

Comparative Genomic Analysis of Bacterial Strain PL and Detection of Sustainable Bio-Electricity Producing Features

Guendouz Dif^{1,2}, Atika Meklat² and Abdelghani Zitouni²

¹ Department of Natural Sciences, Higher Normal School, Laghouat, Algeria

² Laboratory of Microbial Systems Biology, Higher Normal School, Kouba, Algeria

التحليل الجينومي المقارن للسلاسل البكتيرية PL والكشف عن ميزات إنتاج الكهرباء الحيوية المستدامة

ضيف القندوز^{1,2}، ميكالات عتيقة²، زيتوني عبد الغني²

¹ قسم العلوم الطبيعية، المدرسة العليا للأساتذة، الأغواط، الجزائر

² مخبر بيولوجيا الأنظمة الميكروبية، المدرسة العليا للأساتذة، القبة، الجزائر



LINK الرابط	RECEIVED الاستقبال	ACCEPTED القبول	PUBLISHED ONLINE النشر الإلكتروني	ASSIGNED TO AN ISSUE الإحالة لعدد
https://doi.org/10.37575/b/sci/230030	07/08/2023	23/10/2023	23/10/2023	01/12/2023
NO. OF WORDS عدد الكلمات	NO. OF PAGES عدد الصفحات	YEAR سنة العدد	VOLUME رقم المجلد	ISSUE رقم العدد
5287	7	2023	24	2

ABSTRACT

This study aimed to analyze the whole genome of the bacterial strain PL, isolated from pond sediment, to evaluate its genetic characteristics in the degradation of waste and toxic substrates and the generation of bioelectricity. This was compared to the type strain of the bacterial species *Geobacter sulfurreducens* (*G. sulfurreducens*) (PCA) and the strain KN400. Genomic taxonomy on the TYGS platform established the affiliation of strain PL with the bacterial species *G. sulfurreducens*. Subsequently, a genomic study of strains PL, PCA, and KN400 was performed using various bioinformatics tools. These included the study of genes associated with functional categories (COG) through genome annotation using the RAST server, followed by gene identification using the Prokka program to discover and identify genes related to electricity production. The results of the genomic analysis of the PL strain showed that it possesses many genes necessary for generating electric current. These included genes related to the formation of thick biofilms, adhesion to the anode of microbial fuel cells (MFCs), oxidation of various substrates and environmental pollutants, and extracellular electron transfer. Overall, the obtained results indicate that the PL strain is a promising candidate for sustainable bioenergy generation.

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تحليل الجينوم الكامل للسلسلة البكتيرية PL المعزولة من رواسب بركة pond sediment لتقييم خصائصها الجينية في التخلص من الفضلات والركائز السامة وتوليد الكهرباء الحيوية المستدامة، مقارنة بالسلسلة النموذجية PCA للنوع البكتيري *Geobacter sulfurreducens* والسلسلة KN400. مكنت الدراسة التصنيفية الجزيئية على المنصة TYGS من إثبات انتماء السلسلة PL للنوع البكتيري *G. sulfurreducens*. وفي خطوة لاحقة تم الدراسة الجينومية للسلسلة PL، PCA و KN400 بعدة أدوات معلوماتية كدراسة المورثات المرتبطة بالفئات الوظيفية (COG) وذلك من خلال عملية التحليل الجينومي (Annotation) وبواسطة خادم RAST ثم التحديد الجيني باستخدام برنامج Prokka للكشف والتعرف على الجينات المتعلقة بإنتاج الطاقة الكهربائية. وقد أظهرت نتائج التحليل الجيني للسلسلة PL امتلاكها للكثير من المورثات الضرورية لتوليد تيار كهربائي كالكشف العديد من المورثات المتعلقة بتكوين أغلفة حيوية سمكية والتثبيت بالقطب الموجب لخلايا الوقود الميكروبية MFCs وأكسدة الكثير من الركائز والملوثات البيئية ونقل الإلكترونات خارج الخلية الميكروبية. ويتضح من خلال مجمل النتائج المحصل عليها أهمية السلسلة PL كمرشح واعد في إنتاج الطاقة الحيوية المستدامة.

KEYWORDS

الكلمات المفتاحية

bioinformatics tools, genomic analysis, *geobacter sulfurreducens*, MFCs, sustainable bioenergy, whole genome

أدوات معلوماتية، الجينوم الكامل، خلايا-الوقود الميكروبية، الدراسة الجينومية، الطاقة المستدامة، المورثات

CITATION

الإحالة

Dif, G., Meklat, A. and Zitouni, A. (2023). Althahlil aljinumi almuqaran lilsulalat albaktriari PL walkashf ean mizat 'iintaj alkahraba' alhayawiat almustadama 'Comparative genomic analysis of the bacterial strain PL and the detection of benefits from producing sustainable bioelectricity'. *The Scientific Journal of King Faisal University: Basic and Applied Sciences*, 24(2), 19–25. DOI: 10.37575/b/sci/230030 [in Arabic]

القندوز، ضيف وعتيقة، ميكالات وعبد الغني، زيتوني. (2023). التحليل الجينومي المقارن للسلسلة البكتيرية PL والكشف عن ميزات إنتاج الكهرباء الحيوية المستدامة. *المجلة العلمية لجامعة الملك فيصل: العلوم الأساسية والتطبيقية*، 24(2)، 19-25.

1. مقدمة

مصادر صديقة للبيئة (Qing *et al.*, 2023; Kabeyi and Olanrewaju, 2022). إن إنتاج الطاقة الكهربائية من مصادر متجددة أو حيوية غير ملوثة للنظم البيئية يُعتبر كشفا علميا في غاية الأهمية (Cai *et al.*, 2020). ومن بين المصادر الواعدة في إنتاج الطاقة الكهربائية هي الكائنات الحية الميكروبية لسرعة نموها وسهولة التعامل معها (Sarma *et al.*, 2022; Jatou *et al.*, 2021)، غير أنها في مهبدا ولا تزال كفاءتها محدودة وقيد التحسين.

إنّ خلية الوقود الميكروبية (MFC) هي جهاز كهرو-كيميائي-حيوي يمكنه توليد الكهرباء عن طريق استخدام الإلكترونات التي يتم الحصول عليها من أكسدة الركائز. بشكل عام، يتكون MFC من قطبين (الأنود والكاثود)، ويفصل بينهما غشاء تبادل البروتون (PEM). ويُشار إلى الكائنات الدقيقة المحفزة المختصة بنقل الإلكترونات خارجيًا إلى سطح القطب المستقبل للإلكترونات سواء كان قابلا للذوبان أو غير القابلة للذوبان (المعادن) دون استخدام وسائط اصطناعية بمصطلح Exoelectrogens. إنّ سطح قطب الأنود موجب الشحنة هو أكثر ملاءمة للأغشية الحيوية-الميكروبية biofilms ذات النشاط الكهربائي (Exoelectrogens) في خلايا الوقود الميكروبية MFCs (الشكل 1). ويعتبر في الوقت الحاضر أنّ أشهر المواد المستخدمة في تصنيع

تعتبر الطاقة الكهربائية (Rosenberg, 1998) من أهم الطاقات التي ينبني عليها عالمنا اليوم، ومن أهم صورها هي الطاقة الكهربائية (Rosenberg, 1998). في العقود الأخيرة ازداد الطلب على الطاقة بشكل متنامٍ وذلك بسبب النمو السكاني المستمر والتوسع الحضري (Sharma *et al.*, 2020)، إذ يتم إنتاج الطاقة من عدة مصادر، أكثرها استعمالا هو المصدر الأحفوري (مثل الفحم والبتروول ومشتقاته) والمصدر النووي (Kartal, 2022)، لكن إنتاجها بهذه الطرق الكلاسيكية غير المتجددة ينجز عنه مخاطر وتلوث بيئي فادح (Hunt *et al.*, 2020)، حيث يؤثر استخدام الهائل للوقود الأحفوري لإنتاج الطاقة تأثيرًا سلبيًا على المناخ والأنظمة الطبيعية الذي يُعد أهم أسباب الاحتباس الحراري الذي نعايش آثاره في حاضرتنا (Perera and Nadeau, 2022)، كما أن تسرب الإشعاعات من المفاعلات النووية يعتبر من الحوادث التي تهدد الحياة على وجه الأرض مثل حادثة فوكوشيما (Hasegawa *et al.*, 2015). لذلك تُبذل جهود علمية حثيثة لتوفير الطلب المتزايد للطاقة من جهة، ومن جهة أخرى لتقليل التلوث الذي وصل إلى مستويات قياسية التي تهدد النظم البيئية باستخدام

بيانات معلوماتية على الشبكة العنكبوتية تابعة للمعهد الوطني الأمريكي للمعلومات البيولوجية الجزيئية (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). التي تُوفر الكثير من الخدمات في مجال البيولوجيا الجزيئية Molecular biology. كما يضع على مستواها أغلب الباحثين تسلسلات القواعد الأوتوتية المنجزة مخبريا لجينومات السلالات الميكروبية المدروسة لتكون متاحة رقميا عند كل الباحثين عبر العالم في مجال المعلوماتية الحيوية Bioinformatics للقيام بالمعالجات الحاسوبية اللازمة بواسطة برامج معتمدة أكاديميا.

2.1.2. منصة البيانات TYGS

BLAST (اختصار لـ Basic Local Alignment Search Tool) هي عبارة عن طريقة بحث ضمن قواعد البيانات المعتمدة في المعلوماتية الحيوية، التي تجعل من الممكن العثور على مناطق متشابهة والمقارنة بين اثنين أو أكثر من التسلسلات النيوكليوتيدية أو تسلسلات الأحماض الأمينية، وهي إجراء محاذاة ومقارنة لهذه المناطق مما يمكن من معرفة نسب التشابه بين هاتاه التتابعات، ومن بين أهم المنصات الرقمية التي توفر خدمة الـ BLAST للجينوم هي المنصة الرقمية TYGS Type Strain Genome Server (<http://tygs.dsmz.de>) المتصلة بقاعدة بيانات التي هي سهلة الاستخدام، ضخمة ومحدثة باستمرار بالمعلومات الجينومية والتصنيفية للتعرف وتصنيف بدائيات النوى استنادا لتتابع الجين المشفر لـ 16S rRNA أو لتتابع الجينوم الكامل (Meier-Kolthoff and Göker, 2019).

2.1.3. المنصة المعلوماتية RAST

هي موقع إلكتروني و خادم معلوماتي (<https://rast.nmpdr.org>) يوفر خدمات تصنيفية وتحليلية دقيقة لمورثات الجينوم البكتيري قيد الدراسة، حيث يحدد التسلسلات التي ترمز للبروتينات، rRNA و tRNA ويصنف مورثات الجينوم في مجموعات وظيفية ضمن ما يسمى بالنظم الفرعية الوظيفية COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins) (Aziz et al., 2008).

2.1.4. الأداة البرمجية Prokka (Version 1.14.6)

وهو أحد برامج التحليل الجينومي المهمة. متوفر على المنصة المعلوماتية العالمية Galaxy (<https://usegalaxy.eu>)، الذي يتميز بدقة عالية في الكشف والتعرف على الجينات الوظيفية داخل الجينوم البكتيري (Seemann, 2014).

2.1.5. خادم ويب antiSMASH

antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) هو خادم ويب يسمح بالتحليل السريع للجينومات البكتيرية أو الفطرية للتعرف على المجموعات الجينية المسؤولة عن التخليق الحيوي للمستقلبات الثانوية (Weber et al., 2015).

2.1.6. البرنامج Roary (Version 3.13.0)

Roary برنامج يقارن بين جينومين أو أكثر لسلاسل بكتيرية مختلفة حيث يحدد الـ Pan-genome (مجموع الجينات المتواجدة ضمن الجينومات التي يتم مقارنتها)، Core-genes (المورثات المتواجدة ضمن كل الجينومات التي تخضع للمقارنة وتعبّر عن الجينات الأساسية التي يجب تواجدها عند كل السلالات محل المقارنة)، Shell genes (هو الجزء من Pan-genome الذي يتضمن الجينات المتواجدة عند أغلبية جينومات المقارنة) و Cloud genes (يعني الجينات المتواجدة فقط عند أحد السلالات التي يتم مقارنتها) (Page et al., 2015).

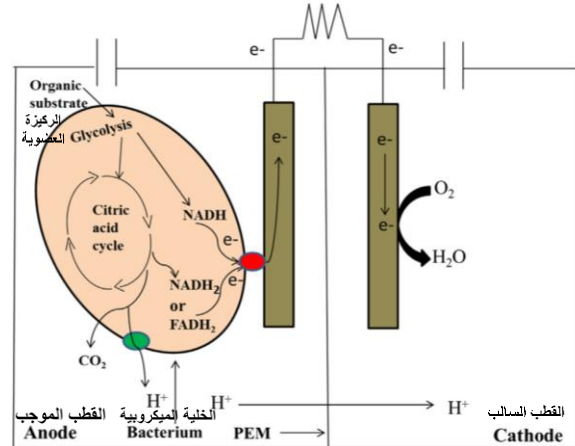
2.2. طريقة العمل:

تمّ الولوج في البداية لموقع قاعدة البيانات NCBI عبر شبكة الأنترنت وتنزيل ملفات fasta المتضمنة لتتابع القواعد الأوتوتية لجينومات السلالات البكتيرية المراد دراستها وهي السلالة PL، والسلالة PCA والسلالة KN400 أرقام تواجدها (Accession Number) على قاعدة البيانات NCBI هي PRJNA719736، PRJNA57743 و PRJNA39745 على التوالي، ثم خضعت هاتاه الجينومات للعديد من المعالجات الحاسوبية باستخدام الخوادم والبرامج المعتمدة (Dif and Zitouni, 2023)، نوجز هذه المعالجات في الخطوات التالية:

- الدراسة التصنيفية الجزيئية للسلالة PL: قد تمّ في هذه الخطوة تحميل

الأنود هي: قضيب الجرافيت، فرشاة ألياف الجرافيت قماش الكربون، ورق كربون، شعيرات الكربون، أما مواد الكاثود الشائعة هي الجرافيت وقماش الكربون وورق الكربون (Agrahari et al., 2022).

الشكل (1): المبدأ العام لخلية الوقود الميكروبية



المصدر: Kumar et al. (2016)

مما لا شك فيه أنّ خلايا الوقود الميكروبية (microbial fuel cells) MFCs هي تقنية ناشئة ترتكز على حركة الإلكترونات في تفاعلات الأكسدة والإرجاع الميكروبية، حيث ينتج عن أكسدة مختلف المركبات تحويل للطاقة الكامنة إلى طاقة كهربائية-إلكترونية تعرف بالكهرباء-الحيوية (Hassan et al., 2021)، يمكن للميكروبات إنتاج الطاقة الكهربائية من أكسدة الكثير من المواد العضوية (مثل: النشا، السليلوز، الكربوهيدرات البسيطة، الأحماض العضوية، الكيتين، البروتينات والأحماض الأمينية) أو المواد الكيميائية السامة (مثل: الفينول phenol، نيترو-بنزين nitrobenzene، الهيدروكربونات الأروماتية متعددة الحلقات polycyclic aromatic hydrocarbons، الإيثانولامين ethanoline، والكبريتيد sulfide) (Hernández-Macedo et al., 2020). وعليه هناك مقاربة وإعادة بيئية-طاقوية مستدامة تحقّق في الوقت نفسه أكثر من هدف وهو استخدام أنواع ميكروبية لإنتاج الكهرباء من الفضلات والسموم (Ray et al., 2020; Torlaema et al., 2022; Mahadevan et al., 2006).

لقد اكتشفت العديد من الأنواع الميكروبية المساهمة في توليد الطاقة الكهربائية النظيفة من أهمها هو النوع *Nagarajan Geobacter sulfurreducens* (et al., 2010; Bond and Lovley, 2003)، الذي ينتمي للعائلة البكتيرية *Geobacteraceae*، وهو نوع من البكتيريا اللاهوائية ذات شكل قضيب، التي لها جدار خلوي سالب الجرام والقادرة على إرجاع المعادن (مثل الحديد) والكبريت. وقد أظهرت لنا العديد من الدراسات القدرة المميزة لـ *G. sulfurreducens* على إنتاج الطاقة الكهربائية الذي أصبح من الممكن استخدام هذا النوع لإنشاء خلية وقود ميكروبية فعالة وطويلة الأمد (MFC) (Guadarrama-Pérez et al., 2023; Choudhury et al., 2017). وإنّ من أهم سلالات هذا النوع المشار إليها في عدة دراسات هي السلالة النموذجية للنوع PCA والسلالة KN400.

نتناول في هذه الدراسة تحليل جينومي مقارن للسلالة PL التي تم عزلها من رواسب بركة في تشونغتشينغ الصينية، للتأكد أولاً من انتمائها للنوع *Geobacter sulfurreducens*، ثم من امتلاكها لجينات تكسيها قدرة مُحتملة لإنتاج الطاقة الكهربائية-الحيوية Bioelectricity المعروفة لدى العديد من سلالات النوع.

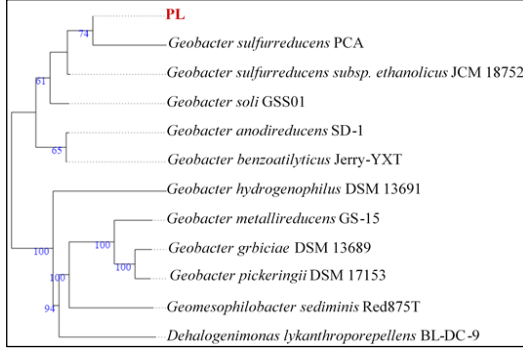
2. الأدوات المستخدمة وطرائق العمل

2.1. الأدوات المستخدمة:

2.1.1. المنصة المعلوماتية البيوتكنولوجية NCBI

NCBI هو اختصار لـ National Center for Biotechnology Information، وهو قاعدة

الشكل (3): شجرة التقارب الوراثي على أساس تحليل تتابع الجينوم الكامل للسلاسل PL على الخادم المعلوماتي TYGS

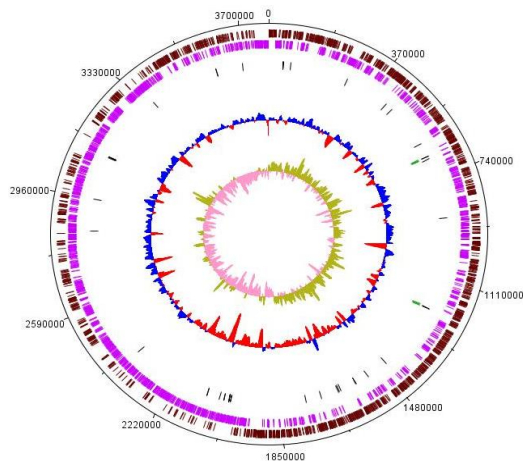


3.2. الخصائص العامة للجينوم PL:

يتضمن جينوم السلسلة PL 3,783,299 زوج قاعدة أزوتية وتبلغ نسبة G+C 61%، كما يتضمن الجينوم PL 3483 تتابع مُشَفَّر (CDS) متنبأ بها. ولقد تم تحديد ما مجموعه 6 جينات تشفر للأحماض النووية الريبية (rRNAs) و48 مورثة تعبر عن tRNA (جدول 1) (شكل 2). معدل الفراغات في تسلسل الجينوم محل الدراسة مُنعدم وN50 مرتفع نسبياً (372840) وهذا يشير إلى جودة عالية لتسلسل الجينوم. الجينوم PL أصغر من جينوم السلسلة PCA (3,814,128 زوج قاعدة أزوتية) وأكبر من جينومات السلسلة KN400 (3,726,411 زوج قاعدة أزوتية) والسلسلة YM18 (3,714,272 زوج قاعدة أزوتية). ولم يتم كذلك العثور على بلازميد في هاته السلسلة على غرار سلاسل *G. sulfurreducens* المكتشفة لحد الآن.

جدول (1): الخصائص العامة لجينوم السلسلة PL	
جينوم PL	الخاصية
3,783,299 زوج قاعدة أزوتية	الحجم
61%	معدل GC
3483	عدد التنبؤات المشفرة
67	عدد RNAs
61.0%	نسبة الفراغات (Gap Ratio)
372840	N50

الشكل (4): خريطة دائرية للجينوم PL. من الدائرة الخارجية إلى الدائرة الداخلية، توجد دائرة 1: CDS على السلسلة الأمامية للـ DNA (لون بني)، الدائرة 2: CDS على الشريط العكسي للـ DNA (لون بنفسجي)، الدائرة 3: الرنا الريبوزومي (لون أسود)، الدائرة 4: الحمض الريبي النووي النقال (لون أخضر)، الدائرة 5: محتوى GC (لون أزرق/برتقالي)، الدائرة 6: توزيع GC (برتقالي/وردي). وقد تم استخدام برنامج DNAPlotter لتحقيق هذه الخريطة.



3.3. مورثات الفئات الوظيفية (COG):

إنّ مخرجات التحليل الجيني (Annotation) بواسطة خادم RAST أظهرت لنا أنّ 26% من مورثات الجينوم PL والجينوم PCA تنتظم في فئات وظيفية (COGs) (الشكل 4)، إذ تم العثور على 25 فئة وظيفية رئيسية متطابقة في كلا الجينومين، بالنسبة لجينوم PL نلاحظ من خلال الشكل (4-1) وجود تواتر جيني كبير نسبياً في الفئات الوظيفية المتعلقة بأبيض البروتينات (Protein Metabolism)، الأحماض الامينية ومشتقاتها (Amino Acids and Derivatives)، العوامل المساعدة والفيتامينات والأصبغ (Cofactors)، (Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments)، كذلك نلاحظ تواتر جيني لأبأس به

جينوم السلسلة PL على الموقع الإلكتروني لقاعدة البيانات TYGS (المعتمدة في التصنيف البكتيري) لإجراء الدراسة التصنيفية الجينية (Molecular identification)، بتحقيق الـ BLAST على أساس تتابع القواعد الأزوتية للجين المُشَفَّر للحمض النووي الريبوسومي 16S ribosomal RNA (تتابع هذا الجين هو المعتمد في تصنيف الأنواع البكتيرية) أو على أساس تتابع الجينوم الكامل، لمعرفة النوع البكتيري للسلسلة المدروسة والأنواع الأقرب لها وراثياً إذ تُعرض النتيجة على شكل قائمة من الأنواع البكتيرية بترتيب تنازلي حسب القرب الوراثي للتتابع المدخل للسلسلة المراد تصنيفها جزيئياً، إنّ أهم مخرجات هاته المعالجة هي شجرتي النسب الوراثي (Phylogenetics trees) أحدها على أساس الجين 16S rRNA والأخرى على أساس تتابع الجينوم الكامل.

المعالجة المعلوماتية الأوتوماتيكية باستخدام الخادم RAST: بفضل هذه المعالجة البرمجية على موقع خادم RAST على شبكة الانترنت تتمكن من تصنيف جينات الجينوم محل الدراسة وظيفياً في أنظمة فرعية وظيفية COG ومعرفة تواتر الجينات في كل نظام فرعي وظيفي.

التحليل الأوتوماتيكي باستعمال برنامج Prokka (Version 1.14.6): تُمكن هذه المعالجة من التعرف على الخصائص العامة للجينوم المدروس (الحجم، معدل GC، عدد التنبؤات المشفرة، ...)، وتساعد من تحديد دقيق وعميق لأسماء المورثات المتضمنة داخل الجينوم المعالج ومعرفة التتابع النيكلويديدي لكل مورثة. ونقوم في مرحلة لاحقة انطلاقاً من مخرجات Prokka بالبحث على الجينات الهامة والواعدة المتعلقة باكسدة الركائز والسموم الكيميائية وتوليد الكبرياء الحيوية.

المعالجة باستخدام الخادم AntiSMASH: إنّ أهمية هذه المعالجة تتمثل في التنبؤ بالمجموعات الجينية Clusters داخل الجينوم المدروس المسؤولة على نواتج الأيض الثانوي.

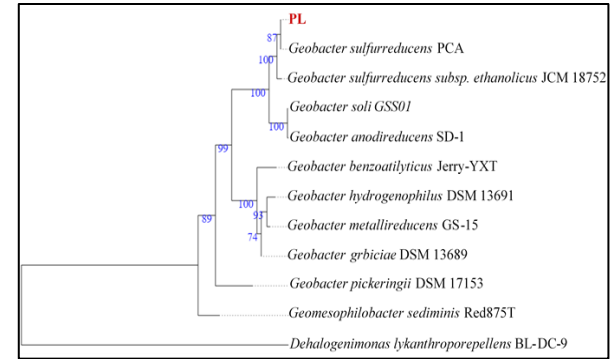
التحليل الجينومي المقارن: تم استخدام برنامج Roary للقيام بمقارنة جينوم السلسلة PL مع جينومات باقي سلالات النوع البكتيري *G. sulfurreducens* خصوصاً السلسلة النمطية لهذا النوع وهي PCA والسلسلة KN400.

3. النتائج والمناقشة

3.1. الدراسة التصنيفية الجينية للسلسلة PL:

لقد مكنت الدراسة الجينية بالتحليل الجزيئي للقطعة "16S rDNA" ودراسة النسالة (Phylogeny) بتحقيق الـ BLAST على قاعدة البيانات TYGS من إثبات أنّ السلسلة PL تنتمي للنوع البكتيري *Geobacter sulfurreducens* كما هو موضح في شجرة التصنيف الوراثي (الشكل 2).

الشكل (2): شجرة التقارب الوراثي على أساس تحليل تتابع الجين المشفر للرنا الريبوسومي 16S rRNA، والتي تبين العلاقة بين السلسلة PL والأنواع الأقرب وراثياً من جنس *Geobacter*



يوضح الشكل 3 شجرة التصنيف الوراثي نتيجة إجراء الـ BLAST للجينوم الكامل للسلسلة PL على الخادم المعلوماتي TYGS، تؤكد هذه الشجرة الوراثية انتماء هذه السلسلة للنوع البكتيري *Geobacter sulfurreducens*.

.processing enzyme

جدول (2): المورثات المتعلقة بالثبيث وتشكيل الأغلفة الحيوية ومواقعها في الجينوم PL

الموقع على الجينوم PL	المورثة	الدور البيولوجي
IGAFNDJN_02372	Alginate biosynthesis protein AlgA	الثبيث وتشكيل الأغلفة الحيوية (biofilms)
IGAFNDJN_01504	Exopolysaccharide phosphotransferase CpsY	
IGAFNDJN_02144	Type 4 prepilin-like proteins leader peptide-processing enzyme	

3.4.2. المورثات المسؤولة عن نقل الإلكترونات خارج الخلية Extracellular electron transfer (EET)

تُنقل Exoelctrogens الإلكترونات إلى سطح القطب إمّا بصورة مباشرة Direct (c-Cyts) c-type cytochromes (DEET) عبر السيتوكرومات النوع C (Ihara *et al.*, 2022) ((T4P) Pili IV) و/أو عن طريق غير مباشر بإفراز أو شعيرات (Wang *et al.*, 2021). نواقل إلكترونية وسطية مثل الفلافينات أو البيوسايانين (Wang *et al.*, 2021).

وأظهر التحليل الجينومي للجينوم PL، الجينوم PCA والجينوم KN400 وجود عديد المورثات المسؤولة عن نقل الإلكترونات خارج الخلية الميكروبية وبالتالي المساهمة في توليد الكبرياء الحيوية.

ويُعد السيتوكروم *OmcS* متعدد الهيم من النوع C (C-type cytochrome) وأحد المكونات المركزية المستخدمة في نقل الإلكترونات خارج الخلية، وتتعلق الإلكترونات إلى مستقبلات الإلكترونات خارج الخلية مثل Fe^{+3} ، Mn^{+4} والمواد الدبالية (Qian *et al.*, 2011). ويُعد *OmcS* واحدًا من أكثر السيتوكرومات وفرة في الأسطح الخارجية لخلايا النوع *Geobacter sulfurreducens* (Mehta *et al.*, 2005)، الذي يلعب دورًا هامًا في إنتاج الكبرياء من قبل الخلايا الميكروبية (Yang *et al.*, 2017). مخرجات الدراسة الجينومية تظهر امتلاك السلالات المدروسة عدة نسخ من مورثات *OmcS*.

وتتملك السلالة PL أربع نسخ من المورثة المشفرة للسيتوكروم *OmcS* وهو نفس العدد الموجود ضمن جينوم السلالة النموذجية PCA. ولقد أوضح التحليل الجينومي للجينوم PL، الجينوم PCA والجينوم KN400 وجود مورثات السيتوكروم *OmcB* C-type polyheme cytochrome والسيتوكروم *OmcC* polyheme cytochrome. وتشير الدراسات إلى أهمية السيتوكروم *OmcB* في نقل الإلكترونات إلى الغشاء الخارجي هو سمة مهمة في إرجاع Fe^{+3} لدى *G. sulfurreducens* (Liu *et al.*, 2015). الجدول (3) يوضح مواقع المورثات التي تُشفر للسيتوكرومات في الجينوم PL.

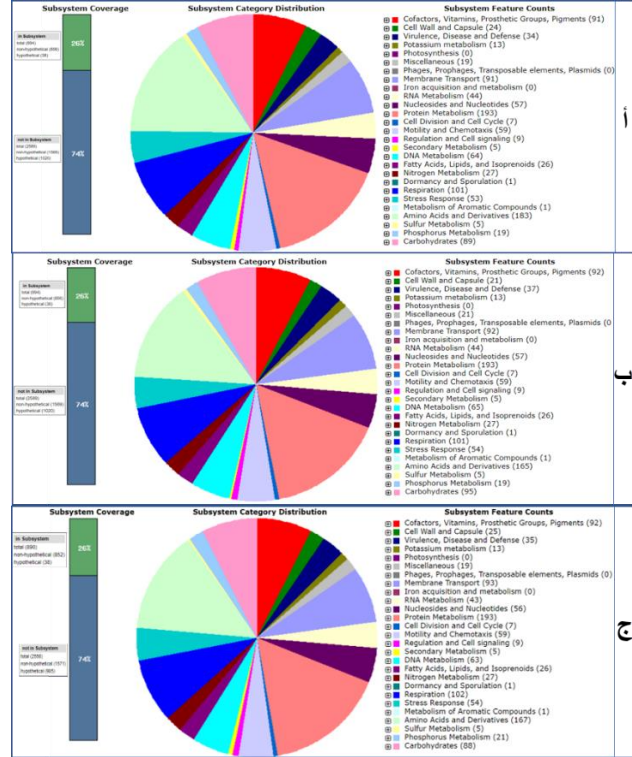
الدراسة الجينومية المقارنة أظهرت أن مواقع مورثات السيتوكروم تختلف بين الجينومات PL، PCA وKN400.

جدول (3): المورثات المشفرة للسيتوكرومات ومواقعها في الجينوم PL

الموقع على الجينوم PL	المورثة	الدور البيولوجي
IGAFNDJN_02442	Cytochrome c6	النقل المباشر للإلكترونات Direct electron transfer
IGAFNDJN_02526		
IGAFNDJN_02731		
IGAFNDJN_00331	C-type cytochrome <i>OmcS</i>	
IGAFNDJN_00332		
IGAFNDJN_00590		
IGAFNDJN_02514		
IGAFNDJN_02516	C-type polyheme cytochrome <i>OmcC</i>	
IGAFNDJN_02517		
IGAFNDJN_02722	C-type polyheme cytochrome <i>OmcC</i>	النقل غير المباشر للإلكترونات
IGAFNDJN_02726	C-type polyheme cytochrome <i>OmcB</i>	
IGAFNDJN_02801	Cytochrome c551 peroxidase	
IGAFNDJN_02877	Cytochrome c biogenesis protein <i>CcsA</i>	
IGAFNDJN_03266		
IGAFNDJN_03303	Cytochrome c biogenesis protein <i>Ccs1</i>	
IGAFNDJN_02878	Menaguiinol-cytochrome c reductase cytochrome b	
IGAFNDJN_02927	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur	
IGAFNDJN_02928	Cytochrome c-552	
IGAFNDJN_03146	Cytochrome c-type protein <i>NrfH</i>	
IGAFNDJN_00324	Cytochrome c-type protein <i>ImcH</i>	
IGAFNDJN_03147	Cytochrome c oxidase	
IGAFNDJN_03243	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase	
IGAFNDJN_00194	Thiosulfate reductase cytochrome B <i>PhsC</i>	
IGAFNDJN_00195	Phenazine biosynthesis protein <i>PhzD</i>	
IGAFNDJN_01007	Riboflavin biosynthesis protein <i>RibD</i>	
IGAFNDJN_01686	Riboflavin synthase	
IGAFNDJN_01687	Riboflavin biosynthesis protein <i>RibBA</i>	
IGAFNDJN_01688	NADPH-flavin oxidoreductase	
IGAFNDJN_02537	Flavin-dependent thymidylate synthase	
IGAFNDJN_03101		

(59) بالنسبة للجينات المتعلقة بالحركة والانجذاب الكيميائي (Motility and Chemotaxis) مما يعني أن هذه السلالة تمتلك خاصية الحركة. كما تبين لنا وجود فنة وظيفية مسؤولة عن ميتابوليزم الكبريت (Sulfur Metabolism)، و كذلك غياب الفنة الوظيفية المسؤولة عن خاصية التمثيل الضوئي (Photosynthesis) مما يؤدي لعدم امتلاك هذه السلالة لهذه الميزة. بالمقابل نلاحظ أيضًا من خلال الشكل (4-ب و 4-ج) أنّ هناك تشابه إلى حد كبير في تواتر مورثات الفئات الوظيفية في جينوم PCA وKN400 مقارنة بالجينوم PL.

الشكل (5): تواتر المورثات ضمن الفئات الوظيفية (الأظمة الفرعية) للجينوم PL باستخدام الخادم RAST؛ لدى السلالة PL، ب؛ لدى السلالة PCA، ج؛ لدى السلالة KN400.



3.4.3. المورثات المرتبطة بإنتاج الطاقة الكهروكيميائية:

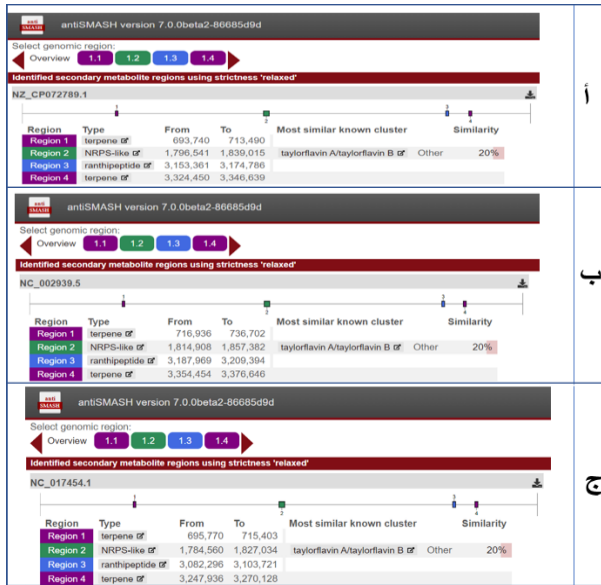
لقد سمح التحليل والتحديد الجيني باستخدام كل من برنامج Prokka، الخادم Rast ومركز موارد المعلوماتية الحيوية (BV-BRC) للجينومين PL وPCA اكتشاف العديد من المورثات المتعلقة بإنتاج الكبرياء الحيوية في خلايا الوقود الميكروبية MFCs، تنطبق إلى ذكر أهمها فيمايلي:

3.4.3.1. المورثات المشفرة لتكوين الأغلفة الحيوية Biofilms

تُولد البكتيريا التي تثبت وتكون أغلفة حيوية سميكة على الأندو كثافة تيار أعلى في مقابل البكتيريا القادرة على تكوين أغلفة حيوية رقيقة (Kumar *et al.*, 2015). حيث أظهر التحليل الجيني للجينوم PL وجود العديد من المورثات المتعلقة بخاصية التثبيث وتشكيل أغلفة حيوية متعددة الطبقات شديدة التنظيم وسميكة (الجدول 2)، إنّ نتيجة التحليل الجيني كشفت عن امتلاك السلالات PL، PCA وKN400 لعدد من المورثات المساهمة في تكوين biofilm مثل *Alginate biosynthesis protein AlgA* Type 4 و *Exopolysaccharide phosphotransferase CpsY* بممتلك المورثتين *prepilin-like proteins leader peptide-processing enzyme* و *peptide-processing enzyme* وغياها لدى السلالة PL وKN400 مما قد يعكس على قدرة أكبر في تكوين أغلفة حيوية سميكة.

تطلب *G. sulfurreducens* التعبير عن الشعيرات الموصلة Pili كهربائياً لتشكيل الأغشية الحيوية على أسطح أكسيد الحديد (III) غير قابلة للذوبان وأنودات الجرافيت المستخدمة في خلايا الوقود الميكروبية، إذ تمثل دور هيكلي في تكوين الأغلفة الحيوية البكتيرية (Reguera *et al.*, 2007)، وتمتلك السلالة PL على غرار السلالات PCA وKN400 جينات تُشفر لصفة الشعيرات الموصلة مثل *Type 4 prepilin-like proteins leader peptide-*

الشكل (6): الكشف عن المجموعات الجينية التي ترمز لنواتج الأيض الثانوية داخل الجينوم بواسطة الأداة antiSMASH. أ: لدى السلالة PL، ب: لدى السلالة PCA، ج: لدى السلالة KN400



يتبين من خلال نتائج التحليل الجينومي ومقارنة السلالة PL مع أهم سلالات النوع البكتيري *G. sulfurreducens*، أهمية السلالة PL كمخزون ثري من المورثات التي تُشفر لكثير من الخصائص تمكنها من تكوين أغلفة حيوية Biofilms (Kumar *et al.*, 2015) والإرتباط بالأنود خلايا الوقود الميكروبية MFCs وأكسدة الكثير من الركائز والملوثات البيئية (Wang *et al.*, 2020) وتقل الإلكترونات خارج الخلية الميكروبية (Ihara *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2017). لذا فإن هاته الدراسة تُشجع على استخدام هذه السلالة في خلايا الوقود الميكروبية لإنتاج الطاقة الحيوية المستدامة بصورة فعالة وطويلة الأمد (Guadarrama-Pérez *et al.*, 2023).

3.7. الاستنتاج والتوصيات:

إنّ الاستثمار في الطاقة المستدامة بمختلف مصادرها، أصبح ضرورة ملحة لمساعدة كوكبنا على التثافي من التلوث وأثاره الفادحة التي نعاشها. حيث تثبت الدراسات يوماً بعد يوم أهمية البكتيريا النافعة كمصدر حيوي ومستدام للطاقة النظيفة، إذ يمكن استخدامها كمولد للإلكترونات ضمن تراكيب خاصة التي تعرف بخلايا الوقود الميكروبية MFCs. فالتحدي الأساس لهذا التوجه هو اختيار السلالات البكتيرية الأكثر نجاعة في تشغيل خلايا الوقود الميكروبية، وعليه فإنّ الدراسة الجينومية تعد أداة فعالة في التنبؤ بأهمية سلالة بكتيرية ما وذلك من خلال معرفة المحتوى الجيني. وعلى أساس ذلك خلصت هذه الدراسة الجينومية للسلالة PL انتماءها للنوع البكتيري *G. sulfurreducens* وامتلاكها رصيذاً جينياً يجعل منها مرشحاً واعداً كمشغل لخلايا الوقود الميكروبية.

نبذة عن المؤلفين

ضيف القدوز

قسم العلوم الطبيعية، المدرسة العليا للأساتذة، الأغواط، الجزائر
مخبر بيولوجيا الأنظمة الميكروبية، المدرسة العليا للأساتذة، القبة، الجزائر
00213675443604, kdgb2007@yahoo.fr

د. ضيف، جزائري متحصل على الدكتوراه في علم الأحياء الدقيقة التطبيقي من المدرسة العليا للأساتذة بالقبة-الجزائر، باحث بمخبر بيولوجيا الأنظمة الميكروبية بالمدرسة العليا للأساتذة بالقبة وأستاذ محاضر بالمدرسة العليا للأساتذة بالأغواط (الجزائر)، نشر عدة مقالات علمية، أبحاثه مقتبسة في مقالات عدة ضمن قاعدة بيانات (Scopus)، نظم وشارك في العديد من الملتقيات في مجال علم الأحياء الدقيقة التطبيقي خصوصاً في مجال البكتيريا النافعة المعززة لنمو النبات والدراسات الجينومية البكتيرية، أشرف على العديد من رسائل الماجستير في علم الأحياء الدقيقة

3.4.3. المورثات المسؤولة عن أكسدة مختلف الركائز

إنّ خلايا الوقود الميكروبية تعتبر تقنية صديقة للبيئة ومستدامة، ففي وقت واحد يُمكنها تنفيذ أكسدة الملوثات وإنتاج الكهرباء (Wang *et al.*, 2020). وتستخدم MFCs الكائنات الحية الدقيقة كمحفزات حيوية لأكسدة الركائز (المواد العضوية). ونقل الإلكترونات الناتجة إلى السطح الأنودي لإنتاج الكهرباء-الحيوية (Wang *et al.*, 2015).

وأظهر التحليل الجيني للسلالات PL، PCA و KN400 وجود العديد من المورثات المشفرة لإنزيمات وبروتينات متدخلة في أكسدة العديد من الركائز التي يؤدي تراكمها إلى مخاطر بيئية، إن الجدول (4) يلخص أهم هذه المورثات وموقعها على الجينوم PL. إنّ الدراسة الجينومية المقارنة أظهرت لنا أنّ مواقع المورثات تختلف بين الجينومات PL، PCA و KN400.

جدول (4): المورثات المسؤولة عن أكسدة الركائز ومواقعها في الجينوم PL

الموقع على الجينوم PL	المورثة	الركيزة
IGAFNDJN_00474	NADH dehydrogenase	الركائز والفصلات العضوية
IGAFNDJN_00013	Protoporphyrinogen oxidase	
IGAFNDJN_00535	6-hydroxy-D-nicotine oxidase	
IGAFNDJN_01924	L-aspartate oxidase	
IGAFNDJN_01463	2-oxoglutarate oxidoreductase	
IGAFNDJN_03153	Peptide methionine sulfoxide reductase <i>MsrA</i>	
IGAFNDJN_02304	Alanine dehydrogenase	
IGAFNDJN_00766	Formate dehydrogenase	
IGAFNDJN_01461	Malate dehydrogenase	
IGAFNDJN_01691	Homoserine dehydrogenase	
IGAFNDJN_00063	Polyphenol oxidase	
IGAFNDJN_01630	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	
IGAFNDJN_01574	3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase	
IGAFNDJN_00667	Aurachin B dehydrogenase	
IGAFNDJN_03263	Thiol-disulfide oxidoreductase <i>ResA</i>	
IGAFNDJN_03114	Protein-disulfide oxidoreductase <i>DsbI</i>	
IGAFNDJN_02198	Carbon monoxide dehydrogenase	

3.5. النتائج الإحصائية للمقارنة الجينومية للسلالات الثلاث للنوع *G. sulfurreducens*:

إنّ المخرجات الإحصائية بواسطة برنامج Roary تُبين لنا أنّ Pan-genome (الجينوم الشامل) يحتوي على مجموعة من المورثات قدرها 3892 جيناً، كما أنّ Core-genome هو عدد مورثات الـ (الجينوم الأساسي المشترك) بنسبة 78% من Pan-genome. حيث يدل ذلك على تشابه كبير بين هذه السلالات في المحتوى الجيني، وبالتالي سلالات هذا النوع متجانسة إلى حد كبير.

3.6. المجموعات الجينية المسؤولة عن الأيض الثانوي في جينوم:

إنّ تحليل الأداة البرمجية antiSMASH لجينومات PL، PCA و KN400 يكشف عن وجود المجموعات الجينية (Clusters) التي قد تكون مسؤولة عن إنتاج مركبات أيضية ثانوية مهمة، تم التنبؤ بواسطة الأداة antiSMASH عن المجموعات الجينية المشفرة لنواتج الأيض الثانوي لدى السلالات الثلاث كما يظهر ذلك في الشكل (6).

وقد بدا لنا من خلال الدراسة أنه لا يوجد علاقة بين نواتج الأيض الثانوي وإنتاج الكهرباء الحيوية في كل السلالات المدروسة، هذه النتائج تتوافق مع الدراسات المنشورة المتعلقة بـ *G. sulfurreducens*.

التطبيقي. رقم الأوركيد: 0000-0002-7194-1460

ميكلات عتيقة

مخبر بيولوجيا الأنظمة الميكروبية، المدرسة العليا للأساتذة، القبة، الجزائر
00213661777647, atika.meklat@g.ens-kouba.dz

أ.د. ميكلات جزائرية حاصلة على درجة الدكتوراه في علم الأحياء الدقيقة التطبيقي Microbiology Applied من المدرسة العليا للأساتذة بالقبة بالعاصمة الجزائرية، تشغل منصب مديرة مخبر بيولوجيا الأنظمة الميكروبية (LBSM) بالمدرسة العليا للأساتذة بالقبة، وأستاذة محاضرة في علم الأحياء الدقيقة العام بنفس مؤسسة التعليم العالي، نشرت عددا كبيرا من الأوراق العلمية في مجلات مؤرخفة في (Scopus)، اكتشفت الكثير من الأنواع البكتيرية الجديدة تحديدا البكتيريا الهيفية Actinomycetes، أبحاثها مقبسة في عديد المقالات المعتمدة في (Scopus)، أشرفت على العديد من رسائل الماجستير والدكتوراه. رقم الأوركيد: 0000-0002-3398-7302

زيتوني عبد الغني

مخبر بيولوجيا الأنظمة الميكروبية، المدرسة العليا للأساتذة، القبة، الجزائر
00213693297229, abdelghani.zitouni@g.ens-kouba.dz

أ.د. زيتوني، جزائري، حاصل على درجة الدكتوراه في علم الأحياء الدقيقة التطبيقي من جامعة تولوز-فرنسا، أستاذ دكتور بالمدرسة العليا للأساتذة القبة بالجزائر العاصمة، ورئيس فرقة بحث بمخبر بيولوجيا الأنظمة الميكروبية (LBSM) بالمدرسة العليا للأساتذة بالقبة، نشر عددا كبيرا من الأوراق العلمية، أبحاثه مقبسة في عديد المقالات المعتمدة في (Scopus)، اكتشف النوع البكتيري *Saccharothrix algeriensis* وعددا من الجزيئات ذات النشاط الحيوي المنتجة من سلالات بكتيرية، ترأس ونظم وشارك في العديد من الملتقيات العلمية في مجال علم الأحياء الدقيقة التطبيقي، أشرف على العديد من رسائل الماجستير والدكتوراه. رقم الأوركيد: 0000-0002-7230-6856

المراجع

- Agrahari, R., Bayar, B., Abubackar, H.N., Giri, B.S., Rene, E.R. and Rani, R. (2022). Advances in the development of electrode materials for improving the reactor kinetics in microbial fuel cells. *Chemosphere*, **290**(n/a), 133184. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.
- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A. and Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, **9**(1), 1–15. DOI: 10.1186/1471-2164 a – s
- Bond, D.R. and Lovley, D.R. (2003). Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(3), 1548–55. DOI: 10.1128/AEM.69.3.
- Cai, T., Meng, L., Chen, G., Xi, Y., Jiang, N., Song, J., Shengyang, Z., Liu, Y., Zhen, G. and Huang, M. (2020). Application of advanced anodes in microbial fuel cells for power generation: A review. *Chemosphere*, **248**(n/a), 125985. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.125985
- Choudhury, P., Prasad Uday, U.S., Bandyopadhyay, T.K., Ray, R.N. and Bhunia, B. (2017). Performance improvement of microbial fuel cell (MFC) using suitable electrode and Bioengineered organisms: A review. *Bioengineered*, **8**(5), 471–87. DOI: 10.1080/21655979.2016.1267883
- Dif, G. and Zitouni, A. (2023). Revealing of potential plant growth-enhancing traits through in silico genomic analysis of *Bacillus rhizoplanae* CIP111899. *The Scientific Journal of King Faisal University: Basic and Applied Sciences*, **24**(1), 34–40. DOI: 10.37575/b/sci/230003
- Guadarrama-Pérez, O., Guevara-Pérez, A.C., Guadarrama-Pérez, V.H., Bustos-Terrones, V., Hernández-Romano, J., Guillén-Garcés, R.A. and Moeller-Chávez, G.E. (2023). Bioelectricity production from the anodic inoculation of *Geobacter sulfurreducens* DL-1 bacteria in constructed wetlands-microbial fuel cells. *Bioelectrochemistry*, **n/a**(n/a), 108537. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2023.108537
- Hasegawa, A., Tanigawa, K., Ohtsuru, A., Yabe, H., Maeda, M., Shigemura, J., Ohira, T., Tominaga, T., Akashi, M., Hirohashi, N., Ishikawa, T., Kamiya,
- K., Shibuya, K., Yamashita, S. and Chhem, R.K. (2015). Health effects of radiation and other health problems in the aftermath of nuclear accidents, with an emphasis on Fukushima. *The Lancet*, **386**(9992), 479–88. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)61106-0
- Hassan, R.Y., Febbraio, F. and Andreescu, S. (2021). Microbial electrochemical systems: Principles, construction and biosensing applications. *Sensors*, **21**(4), 1279. DOI: 10.3390/s21041279
- Hernández-Macedo, M.L., López, J.A., Eguiluz, K.I.B. and Salazar-Banda, G.R. (2020). Environmental Biotechnology: Challenges and perspectives in applying combined technologies to enhance remediation and renewable energy generation. *Revista Peruana de Biología*, **27**(1), 43–8. DOI: 10.15381/rpb.v27i1.17578
- Hunt, N.D., Liebman, M., Thakrar, S.K. and Hill, J.D. (2020). Fossil energy use, climate change impacts, and air quality-related human health damages of conventional and diversified cropping systems in Iowa, USA. *Environmental Science & Technology*, **54**(18), 11002–14. DOI: 10.1021/acs.est.9b06929
- Ihara, S., Wakai, S., Maehara, T. and Okamoto, A. (2022). Electrochemical enrichment and isolation of electrogenic bacteria from 0.22 µm filtrate. *Microorganisms*, **10**(10), 2051. DOI: 10.3390/microorganisms10102051
- Jatoi, A.S., Akhter, F., Mazari, S.A., Sabzoi, N., Aziz, S., Soomro, S.A., Mubarak, N.M., Baloch, H., Memon, A.Q. and Ahmed, S. (2021). Advanced microbial fuel cell for wastewater treatment—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, **28**(n/a), 5005–19. DOI: 10.1007/s11356-020-11691-2
- Kabeyi, M.J.B. and Olanrewaju, O.A. (2022). Sustainable energy transition for renewable and low carbon grid electricity generation and supply. *Frontiers in Energy Research*, **9**(n/a), 1032. Doi:10.3389/fenrg.2021.743114
- Kartal, M.T. (2022). The role of consumption of energy, fossil sources, nuclear energy, and renewable energy on environmental degradation in top-five carbon producing countries. *Renewable Energy*, **184**(n/a), 871–80. DOI: 10.1016/j.renene.2021.12.022
- Kumar, R., Singh, L. and Wahid, Z.A. (2015). Role of microorganisms in microbial fuel cells for bioelectricity production. *Microbial Factories: Biofuels, Waste Treatment*, **1**(n/a), 135–54. DOI: 10.1007/978-81-322-2598-0_9
- Kumar, R., Singh, L. and Zularisam, A.W. (2016). 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*, **56**(n/a), 1322–36. DOI: 10.1016/j.rser.2015.12.029
- Liu, Y., Fredrickson, J.K., Zachara, J.M. and Shi, L. (2015). Direct involvement of ombB, omaB, and omcB genes in extracellular reduction of Fe (III) by *Geobacter sulfurreducens* PCA. *Frontiers in Microbiology*, **6**(n/a), 1075. Doi:10.3389/fmicb.2015.01075
- Mahadevan, R., Bond, D.R., Butler, J.E., Esteve-Nunez, A., Coppi, M.V., Palsson, B.O., Schilling, C.H. and Lovley, D.R. (2006). Characterization of metabolism in the Fe (III)-reducing organism *Geobacter sulfurreducens* by constraint-based modeling. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(2), 1558–68. Doi:10.1128/AEM.72.2.1558-1568.2006
- Mehta, T., Coppi, M.V., Childers, S.E. and Lovley, D. (2005). Outer membrane c-type cytochromes required for Fe (III) and Mn (IV) oxide reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(12), 8634–41. Doi:10.1128/AEM.71.12.8634-8641.2005
- Meier-Kolthoff, J.P. and Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications*, **10**(1), 2182.
- Nagarajan, H., Butler, J.E., Klimes, A., Qiu, Y., Zengler, K., Ward, J., Young, N.D., Methé, B.A., Palsson, B., Lovley, D.R. and Barrett, C.L. (2010). De novo assembly of the complete genome of an enhanced electricity-producing variant of *Geobacter sulfurreducens* using only short reads. *PLoS One*, **5**(6), e10922. Doi:10.1371/journal.pone.0010922
- Page, A.J., Cummins, C.A., Hunt, M., Wong, V.K., Reuter, S., Holden, M.T., Fookes, M., Falush, D., Keane, J.A. and Parkhill, J. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, **31**(22), 3691–3. Doi:10.1093/bioinformatics/btv421
- Perera, F. and Nadeau, K. (2022). Climate change, fossil-fuel pollution, and children's health. *New England Journal of Medicine*, **386**(24), 2303–14. Doi:10.1056/NEJMr22117706
- Reguera, G., Pollina, R.B., Nicoll, J.S. and Lovley, D.R. (2007). Possible nonconductive role of *Geobacter sulfurreducens* pilus nanowires in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, **189**(5), 2125–7. Doi:10.1128/JB.01284-06

- Qian, X., Mester, T., Morgado, L., Arakawa, T., Sharma, M.L., Inoue, K., Joseph, C., Carlos A.S., Maroney, M.J. and Lovley, D.R. (2011). Biochemical characterization of purified OmcS, a c-type cytochrome required for insoluble Fe (III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **1807**(4), 404–12. DOI:10.1016/j.bbabi.2011.01.003
- Qing, L., Alwahed Dagestani, A., Shinwari, R. and Chun, D. (2023). Novel research methods to evaluate renewable energy and energy-related greenhouse gases: Evidence from BRICS economies. *Economic Research-Ekonomska Istraživanja*, **36**(1), 960–76. DOI:10.1080/1331677X.2022.2080746
- Ray, M., Kumar, V. and Banerjee, C. (2020). Strategies for optimization of microbial community structure in microbial fuel cell for advanced industrial wastewater treatment. *Recent Developments in Bioenergy Research*, n/a(n/a), 299–310. DOI: 10.1016/B978-0-12-819597-0.00015-5
- Rosenberg, N. (1998). The role of electricity in industrial development. *The Energy Journal*, **19**(2), n/a. DOI: 10.5547/ISSN0195-6574-EJ-Vol19-No2-2
- Sarma, R., Tamuly, A. and Kakati, B.K. (2022). Recent developments in electricity generation by Microbial Fuel Cell using different substrates. *Materials Today: Proceedings*, **49**(2), 457–63. DOI: 10.1016/j.matpr.2021.02.522
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, **30**(14), 2068–9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu153
- Sharma, S., Basu, S., Shetti, N.P. and Aminabhavi, T.M. (2020). Waste-to-energy nexus for circular economy and environmental protection: Recent trends in hydrogen energy. *Science of the Total Environment*, **713**(n/a), 136633. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.136633
- Torlaema, T.A.M., Ibrahim, M.N.M., Ahmad, A., Guerrero-Barajas, C., Alshammari, M.B., Oh, S.E. and Hussain, F. (2022). Degradation of hydroquinone coupled with energy generation through microbial fuel cells energized by organic waste. *Processes*, **10**(10), 2099. DOI: 10.3390/pr10102099
- Wang, H., Luo, H., Fallgren, P.H., Jin, S. and Ren, Z.J. (2015). Bioelectrochemical system platform for sustainable environmental remediation and energy generation. *Biotechnology Advances*, **33**(3–4), 317–34. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.04.003
- Wang, R., Li, H., Sun, J., Zhang, L., Jiao, J., Wang, Q. and Liu, S. (2021). Nanomaterials facilitating microbial extracellular electron transfer at interfaces. *Advanced Materials*, **33**(6), 2004051. DOI: 10.1002/adma.202004051
- Wang, W., Zhang, Y., Li, M., Wei, X., Wang, Y., Liu, L., Wang, H. and Shen, S. (2020). Operation mechanism of constructed wetland-microbial fuel cells for wastewater treatment and electricity generation: A review. *Bioresource Technology*, **314**(9), 123808. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123808
- Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H.U., Brucocoleri, R., Lee, S.Y., Fischbach, M.A., Müller, R., Wohlleben, W., Breitling, R., Takano, E. and Medema, M.H. (2015). AntiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research*, **43**(W1), W237–W243. DOI: 10.1093/nar/gkv437
- Yang, Y., Kong, G., Chen, X., Lian, Y., Liu, W. and Xu, M. (2017). Electricity generation by *Shewanella decolorationis* S12 without cytochrome c. *Frontiers in Microbiology*, **8**(n/a), 1115. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01115