K. Saranya, M. Meena, S. Kumaresan, i T. Balasubramanian, „Production and characterization of biosurfactant by marine bacterium *Pseudomonas stutzeri* (SSASM1)”, *International Journal of Environmental Science and Technology*, t. 16, nr 8, s. 4697–4706, sie. 2019, doi: 10.1007/S13762-018-1915-4.
- [296] T. Naaz *i in.*, „Bioremediation of hydrocarbon by co-culturing of biosurfactant-producing bacteria in microbial fuel cell with Fe₂O₃-modified anode”, *J. Environ. Manage.*, t. 351, s. 119768, luty 2024, doi: 10.1016/J.JENVMAN.2023.119768.
- [297] D. W. Lee *i in.*, „Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment”, *Environmental Pollution*, t. 241, s. 254–264, paź. 2018, doi: 10.1016/J.ENVPOL.2018.05.070.
- [298] T. Naaz *i in.*, „Bioremediation of hydrocarbon by co-culturing of biosurfactant-producing bacteria in microbial fuel cell with Fe₂O₃-modified anode”, *J. Environ. Manage.*, t. 351, s. 119768, luty 2024, doi: 10.1016/J.JENVMAN.2023.119768.

- [299] H. Hassan, B. Jin, E. Donner, S. Vasileiadis, C. Saint, i S. Dai, „Microbial community and bioelectrochemical activities in MFC for degrading phenol and producing electricity: Microbial consortia could make differences”, *Chemical Engineering Journal*, t. 332, s. 647–657, sty. 2018, doi: 10.1016/J.CEJ.2017.09.114.
- [300] A. P. Borole, C. Y. Hamilton, T. Vishnivetskaya, D. Leak, i C. Andras, „Improving power production in acetate-fed microbial fuel cells via enrichment of exoelectrogenic organisms in flow-through systems”, *Biochem. Eng. J.*, t. 48, nr 1, s. 71–80, grudz. 2009, doi: 10.1016/J.BEJ.2009.08.008.
- [301] R. Ilamathi, A. Merline Sheela, i N. Nagendra Gandhi, „Comparative evaluation of *Pseudomonas* species in single chamber microbial fuel cell with manganese coated cathode for reactive azo dye removal”, *Int. Biodeterior. Biodegradation*, t. 144, paź. 2019, doi: 10.1016/j.ibiod.2019.104744.
- [302] K. Watanabe, M. Miyahara, T. Shimoyama, i K. Hashimoto, „Population dynamics and current-generation mechanisms in cassette-electrode microbial fuel cells”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, t. 92, nr 6, s. 1307–1314, grudz. 2011, doi: 10.1007/S00253-011-3598-3.
- [303] R. Pandey, B. Krishnamurthy, H. P. Singh, i D. R. Batish, „Evaluation of a glycolipopeptide biosurfactant from *Aeromonas hydrophila* RP1 for bioremediation and enhanced oil recovery”, *J. Clean. Prod.*, t. 345, s. 131098, kwi. 2022, doi: 10.1016/J.JCLEPRO.2022.131098.
- [304] J. Liu i C. Vipulanandan, „Effects of Fe, Ni, and Fe/Ni metallic nanoparticles on power production and biosurfactant production from used vegetable oil in the anode chamber of a microbial fuel cell”, *Waste Management*, t. 66, s. 169–177, sie. 2017, doi: 10.1016/J.WASMAN.2017.04.004.