

Podłoże minimalne PMM do hodowli bakterii *Pseudomonas aeruginosa* i izolacji piomelaniny

Przedmiotem wynalazku jest podłoże minimalne PMM do hodowli bakterii *Pseudomonas aeruginosa* i izolacji piomelaniny z bakterii metodą precypitacji kwasowej dla formy nierozpuszczalnej w wodzie oraz metodą chloroformową dla formy rozpuszczalna w wodzie.

W celu otrzymania piomelaniny bakterie *Pseudomonas aeruginosa* namnażane są zazwyczaj w podłożu LB lub Muellera-Hinton.

Podłoże LB jest powszechnie używane do hodowli bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* jak również *Pseudomonas aeruginosa*. Podłoże LB i podłoża pokrewne (SOC, Terrific Broth, 2xYT itp.) są szeroko stosowane w pracach nad rekombinacją DNA i innych procedurach biologii molekularnej. Obecnie można wyróżnić kilka różnych odmian tej pożywki, chociaż różnią się one tylko szczegółami i wszystkie zawierają takie same główne składniki. Klasyczna pożywka LB zawiera rozpuszczone w wodzie redestylowanej ekstrakt (lizat) z drożdży, trypton i NaCl. Może być także stosowana jako podłoże stałe po dodaniu czynnika żelującego, zwykle agaru. Pożywka taka zawiera wszystkie niezbędne do wzrostu bakterii aminokwasy, czyli źródło azotu z tryptonu i lizatu, jak również witaminy i mikroelementy z lizatu drożdżowego. Sól zapewnia odpowiednią osmotyczność środowiska i jony sodu niezbędne do transportu błonowego. W swojej standardowej postaci nie może być stosowana jako podłoże selekcyjne, ale po dodaniu czynnika selekcyjnego, na przykład antybiotyku, w

tym ampicyliny, nadaje się do selekcji na podstawie oporności. Podłoże LB jest również używane jako uniwersalne podłoże do hodowli bakterii dla różnych organizmów fakultatywnych. W laboratoriach podłoże LB jest czasem używana jako powierzchnia wzrostu przy próbach analizy morfologii kolonii bakterii. Pożywkę sterylizuje się przez autoklawowanie w 121°C. Gotowa pożywka ma słomkowożółtą barwę i jest przezroczysta. Składnikami pożywki płynnej stanowią 0,5% ekstraktu drożdżowego, 1% tryptonu, 1% NaCl, woda redestylowana. Pożywka stała zawiera dodatkowo 0,7% lub 1,5% agaru lub agarozu. Poszczególne odmiany LB różnią się zawartością chlorku sodu, dobraną według warunków osmotycznych optymalnych dla danych bakterii. LB-Miller – 1% NaCl, LB-Lennox – 0,5% NaCl. By osiągnąć odpowiednie pH, około 7, do pożywki dodaje się wodorotlenek sodu. Taka pożywka nie jest jednak buforowana i pH będzie się zmieniać podczas wzrostu bakterii i wydzielania przez nie do środowiska produktów przemiany materii.

W podłożu Mullera-Hinton zasada stworzenia pożywki polega na przygotowaniu jej z ekstraktu wołowego w ilości 300g oraz hydrolizatu kazeiny w ilości 17,5 g, które dostarczają aminokwasów, substancji azotowych i innych składników odżywczych niezbędnych do wzrostu bakterii. Skrobia w ilości 1,5 g jest wykorzystywana jako czynnik wzrostu i koloid ochronny neutralizujący toksyczne produkty, które tworzą się w pożywce podczas procesu wzrastania bakterii, natomiast wapń i magnez są kationami dwuwartościowymi, które wzbogacają pożywkę i wspomagają wzrost drobnoustrojów. Do pożywki dodaje się także 17 g agaru. Pożywkę doprowadza się do pH = 7,4, w temperaturze 25°C.

Użycie tego rodzaju podłoża niesie za sobą konsekwencje wysokiego stopnia zanieczyszczenia piomelaniny substancjami dodatkowymi w postaci alginianu i jego pochodnych oraz lipopolisacharydu.

Celem wynalazku było opracowanie podłoża do hodowli bakterii *Pseudomonas aeruginosa* i izolacji piomelaniny poprzez eliminację tych problemów przez zastosowanie pożywek minimalnych PMM (ang. *Pyomelanin Minimal Medium*).

Podłoże minimalne PMM do hodowli bakterii *Pseudomonas aeruginosa* i izolacji piomelaniny, według wynalazku charakteryzuje się tym że w wariancie I zawiera od 0,15 do 0,25% diwodorofosforanu potasu KH_2PO_4 , od 0,45 do 0,55% chlorku sodu NaCl , od 0,0075 do 0,0125% siarczanu magnezu MgSO_4 , od 0,15 do 0,25% tyrozyny, od 0,15 do 0,25% glukozy.

W wariancie II podłoże zawiera dodatkowo od 0,125 do 0,175% arabinozy, a także od 0,12 do 0,15% kwasu jabłkowego. Rozpuszczalnikiem jest woda destylowana w ilości od 98,3 do 98,8%.

Korzystnie podłoże zawiera 0,2% diwodorofosforanu potasu KH_2PO_4 .

Korzystnie podłoże zawiera 0,5% chlorku sodu NaCl .

Korzystnie podłoże zawiera 0,01% siarczanu magnezu MgSO_4 .

Korzystnie podłoże zawiera 0,2% tyrozyny.

Korzystnie podłoże zawiera 0,2% glukozy.

Korzystnie podłoże zawiera 0,15% arabinozy.

Korzystnie podłoże zawiera 0,135% kwasu jabłkowego.

Podłoże według wynalazku odznacza się tym, że zawiera w swoim składzie tyrozynę, która jest prekursorsorem syntezy piomelaniny dzięki czemu istotnie zwiększa się ilość izolowanego barwnika z hodowli *Pseudomonas aeruginosa* w porównaniu do wcześniej opisanych podłoży do hodowli (LB i Muellera-Hinton). Wyizolowana piomelanina zawiera mniejsze zanieczyszczenie substancjami takimi jak: LPS, alginiany, białka i produktami przemiany materii oraz zmniejszona jest ilość innych barwników produkowanych przez *Pseudomonas aeruginosa* takimi jak: piocyjanina, piorubina co istotnie wpływa na uzyskanie czystszej produktu w większej ilości z zachowaniem jego aktywności biologicznej.

Wynalazek został przedstawiony bliżej w przykładach wykonania

Przykład 1 (PMM I):

W 1000 ml wody destylowanej rozpuszczono w ujęcia wagowym i masowo-objętościowym

| | | |
|-----------------------------------|-------|---------|
| – KH ₂ PO ₄ | 2 g | (0,2%) |
| – NaCl | 5 g | (0,5%) |
| – MgSO ₄ | 0,1 g | (0,01%) |
| – tyrozyna | 2 g | (0,2%) |
| – glukoza | 2 g | (0,2%) |

Tak utworzone podłoże doprowadzono się do pH=7 i wysterylizowano.

Przykład 2 II (PMM II):

Podłoże utworzone w przykładzie 1 wzbogacono o dwa składniki

| | | |
|-----------------|--------|----------|
| – arabinoza | 1,5 g | (0,15%) |
| – kwas jabłkowy | 1,35 g | (0,135%) |

Tak utworzone podłoże doprowadzono do pH=7 i wysterylizowano.