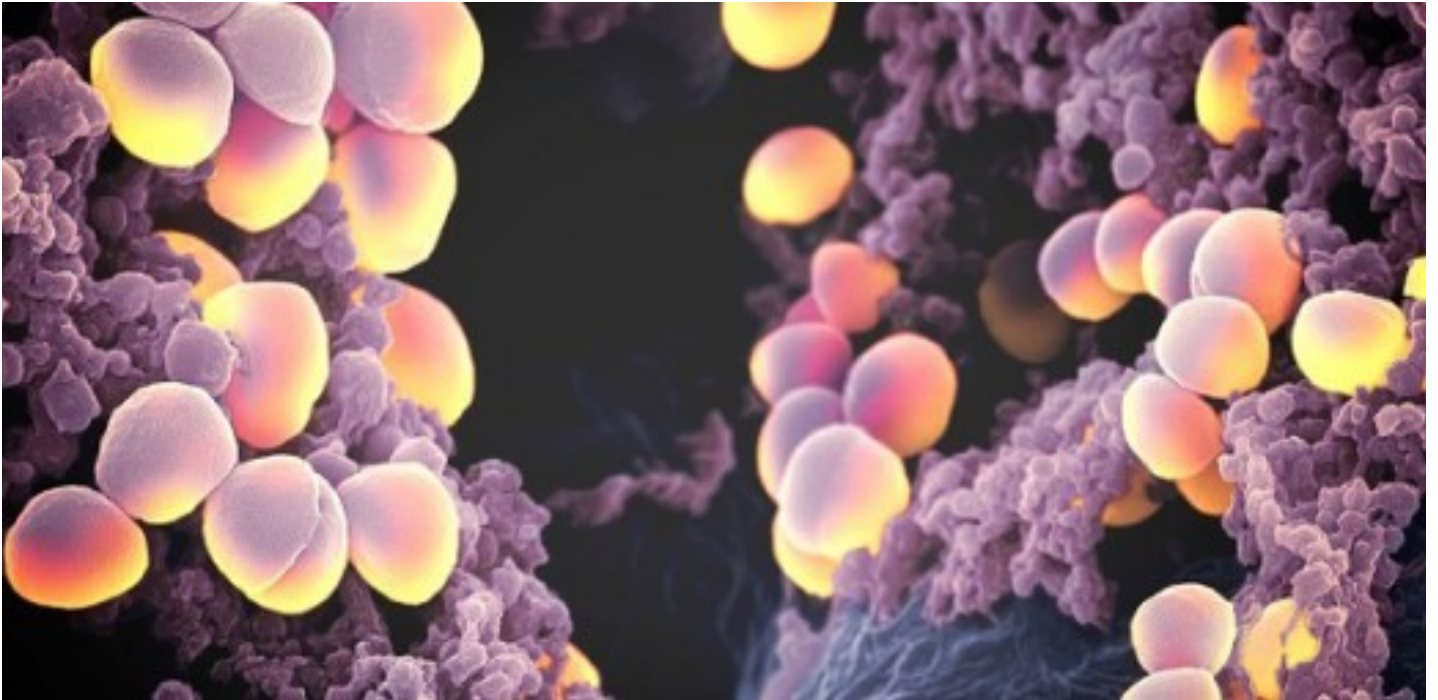




**ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ  
ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ**



**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ  
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ (MIC) ΣΕ ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ ΚΑΙ  
ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ**

**Πτυχιακή εργασία των: Μπαχαρίδου Άννα-Μαρία**

**Κωνσταντοπούλου Αικατερίνη**

**Εισηγητής: Καλογιάννης Σταύρος**

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2017

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά τον καθηγητή μας και εισηγητή της παρούσας πτυχιακής εργασίας κ. Καλογιάννη Σταύρο για την πολύτιμη καθοδήγησή του.

Ευχαριστούμε τη συμφοιτήτριά μας Ντοκουμέ Γιώτα για την άριστη συνεργασία αλλά και βοήθεια που μας προσέφερε κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, έτσι ώστε να ολοκληρωθεί με επιτυχία.

Ευχαριστούμε την κυρία Βίνου Μαργαρίτα για το χρήσιμο υλικό με το οποίο μας εφοδίασε.

Ευχαριστούμε τον κ. Ψωμά Γιώργο για την ευγενή χορηγία του στις κινολόνες και στις ενώσεις συναρμογής.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Εισαγωγή:** Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) έχει πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, στην ιατρική αλλά και στην καθημερινή ζωή. Ως εργαλείο έρευνας η MIC παρέχει μια ενδεικτική σύγκριση της δραστηριότητας ανάμεσα σε διαφορετικές ενώσεις καθώς και τροποποίηση των βιολογικών ιδιοτήτων βιοδραστικών ενώσεων μετά το σχηματισμό ενώσεων συναρμογής.

**Σκοπός:** Η παρούσα μελέτη έχει σκοπό να προσδιοριστεί η MIC του αντιβιοτικού Fleroxacin με ενώσεις συναρμογής που θα αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού μετά την ολονύκτια επώαση.

**Συμπεράσματα-Αποτελέσματα:** Στο σύνολο της δοκιμής MIC οι ενώσεις συναρμογής σε συνδυασμό με την κινολόνη Fleroxacin δεν παρουσίασαν αυξημένη αντιμικροβιακή δράση. Ωστόσο περισσότερα στοιχεία απαιτούνται προκειμένου να μπορεί να γίνει πλήρης αξιολόγηση και αξιοποίηση του μεγάλου όγκου δεδομένων που προκύπτουν.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
-----------------	---

1.1. Ελάχιστες Ανασταλτικές Συγκεντρώσεις (MIC).....	3
1.1.1 Ορισμός Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC).....	3
1.2. Μέση Μέγιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (IC50).....	4
1.2.1.Ορισμός Μέσης Μέγιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης.....	4
1.3. Σύμπλοκα Μετάλλων (Metal Complexes) – Κινολόνες (Quinolones) – Προσδέτες (Ligands).....	5
1.3.1. Σύμπλοκα Μετάλλων (Metal Complexes).....	5
1.3.2. Κινολόνες (Quinolones).....	5
1.3.3. Προσδέτες (Ligands).....	8
1.3.4. Αντιμικροβιακή δράση του συμπλόκου μετάλλου – κινολόνης.....	8
1.4 . Βακτηριακά Στελέχη.....	9
1.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	9
1.4.2. <i>Escherichia coli</i> .....	11
1.4.3. <i>Bacillus subtilis</i> .....	12
1.4.4. <i>Xanthomonas campestris</i> .....	13
1.5. Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας.....	14
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	16
2.1 Μικροβιακά Στελέχη.....	16
2.2 Θρεπτικά μέσα.....	16
2.2.1. Άλλα θρεπτικά μέσα.....	17
2.3 Ενοφθαλμισμός του στερεού μέσου ανάπτυξης με το μικροοργανισμό.....	17
2.4. Συντήρηση μικροοργανισμών.....	18
2.5. Δείγματα για αντιμικροβιακή δράση.....	19
2.6. Όργανα.....	20
2.7. Προσδιορισμός MIC και διαδικασία του πειράματος.....	21
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	26
3.1. MIC FLEROXACIN.....	29
3.1.1. MIC <i>Xanthomonas campestris</i> .....	31
3.1.2. MIC <i>Staphylococcus aureus</i> .....	33
3.1.3. MIC <i>Bacillus subtilis</i> .....	35
3.1.4. MIC <i>Escherichia coli</i> .....	37
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	39
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	40

# 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Ελάχιστες Ανασταλτικές Συγκεντρώσεις (MIC)

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) θεωρείται ο “χρυσός κανόνας” για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των μικροοργανισμών σε αντιβιοτικά και ως εκ τούτου χρησιμοποιούνται για να κρίνουν την απόδοση ευαισθησίας όλων των άλλων μεθόδων δοκιμής. Οι MICs, που χρησιμοποιούνται στα διαγνωστικά εργαστήρια, παρουσιάζουν ασυνήθιστη αντοχή και είναι ικανές να δώσουν μια οριστική απάντηση, όταν ένα οριακό αποτέλεσμα επιτυγχάνεται με άλλες δοκιμές ή όταν οι μέθοδοι διάχυσης δίσκου δεν είναι κατάλληλες. Ωστόσο, το εύρος των συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών, που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της MIC, είναι καθολικά αποδεκτό να είναι σε διπλάσια στάδια αραίωσης πάνω και κάτω από 1 µg/mL, ανάλογα πάντα με τις ανάγκες της πειραματικής διαδικασίας. (Andrews M. Jennifer, 2001)

### 1.1.1 Ορισμός Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC)

Ένας σημερινός ορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC), είναι “η χαμηλότερη συγκέντρωση που οδήγησε σε διατήρηση ή μείωση του εμβολίου βιωσιμότητας” (Carson *et al.* 1995). Γενικά, ως MIC ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση ενός φαρμάκου, που αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη του οργανισμού μετά από ολονύκτια επώαση (αυτή η περίοδος παρατείνεται για οργανισμούς, όπως οι αναερόβιοι, οι οποίοι απαιτούν παρατεταμένη επώαση για την ανάπτυξή τους). Ο προσδιορισμός της MIC περιλαμβάνει μια ημι-ποσοτική διαδικασία δοκιμής, η οποία δίνει μια προσέγγιση προς την ελάχιστη συγκέντρωση αντιμικροβιακού, όπως αυτή απαιτείται για την αποτροπή της μικροβιακής ανάπτυξης.

Στο πρόσφατο παρελθόν, στη μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν σωλήνες ζυμού ανάπτυξης, οι οποίοι περιέχουν ελεγχόμενο επίπεδο του συντηρητικού, μέσα στο οποίο προστέθηκε ένα εμβόλιο μικροβίων. Το τελικό αποτέλεσμα της δοκιμής ήταν ο προσδιορισμός της ελάχιστης συγκέντρωσης του αντιμικροβιακού, το οποίο έδωσε

ένα διαυγές διάλυμα, δηλαδή, καμία οπτική ανάπτυξη (Collins 1964, Davidson and Parish 1989). Επί του παρόντος, οι σωλήνες έχουν αντικατασταθεί από μια ημι-αυτοματοποιημένη μέθοδο μικρό-τιτλοδότησης. Η θολότητα του περιεχομένου του κάθε σωλήνα που παρατηρείται, επηρεάζεται από την δοκιμή και οι δέκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό του τελικού σημείου.

Ωστόσο, το τελικό σημείο όλων των πειραμάτων εξακολουθεί να είναι η παρατήρηση της μη ανάπτυξης μικροοργανισμού σε ένα από τα φρεάτια και ερμηνεύεται ως MIC (Sommers 1980) [( Lambert R.J.W. and Pearson J., 2000)].

## **1.2. Μέση Μέγιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (IC50)**

Η μέση μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση (IC50) είναι ένα μέτρο της αποτελεσματικότητας μιας ουσίας στην αναστολή μιας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας. Αυτό το ποσοτικό μέτρο υποδεικνύει πόσο ένα συγκεκριμένο φάρμακο ή άλλη ουσία (αναστολέας) χρειάζεται για να αναστείλει κατά το ήμισυ τη δεδομένη βιολογική διαδικασία (ή συστατικό μιας μεθόδου, δηλαδή ένα ένζυμο, κύτταρο, υποδοχέα κυττάρου ή μικροοργανισμός). Οι τιμές τυπικά εκφράζονται ως γραμμομοριακή συγκέντρωση.

### **1.2.1.Ορισμός Μέσης Μέγιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης**

Μέση μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση είναι η μισή ελάχιστη (50%) ανασταλτική συγκέντρωση (IC) μιας ουσίας (50% IC, ή IC50). Χρησιμοποιείται συνήθως ως μέτρο δραστηριότητας φαρμάκου ανταγωνιστή στη φαρμακολογική έρευνα. Μερικές φορές, μετατρέπεται επίσης στην κλίμακα  $p$  IC50 ( $-\log$  IC50), όπου υψηλότερες τιμές υποδεικνύουν εκθετικά μεγαλύτερη ισχύ. Σύμφωνα με το FDA, η IC50 αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση ενός φαρμάκου που απαιτείται για 50% αναστολή *in vitro*. Είναι συγκρίσιμο με EC50 για φάρμακα αγωνιστή.

### **1.3. Σύμπλοκα Μετάλλων (Metal Complexes) – Κινολόνες (Quinolones) – Προσδέτες (Ligands)**

#### **1.3.1. Σύμπλοκα Μετάλλων (Metal Complexes)**

Ένα σύμπλοκο μετάλλου αποτελείται από ένα κεντρικό άτομο ή κατιόν, το οποίο συνήθως είναι μεταλλικό και καλείται κέντρο συντονισμού και από μια ευρύτερη ποικιλία μορίων ή ανιόντων, που είναι με τη σειρά τους γνωστά ως ligands. Οι δεσμοί που σχηματίζονται ονομάζονται δεσμοί συναρμογής και προκύπτουν από την προσφορά ζεύγους ηλεκτρονίων από το ligand προς το μέταλλο. Πολλές ενώσεις που περιέχουν μέταλλο, ιδιαίτερα εκείνες των μετάλλων μεταπτώσεως, είναι σύμπλοκα μετάλλων (IUPAC, 1997).

Πολλές ενώσεις συναρμογής με ίση ή αυξημένη αντιμικροβιακή δράση ελήφθησαν σε σύγκριση με τις μητρικές κινολόνες. Νέες στρατηγικές στο σχεδιασμό των μεταλλικών συμπλόκων των κινολονών έχουν οδηγήσει σε ενώσεις με αντικαρκινική δράση. Αναλυτικά εφαρμογές των ligands με μεταλλικά ιόντα προσανατολίζονται σε δύο κύριες κατευθύνσεις:

- Προσδιορισμός των κινολονών με βάση τα ligands με μεταλλικά ιόντα ή αντίστροφα ,
- Προσδιορισμός των μεταλλικών ιόντων, που βασίζονται στα ligands με κινολόνες (Uivarosi Valentina 2013).

#### **1.3.2. Κινολόνες (Quinolones)**

Οι κινολόνες είναι συνθετικά αντιβιοτικά ευρέου φάσματος με καλή απορρόφηση μετά από του στόματος χρήση και εξαιρετική βιοδιαθεσιμότητα. Σε ισχυρά όξινες συνθήκες μόρια κινολόνης, τα οποία διαθέτουν μια βασική πλευρά πυρήνα, είναι πρωτονιωμένα και εμφανίζονται ως κατιόντα, στα ιόντα σύμπλοκα. Η αλληλεπίδραση

με τα μεταλλικά ιόντα έχει ορισμένες σημαντικές συνέπειες για τη διαλυτότητα, τη φαρμακοκινητική και τη βιοδιαθεσιμότητα των κινολονών και συμμετέχει επίσης στο μηχανισμό δράσης αυτών των βακτηριοκτόνων παραγόντων (Hooper, D.C. 2000).

Οι κινολόνες, ως βακτηριοκτόνοι παράγοντες, αναστέλλουν την αντιγραφή και την μεταγραφή του βακτηριακού DNA, προκαλώντας ταχύ κυτταρικό θάνατο. Συγκεκριμένα, αναστέλλουν δυο αντιβακτηριακά ένζυμα-κλειδιά, τη DNA-γυράση (τοποϊσομεράσης II) και την DNAτοποϊσομεράση IV (Maxwell A., 1992).

Με βάση το αντιβακτηριακό τους φάσμα καθώς και τις φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες, οι κινολόνες κατατάσσονται σε τέσσερις γενιές με τα εξής χαρακτηριστικά:

#### ❖ Κινολόνες πρώτης γενιάς:

- Δραστικές έναντι gram αρνητικών βακτηριδίων.
- Υψηλής πρωτεϊνικής σύνδεσης.
- Βραχεία ημιζωή.
- Χαμηλού ορού και συγκεντρώσεων των ιστών.
- Χρήση ενάντια σε απλές λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος. Από του στόματος χορήγηση.

#### ❖ Κινολόνες δεύτερης γενιάς:

##### Α ΚΛΑΣΗΣ

- Αυξημένη δραστηριότητα έναντι των gram αρνητικών βακτηριδίων.
- Πρωτεϊνική δέσμευση κατά ποσοστό 50%.
- Μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής από ότι η πρώτη γενιά.
- Μετρίου ορού και συγκεντρώσεως των ιστών.
- Χρήση ενάντια σε απλές ή περίπλοκες λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος.
- Από του στόματος χορήγηση.



## Β ΚΛΑΣΗΣ

- Αυξημένη δραστικότητα έναντι των Gram αρνητικών βακτηριδίων.
- Πρωτεϊνική δέσμευση κατά ποσοστό 20% - 50% .
- Μετρίου έως μακρό χρόνου ημιζωής.
- Υψηλότερες συγκεντρώσεις στον ορό και στους ιστούς σε σχέση με την Α Κλάση.
- Χρήση ενάντια σε περίπλοκες λοιμώξεις του ουροποιητικού, γαστρεντερίτιδα, προστατίτιδα, νοσοκομειακές λοιμώξεις.
- Από του στόματος και ενδοφλέβια χορήγηση.

### ❖ Κινολόνες τρίτης γενιάς

- Δραστικές έναντι gram αρνητικών και gram θετικών βακτηρίων.
- Παρόμοιες φαρμακοκινητικές ιδιότητες, όπως της δεύτερης γενιάς (B' κλάσης).
- Παρόμοιες ενδείξεις και τρόποι χορήγησης.

### ❖ Κινολόνες τέταρτης γενιάς.

- Εκτεταμένη δραστηριότητα ενάντια σε gram θετικά και gram αρνητικά βακτήρια.
- Ενεργείς έναντι στα αναερόβια και άτυπα βακτήρια.
- Στοματική και ενδοφλέβια χορήγηση.
- Λαμβάνονται υπόψη για τη θεραπεία των ενδοκοιλιακών λοιμώξεων (Oliphant, C.M., Green, G.M., 2002), (King, D.E., MaloneR., LilleyS.H., 2000), (Zhanel, G.G. etal., 1999).

Για την πειραματική μας διαδικασία χρησιμοποιήθηκε η κινολόνη Fleroxacin η οποία είναι κινολόνη δεύτερης γενιάς.

**Fleroxacin:** Η φλεροξασίνη είναι ένα βακτηριοκτόνο φάρμακο που αναστέλλει τη βακτηριακή DNA γυράση και την τοποϊσομεράση IV. Όπως και άλλες κινολόνες και φθοροκινολόνες η ένωση εξαλείφει τα βακτήρια παρεμβαίνοντας στην αναπαραγωγή DNA (αναδιπλασιασμός του βακτηριακού DNA , μεταγραφή, αποκατάσταση και ανασυνδυασμός). Η φλεροξασίνη είναι δραστική έναντι πολλών θετικών κατά Gram και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Είναι ιδιαίτερα δραστική έναντι των ειδών *Shigella*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Yersinia enterocolitica*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

### 1.3.3. Προσδέτες (Ligands)

Ένας προσδέτης ή ligand είναι ένα ιόν ή μόριο, που συνδέεται με ένα κεντρικό άτομο μετάλλου για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο (εναλλακτικά γνωστή και ως μια οντότητα συντονισμού). Τα ligands είναι άτομα ή μόρια με ζεύγη ηλεκτρονίων διαθέσιμα, που μπορεί να είναι ουδέτερα ή αρνητικά φορτισμένα. Συνήθως, τα ligands θεωρούνται δότες ηλεκτρονίων, που έλκονται από το μέταλλο (ο αποδέκτης ηλεκτρονίων) στο κέντρο του συγκροτήματος. Ένα ligand παρέχει τα ηλεκτρόνια για τον δεσμό που σχηματίζει μεταξύ του ίδιου και του κεντρικού ατόμου μετάλλου ή ιόντος (Chemicool.com, 2014). Τα ligands των κινολονών με τις ενώσεις συναρμογής που έλαβαν μέρος στον προσδιορισμό των MIC , απεικονίζονται αναλυτικά σε πίνακες στο κεφάλαιο 3 των αποτελεσμάτων.

### 1.3.4. Αντιμικροβιακή δράση του συμπλόκου μετάλλου – κινολόνης

Από βιολογικής απόψεως, η αλληλεπίδραση των κινολονών με μέταλλα φανερώνει μια πιθανή συνεργική επίδραση του μετάλλου ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση. Η αξιολόγηση αυτής της αντιμικροβιακής δράσης των ενώσεων συναρμογής βασίζεται στα αποτελέσματα των ελάχιστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων (MICs) ενάντια των gram θετικών ή των gram αρνητικών μικροοργανισμών. Κύριοι

παράγοντες για την διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης των συμπλόκων μετάλλων είναι οι εξής έξι:

- η φύση του μετάλλου
- η φύση των ligands
- το χηλικό φαινόμενο
- η φύση του πυρήνα του μετάλλου (μονοπυρηνικό ή διπυρηνικό)
- το συνολικό φορτίο ενός συμπλόκου και,
- η φύση του αντισταθμιστικού ιόντος στην περίπτωση των ιονικών συμπλόκων

## 1.4 . Βακτηριακά Στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη, που αποτέλεσαν αντικείμενο έρευνας στο εν λόγω πείραμα, είναι τα εξής:

- Ο *Staphylococcus aureus* της οικογένειας *Staphylococcaceae*.
- Η *Escherichia coli* της οικογένειας *Enterobacteriaceae*.
- Ο *Bacillus subtilis* της οικογένειας *Bacillaceae*.
- Η *Xanthomonas campestris* της οικογένειας *Xanthomonadaceae*.

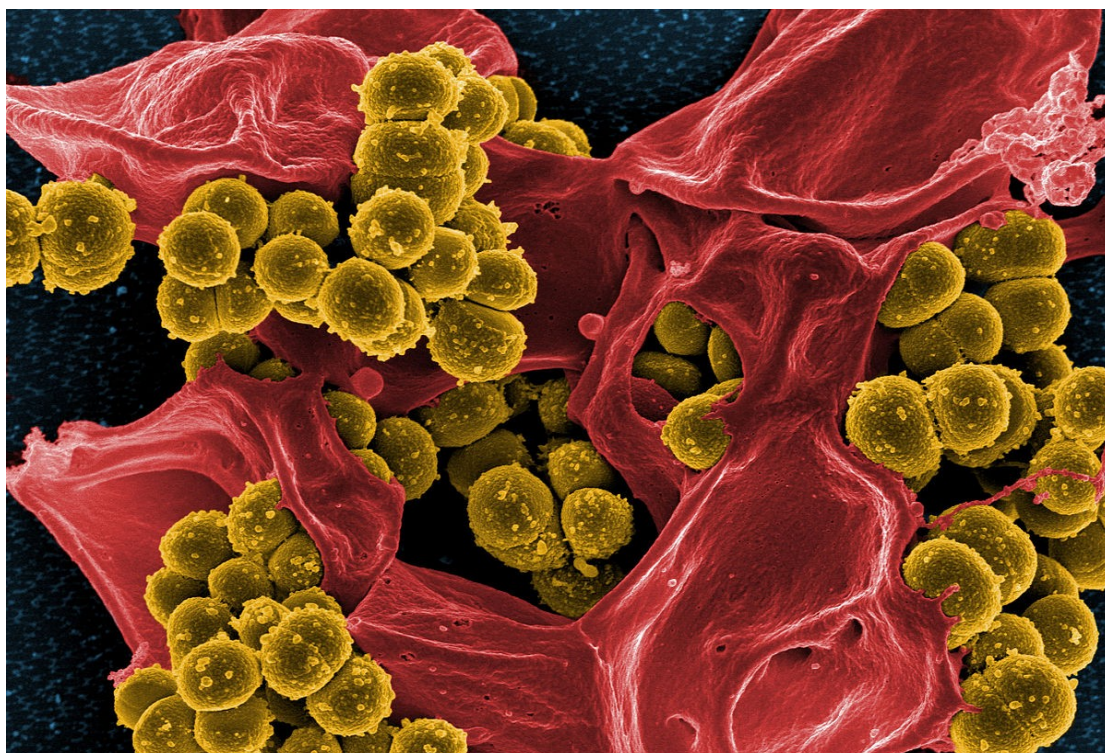
### 1.4.1. *Staphylococcus aureus*

Οι σταφυλόκοκκοι είναι μικροοργανισμοί και συγκεκριμένα βακτήρια. Κατατάσσονται στα δυνητικά αερόβια καταλάση – θετικά γένη των gram – θετικών κόκκων. Τα βασικά χαρακτηριστικά τους είναι:

- Σχήμα κόκκου.
- Κυτταρικό τοίχωμα κυανό όταν βάφεται με χρώση gram.
- Αναπτύσσεται παρουσία και απουσία οξυγόνου.
- Δίνουν θετική την αντίδραση καταλάσης.

Το όνομα του γένους σταφυλόκοκκου προέρχεται από τον ελληνικό όρο “σταφυλή” που σημαίνει “τσαμπί από σταφύλι” και οφείλεται στο γεγονός ότι οι gram – θετικοί αυτοί κόκκοι αναπτύσσονται με τέτοιο τρόπο που μοιάζουν με τσαμπί από σταφύλι. Εμφανίζονται όμως και ως μεμονωμένα κύτταρα, ζεύγη ή και μικρές αλυσίδες. Οι περισσότεροι σταφυλόκοκκοι έχουν διάμετρο 0,5 – 1,5 μm, είναι ακίνητοι και μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικά υλικά με υψηλή συγκέντρωση αλάτων και σε θερμοκρασίες 18 – 40 °C.

Εικόνα 1. Στέλεχος *Staphylococcus aureus*



Οι σταφυλόκοκκοι απαντώνται στο δέρμα και στους ανθρώπινους βλεννογόνους. Μερικοί από αυτούς απαντώνται σε συγκεκριμένες θέσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Είναι σημαντικά παθογόνα για τον άνθρωπο και προκαλούν ένα ευρύ φάσμα απειλητικών για τη ζωή λοιμώξεων στο δέρμα, στα μαλακά μέρη, στα οστά, στην ουροποιητική οδό καθώς και ευκαιριακές λοιμώξεις. Οι σταφυλόκοκκοι, εκτός του *Staphylococcus aureus*, δεν παράγουν το ένζυμο πηκτάση και χαρακτηρίζονται ως πηκτάση – αρνητικοί.

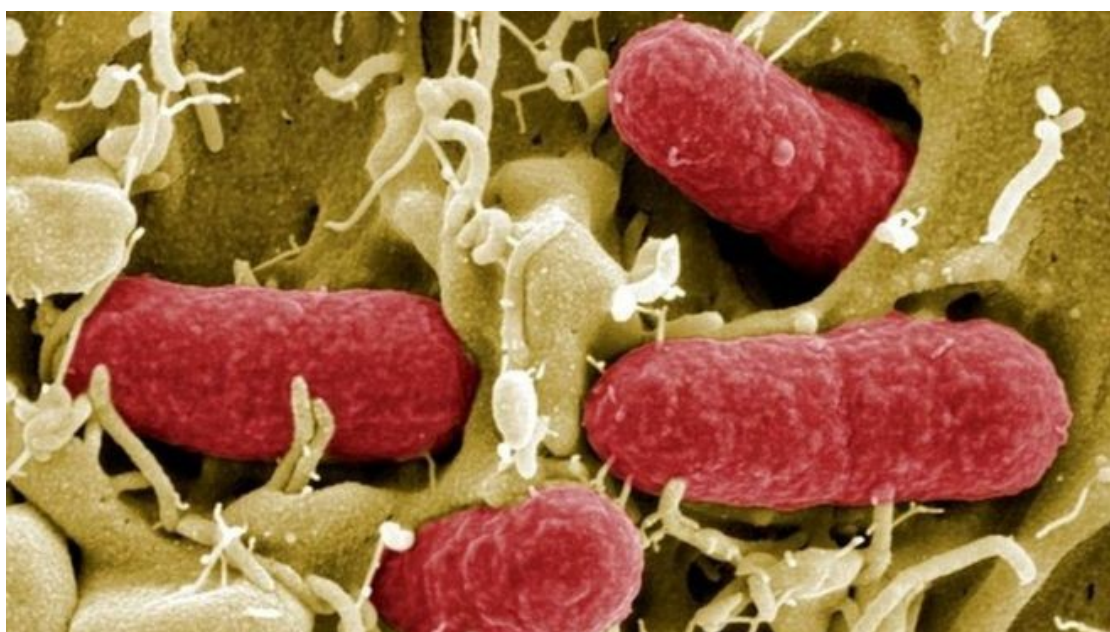
Οι περισσότερες μολύνσεις από σταφυλόκοκκο είναι ακίνδυνες και θεραπεύονται με αντιβιοτικά, ενώ πολλές φορές οι μολύνσεις αυτές είναι τόσο ήπιες που μπορούν να

θεραπευτούν και χωρίς τη χρήση αντιβιοτικών. Η ανάπτυξή τους ευνοείται από την παρουσία NaCl (7%). Αναπτύσσονται γρήγορα σε μη εκλεκτικά θρεπτικά υλικά που επωάζουν αεροβίως ή αναεροβίως. Εμφανίζουν μεγάλες, λείες αποικίες μέσα σε 24 ώρες (Kluytmans J *et al.* 1997).

#### 1.4.2. *Escherichia coli*

Η *E. Coli* είναι ένα gram – αρνητικό, ραβδοειδούς σχήματος κολοβακτήριο (*Enterobacteriaceae*). Συνήθως βρίσκεται στο έντερο ενδόθερμων ζώων. Τα στελέχη του, αποτελούν μέρος της φυσικής χλωρίδας του εντέρου, όντας αβλαβή και μπορούν να ωφελήσουν τους ξενιστές τους παράγοντας βιταμίνη K2 και εμποδίζοντας την εγκατάσταση άλλων παθογόνων βακτηρίων μέσα στο έντερο.

Εικόνα 2. Στέλεχος *Escherichia coli*

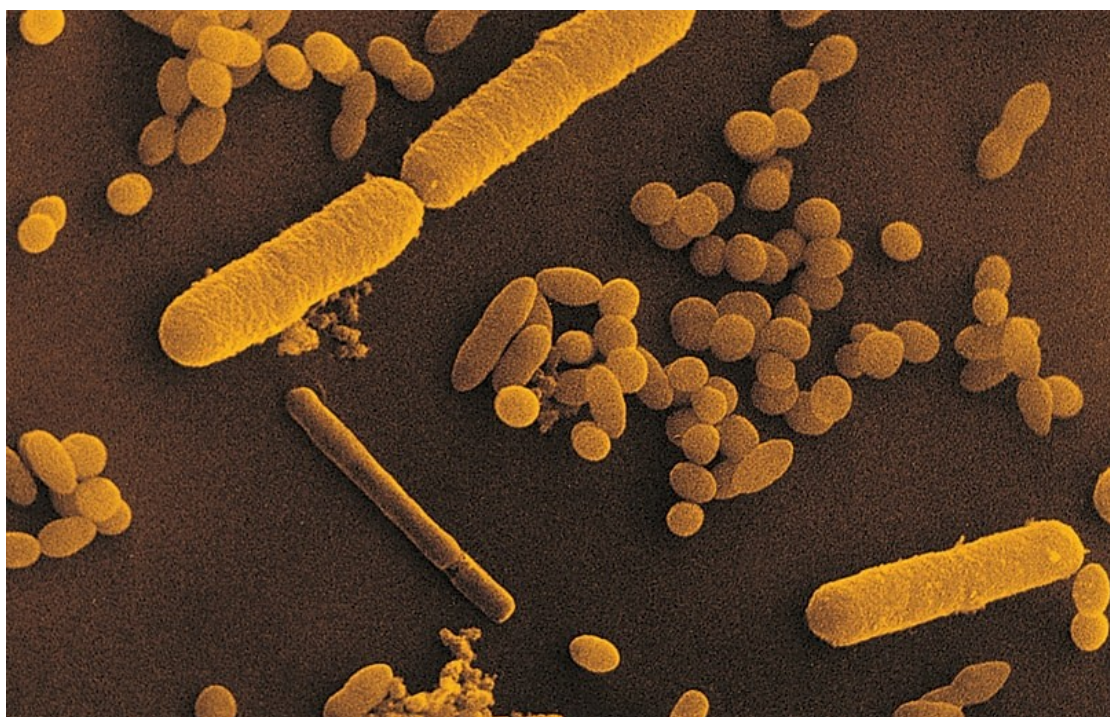


Απατώνται συχνά στα κόπρανα των ζώων και των ανθρώπων. Επίσης, όταν βρεθεί σε διπλανά όργανα όπως στην ουροδόχο κύστη μπορεί να προκαλέσει ουρολοίμωξη. Το βακτήριο δεν αντέχει σε υψηλές θερμοκρασίες και πεθαίνει όταν ζεσταίνεται στους 70 °C για αρκετό χρονικό διάστημα, ενώ μπορεί να επιβιώσει στο ψυγείο για αρκετές ημέρες υπό κάποιες συνθήκες.

### 1.4.3. *Bacillus subtilis*

Ο *B.subtilis*, είναι ένα gram – θετικό, καταλάση – θετικό βακτήριο. Μορφολογικά είναι ραβδόμορφο και έχει την ικανότητα να σχηματίζει ένα σκληρό, προστατευτικό ενδοσπόριο, επιτρέποντας στον οργανισμό να ανέχεται ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Ο *B.subtilis* ιστορικά έχει χαρακτηριστεί ως υποχρεωτικά αερόβιος μικροοργανισμός, αν και πρόσφατη έρευνα απέδειξε ότι αυτό δεν είναι απόλυτα σωστό.

Εικόνα 3. Στέλεχος *Bacillus subtilis*



Ο *B.subtilis* είναι μόνο γνωστό, ότι προκαλεί νόσο σε σοβαρά ανοσοανεπαρκής ασθενείς, ενώ μπορεί αντιθέτως να χρησιμοποιηθεί ως προβιοτικό σε υγιή άτομα και σπάνια προκαλεί τροφική δηλητηρίαση. Ορισμένα στελέχη του *B.subtilis* παράγουν το πρωτεολυτικό ένζυμο σουμπτιλίσίνη. Τα σπόρια του μπορούν να επιβιώσουν την υπερβολική ζέστη στην οποία εκτίθενται κατά το μαγείρεμα.

Αν και αυτό το είδος βρίσκεται συνήθως στο έδαφος, περισσότερα στοιχεία δείχνουν ότι ο *B. subtilis* είναι ένα κανονικό συμβιωτικό εντέρου στον άνθρωπο. Ο αριθμός των σπορίων που βρίσκονται στο ανθρώπινο έντερο είναι πολύ υψηλός, για να

αποδοθεί αποκλειστικά στην κατανάλωση μέσω μόλυνσης των τροφίμων. Το έδαφος απλώς χρησιμεύει ως μια δεξαμενή γεγονός που υποδηλώνει ότι ο *B. subtilis* κατοικεί το έντερο και θα πρέπει να θεωρείται ως κανονικό συμβιωτικό του εντέρου.

#### **1.4.4. Xanthomonas campestris**

Η *X. campestris* είναι ένα gram – αρνητικό, ραβδόμορφο βακτήριο, που προκαλεί μια ποικιλία ασθενειών σε φυτά και εμφανισιακά προκαλεί κηλίδες στο μολυσμένο φυτό. Είναι διαθέσιμα από την NCPPB και άλλες διεθνείς συλλογές καλλιέργειας όπως ICMP, ATOO και LMG σε μια καθαρή μορφή και χρησιμοποιείται στην εμπορική παραγωγή ενός εξωκυτταρικού πολυσακχαρίτη υψηλού μοριακού βάρους που ονομάζεται κόμμι ξανθάνης (Katzen Federico *et al.*, 1998).

Πιο συγκεκριμένα, η κόμμι ξανθάνης είναι ένας πολυσακχαρίτης, που εκκρίνεται από το βακτήριο *Xanthomonas campestris* και χρησιμοποιείται ως πρόσθετο τροφίμων, τροποποιητής ρεολογίας, ως πυκνωτικό μέσο τροφίμων (σε σάλτσες για σαλάτες, για παράδειγμα) αλλά και ως σταθεροποιητής (σε καλλυντικά προϊόντα, για παράδειγμα, για την πρόσληψη διαχωρισμού δύο συστατικών). Αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες πεντασακχαρίτη, που περιλαμβάνει γλυκόζη, μαννόζη και γλυκουρονικό οξύ. Αποτείται από τη ζύμωση της γλυκόζης, σακχαρόζης ή λακτόζης. Μετά από μια περίοδο ζύμωσης, ο πολυσακχαρίτης καταβυθίζεται από ένα μέσο ανάπτυξης με ισοπροπυλική αλκοόλη, ξηραίνεται και αλέθεται με μια λεπτή σκόνη. (Barrere G.C. *et al* 1986)

Εικόνα 4. Στέλεχος *Xanthomonas campestris*



### 1.5. Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας

Στο πλαίσιο της παρούσας πειραματικής μελέτης, ο προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) θα γίνει με ένωση αντιβιοτικού και συμπλόκου μετάλλου, σχηματίζοντας τα εν λόγω ligands, για συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να προσδιορισθεί η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) του αντιβιοτικού με σύμπλοκα μετάλλου σε σύγκριση με την ελάχιστη συγκέντρωση αντιβιοτικού και μόνο, η οποία απαιτείται για την πλήρη αναστολή της ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους, που θα εξετάζεται κάθε φορά. Η επιλογή της εν λόγω MIC, θα γίνει ύστερα από ολονύκτια επώαση.

Για την επίτευξη του σκοπού αυτού, απαραίτητος κρίνεται ο προσδιορισμός του τρόπου μεταβολής των τιμών MIC κινολονών με αντιμικροβιακή δράση, εφόσον αυτές σχηματίσουν σύμπλοκες ενώσεις με μέταλλα.

Οι MIC θα προσδιοριστούν στους παρακάτω μικροοργανισμούς:



- *S. aureus* (θετικό κατά gram)
- *E. coli* (αρνητικό κατά gram)
- *B. subtilis* (θετικό κατά gram)
- *X.campestris* (αρνητικό κατά gram)

Η κινολόνη που χρησιμοποιήθηκε ως ligand για τον σχηματισμό ενώσεων συναρμογής είναι το Fleroxacin με διαφορετικά μέταλλα.

Αναλυτικά:

- Fleroxacin με Cu
- Fleroxacin με Co
- Fleroxacin με Ni
- Fleroxacin με Mn
- Fleroxacin με Zn

## 2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Μικροβιακά Στελέχη

Προσδιορίστηκαν οι MIC στα εξής μικροβιακά στελέχη:

- *Xanthomonas campestris*, ATCC 1395
- *Escherichi coli*, NCTC 12900
- *Bacillus subtilis*, ATCC 6633
- *Staphylococcus aureus*, ATCC 6538

### 2.2 Θρεπτικά μέσα

Για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου, μετά τη ζύγιση όλων των ποσοτήτων προστέθηκε νερό σύμφωνα με τις οδηγίες και το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού με συνεχή ανάδευση. Αμέσως μετά την έναρξη του βρασμού το διάλυμα απομακρύνθηκε από τη θέρμανση, ψύχθηκε και κατανεμήθηκε στους τελικούς περιέκτες για αποστείρωση. Οι συστάσεις των θρεπτικών μέσων αναγράφονται παρακάτω. Για τη παρασκευή των υγρών θρεπτικών μέσων δεν προστέθηκε η συνιστώμενη ποσότητα Άγαρ.

**Πίνακας 2.2.1:** Σύσταση ανά 100 mL του θρεπτικού μέσου Nutrient-Broth Agar για *Staphylococcus aureus* και *Bacillus subtilis*.

<b>Peptone</b>	0.5g
<b>Meat Extract</b>	0.3g
<b>Agar</b>	2g

**Πίνακας 2.2.2:** Σύσταση ανά 100 mL του θρεπτικού μέσου Luria-Broth Agar για *Escherichia coli*.

<b>Tryptone</b>	1g
<b>Yeast Extract</b>	0.5g
<b>NaCl</b>	1g
<b>Agar</b>	2g

**Πίνακας 2.2.3:** Σύσταση ανά 100 mL του θρεπτικού μέσου Yeast and Mold Broth-Agar για *Xanthomonas campestris*.

<b>Yeast Extract</b>	0.3g
<b>Malt Extract</b>	0.3g
<b>Peptone</b>	0.5g
<b>Dextrose</b>	1g
<b>Agar</b>	2g

### **2.2.1. Άλλα θρεπτικά μέσα**

Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστικού οίκου, για τη παρασκευή του Mueller Hinton αρκεί να διαλυθούν 21 g σκόνης σε 1 λίτρο απεσταγμένου νερού με ανάδευση όπως αναγράφεται παραπάνω για τα υπόλοιπα θρεπτικά μέσα.

### **2.3 Ενοφθαλμισμός του στερεού μέσου ανάπτυξης με το μικροοργανισμό**

Όλη η διαδικασία του ενοφθαλμισμού πραγματοποιείται πάντα εντός του biosafety cabinet σε στείρες συνθήκες και για αποφυγή άλλων επιμολύνσεων. Επίσης τα σωληνάκια που χρησιμοποιούνται καθώς και τα στερεά θρεπτικά μέσα έχουν αποστειρωθεί πρώτα.

Αρχικά αποστειρώνεται ο κρίκος με πυράκτωση στη φλόγα και στη συνέχεια αφού κρυώσει παίρνουμε μία-δύο κρικοί από την ήδη υπάρχουσα καλλιέργεια μας. Ακολουθεί η σπορά με εγκάρσιες γραμμές στο κεκλιμένο άγαρ με προσοχή την αποφυγή άλλων επιμολύνσεων. Πάντα δουλεύουμε κοντά στην αναμμένη φλόγα. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται στο κλίβανο επώασης για την ανάπτυξη των αποικιών στην επιφάνεια.

Εναλλακτικά αν η ήδη υπάρχουσα καλλιέργεια είναι αδύναμη παίρνουμε μία-δύο κρικοί από αυτή, εμβαπτίζουμε σε υγρή καλλιέργεια και αφήνουμε 24 ώρες στο κλίβανο επώασης στην αντίστοιχη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Στη συνέχεια αφού έχουμε αποστειρώσει τον κρίκο τον εμβαπτίζουμε στην υγρή καλλιέργεια και ακολουθεί η σπορά με εγκάρσιες γραμμές στο κεκλιμένο άγαρ. Η υπόλοιπη διαδικασία ακολουθείται όπως αναγράφεται παραπάνω.

**Πίνακας 2.3.1:** Θερμοκρασίες επώασης μικροοργανισμών (24h)

<i>Xanthomonas campestris</i>	27 <sup>0</sup> C
<i>Staphylococcus aureus</i>	37 <sup>0</sup> C
<i>Bacillus subtilis</i>	37 <sup>0</sup> C
<i>Escherichia coli</i>	37 <sup>0</sup> C

#### **2.4. Συντήρηση μικροοργανισμών**

Όλοι οι μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν και συντηρήθηκαν σε κεκλιμένες στερεές καλλιέργειες του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης του κάθε μικροοργανισμού. Το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης καθορίζεται στο παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 2.4.1 :** Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ανά μικροοργανισμό

<b>Nutrient-Broth Agar</b>	<i>Bacillus subtilis</i> - <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>YM-Agar</b>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<b>Luria-Broth Agar</b>	<i>Escherichia coli</i>

## 2.5. Δείγματα για αντιμικροβιακή δράση

Η κινολόνη με τα σύμπλοκά της ήταν ευγενική χορηγία του κ. Γεώργιου Ψωμά, τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

**Πίνακας 2.5.1:** Δείγματα για αντιμικροβιακή δράση

FLEROXACIN	Fleroxacin
AK200	[Cu(FLERO) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)]
AK217	[Cu(FLERO)(bipy)Cl]
AK202	[Cu(FLERO)(bipyam)Cl]
AK203Γ	[Cu(FLERO)(phen)Cl]
AK204	[Co(FLERO) <sub>2</sub> (MeOH) <sub>2</sub> ]
AK205A	[Co(FLERO) <sub>2</sub> (bipy)]
AK206A	[Co(FLERO) <sub>2</sub> (bipyam)]
AK207B	[Co(FLERO) <sub>2</sub> (phen)]

AK208A	[Ni(FLERO)2(MeOH)2]
AK210A	[Ni(FLERO)2(bipyam)]
AK211B	[Ni(FLERO)2(phen)]
AK212	[Mn(FLERO)2(MeOH)2]
AK222B	[Mn(FLERO)2(bipyam)]
AK215B	[Mn(FLERO)2(phen)]
AK228A	[Zn(FLERO)2(MeOH)2]
AK229	[Zn(FLERO)2(bipy)]
AK230A	[Zn(FLERO)2(bipyam)]
AK231A	[Zn(FLERO)2(phen)]

Για τη διάλυση των παραπάνω στερεών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης DMSO ( Διμεθυλοσουλφοξείδιο, Dimethyl sulfoxide).

## 2.6. Όργανα

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν καθ'όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας είναι:

- Φασματοφωτόμετρο στα 600nm
- Κλίβανος αποστείρωσης
- Biosafety cabinet ( BSC)
- Επωαστικός κλίβανος

## 2.7. Προσδιορισμός MIC και διαδικασία του πειράματος

Η διαδικασία που ακολουθήσαμε για το προσδιορισμό MIC ήταν όμοια για τα ligand, τις ενώσεις συναρμογής και τους μικροοργανισμούς. Αναλυτικότερα ακολουθεί παρακάτω η διαδικασία του πειράματος.

### 1η ΗΜΕΡΑ:

#### Αραίωση

Ξεκινάμε την προετοιμασία για τις επόμενες ημέρες. Αρχικά κάνουμε την αραίωση των συμπλόκων. Τις προηγούμενες ημέρες έχουμε διαλύσει σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10 mL DMSO το αρχικό μας ligand ή την ένωση συναρμογής. Αυτό το κάνουμε 2-3 ημέρες πριν την αραίωση ώστε να διαλυθεί όσο το δυνατόν καλύτερα γίνεται πριν αναδευτεί στο vortex. Για την αραίωση χρησιμοποιούμε την πιπέτα του 1 mL. Τα ακροφύσια δεν χρειάζεται να είναι αποστειρωμένα απλά προσέχουμε πολύ να τα αλλάζουμε σε κάθε erpedorf γιατί πηγαίνουμε από το πυκνό διάλυμμα στο πιο αραιό.

Η διαδικασία είναι η εξής : Έχουμε ήδη παρασκευάσει διάλυμα 500 µg/mL από την αρχική διάλυση του στερεού συμπλόκου ή του ligand που έχουν συγκέντρωση 5 mg με την προσθήκη 10 mL DMSO. Στη συνέχεια τοποθετείται μία σειρά από 11 σωληνάκια erpedorf. Σε κάθε σωληνάκι σημειώνουμε τους αριθμούς από το 1 μέχρι το 11 και το κωδικό της ουσίας που θα αραιώσουμε. Στο σωληνάκι erpedorf με τον αριθμό 1 προσθέτουμε 448 µL από το αρχικό σωλήνα με συγκέντρωση 500 µg/mL και 952 µL DMSO και αναδεύεται με τη συσκευή vortex. Στα σωληνάκια με αριθμό 2 έως 11 τοποθετούνται από 700 µL DMSO. Σύμφωνα με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων μεταφέρονται 700 µL από το ένα σωληνάκι erpedorf στο επόμενο σωληνάκι και αναδεύονται με τη συσκευή vortex.

**Πίνακας 2.7.1:** Αραιώσεις ligand -συμπλόκων μετάλλων

Αρίθμηση δειγμάτων	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
μg/mL στο erpendorf	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,62	0,31	0,15
μg/mL στο δοκιμαστικό σωλήνα	3,2	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05	0,02	0,01	0,01	0,003

Τα δείγματα που προκύπτουν κάθε φορά τα φυλάσσουμε για περαιτέρω δοκιμές.

### Αποστείρωση όργανα

Εφόσον έχουμε χρόνο αποστειρώνουμε όλα τα σωληνάκια που θα χρειαστούμε τις επόμενες μέρες του πειράματος. Μαζί μπορούμε να αποστειρώνουμε και τα ακροφύσια κάθε φορά που θα χρειάζεται. Οτιδήποτε έχει αποστειρωθεί φυλάσσεται μέσα στο biosafety cabinet.

### Παρασκευή υγρών θρεπτικών και Mueller Hinton

Παρασκευάζουμε τα υγρά θρεπτικά που θα μας χρειαστούν τις υπόλοιπες μέρες όπως και το Mueller σύμφωνα με τις οδηγίες στη σελ.17 και τα βάζουμε να αποστειρωθούν

- Για τη παρασκευή του Mueller Hinton σε 600 mL απεσταγμένο νερό προσθέτουμε 12,6 gr σκόνη Mueller Hinton και το χωρίζουμε σε 3 ογκομετρικές φιάλες από 200 mL
- Για τα υγρά θρεπτικά παρασκευάζουμε 100 mL τα οποία τα χωρίζουμε σε 5 κωνικές φιάλες από 20 mL.

Μεγάλη προσοχή να μην βάλουμε άγαρ στη παρασκευή των υγρών θρεπτικών.



## Εμβολιασμός μικροοργανισμού σε υγρό θρεπτικό

Ξεκινάμε το πείραμα με όποιο μικροοργανισμό θέλουμε. Δουλεύουμε πάντα μέσα στο biosafety cabinet και δίπλα σε αναμμένη φλόγα. Αφού πυρακτώσουμε τον κρίκο παίρνουμε μία-δύο κρικοίές από το κεκλιμένο σωλήνα και το εμβαπτίζουμε στα 20 mL υγρού θρεπτικού. Τοποθετούμε στο στόμιο της κωνικής φιάλης υδρόφοβο βαμβάκι και την αφήνουμε μέσα στο κλίβανο επώασης στην αντίστοιχη θερμοκρασία επώασης του μικροοργανισμού και σε 200 στροφές για ένα 20λεπτο περίπου μέχρι να γίνει ομοιογενές το διάλυμα. Στη συνέχεια παίρνουμε 2 mL από αυτή την κωνική και τα τοποθετούμε σε καινούρια κωνική φιάλη με ίδιο θρεπτικό. Τις αφήνουμε και τις 2 μέσα στο κλίβανο επώασης για ένα 24ωρο περίπου .

## **2η ΗΜΕΡΑ:**

### Πείραμα

Αρχικά βλέπουμε στις δύο κωνικές που αφήσαμε τη προηγούμενη μέρα στο κλίβανο επώασης αν είναι θολό το διάλυμα. Αν έχει θολώσει και στις δύο σημαίνει ότι αναπτύχθηκε επιτυχώς ο μικροοργανισμός και επιλέγουμε να χρησιμοποιήσουμε στη διαδικασία του πειράματος τη δεύτερη κωνική φιάλη. Αν δεν έχει θολώσει η δεύτερη επιλέγουμε την πρώτη. Στη συνέχεια εξετάζεται η κυτταρική ανάπτυξη των μικροοργανισμών με φωτομέτρηση στα 600 nm. Προκειμένου να χωρομετρηθούν τα διαλύματα αραιώθηκαν με φυσιολογικό ορό σε αναλογία 1:10. Σύμφωνα με το τύπο της αραιώσης υπολογίστηκε η κατάλληλη ποσότητα του βακτηριακού διαλύματος που πρέπει να προστεθεί μέσα στο Mueller Hinton ώστε να φτάσει σε απορρόφηση από 0,08 έως 0,125. Για να το εξακριβώσουμε μετράμε την απορρόφηση του Mueller αφού έχουμε προσθέσει το βακτηριακό διάλυμα στα 600 nm.

Για τη φωτομέτρηση αφού έχουμε μηδενίσει το φωτόμετρο με δύο άδειες κυψελίδες κάνουμε το εξής:

- Στη μπροστά κυψελίδα βάζουμε 1 mL Mueller που έχει προστεθεί η ποσότητα του βακτηριακού διαλύματος.
- Στη πίσω κυψελίδα βάζουμε 1 mL απεσταγμένο νερό και 200  $\mu$ l Mueller χωρίς την προσθήκη βακτηριακού διαλύματος.

Αφού έχουμε ετοιμάσει το Mueller δηλαδή το έχουμε φτάσει στη απορρόφηση που θέλουμε ξεκινάμε να εμβολιάζουμε γρήγορα τη σειρά από τους δοκιμαστικούς σωλήνες με το αντίστοιχο σύμπλοκο ή ligand. Αντιστοιχίζουμε το νούμερο απο κάθε δοκιμαστικό σωλήνα με το ίδιο νούμερο στη σειρά των erpendorf με τις αραιώσεις. Χρειάζεται προσοχή να ξεκινάμε τον εμβολιασμό από το νούμερο με το πιο αραιό διάλυμα προς το πιο πυκνό ώστε να μην χρειάζεται να αλλάζουμε ακροφύσιο κάθε φορά. Η ποσότητα αντιμικροβιακού που προσθέτουμε στους δοκιμαστικούς σωλήνες είναι 20  $\mu\text{L}$ .

Στη συνέχεια προσθέτουμε σε όλα τα σωληνάκια 1 mL από το Mueller που έχουμε ετοιμάσει. Δουλεύουμε δίπλα σε αναμμένο φλόγιστρο ώστε να καίμε κάθε φορά το στόμιο από το δοκιμαστικό σωλήνα πριν και μετά τον εμβολιασμό. Τέλος εμβολιάζουμε και 3 δοκιμαστικούς σωλήνες μόνο με Mueller που έχει μέσα μικροοργανισμό για να τους χρησιμοποιήσουμε ως λευκό προσδιορισμό. Τοποθετούμε τις σειρές με τα σωληνάκια στη σειρά μέσα στο κλίβανο επώασης στην αντίστοιχη θερμοκρασία για κάθε μικροοργανισμό και σε 200 στροφές και τα αφήνουμε για ένα 24ωρο.

### **3η ΗΜΕΡΑ:**

#### **Μέτρηση Απορρόφησης**

Από τις σειρές των δοκιμαστικών σωλήνων εντοπίστηκαν οι σωλήνες με τη μικρότερη συγκέντρωση μικροοργανισμού δηλαδή αυτοί στους οποίους δεν εντοπίστηκε θόλωμα. Για κάθε σειρά επιλέγουμε 3 σωλήνες. Τον αριθμό που αρχίζει και θολώνει, ένα πριν και ένα μετά μαζί με τα αντίστοιχα επαναληπτικά τους. Επίσης παίρνουμε και τους 3 σωλήνες με το σκέτο μικροοργανισμό μέσα. Φωτομετρούμε όσους σωλήνες επιλέξαμε και καταγράφουμε τα αποτελέσματα. Στο φωτόμετρο τοποθετούμε τις κυψελίδες με τον εξής τρόπο:

- Στη πίσω κυψελίδα βάζουμε 1 mL απεσταγμένο νερό και 200  $\mu\text{L}$  Mueller καθαρό.
- Στη μπροστά κυψελίδα βάζουμε 1 mL απεσταγμένο νερό και 200  $\mu\text{L}$  από το αντίστοιχο σωληνάκι που φωτομετρούμε εκείνη τη στιγμή.

Στη φωτομέτρηση χρησιμοποιούμε πιπέτα του 1 mL που κάθε φορά τη ρυθμίζουμε είτε στο 1 mL είτε στα 200  $\mu$ L. Επίσης κάθε φορά αλλάζουμε ακροφύσιο και χρησιμοποιούμε μόνο αποστειρωμένα. Για τη φωτομέτρηση χρησιμοποιούμε μία κυψελίδα ανά σειρά δοκιμαστικών σωλήνων φωτομετρώντας από το καθαρό σωληνάκι προς αυτό με τον πιο ανεπτυγμένο μικροοργανισμό.

Αφού τελειώσουμε τις μετρήσεις βάζουμε όλα τα σωληνάκια , τις κωνικές και οτιδήποτε έχει μικροοργανισμό μέσα για αποστείρωση ως απόβλητα.

### 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ελάχιστες αναλστατικές συγκεντρώσεις ( MICs) που σημειώθηκαν στη παρούσα πειραματική μελέτη, για τη κινολόνη αλλά και για τα ligand της με τις ενώσεις συναρμογής στα εξεταζόμενα βακτηριακά στελέχη παρουσιάζονται στο πίνακα 3.1:

**Πίνακας 3.1 :** MIC των μελετηθέντων ενώσεων συναρμογής του αντιβιοτικού fleroxacin.

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΤΥΠΟΣ	<i>Xanthomonas campestris</i> μg/mL	<i>Staphylococcus aureus</i> μg/mL	<i>Bacillus subtilis</i> μg/mL	<i>Escherichia coli</i> μg/mL
	<b>FLEROXACIN</b>	<b>0.8</b>	<b>0,4</b>	<b>0.4</b>	<b>0.2</b>
AK200	[Cu(FLERO)2(H2O)]	0.8	0,8	0.8	0.4
AK217	[Cu(FLERO)(bipy)Cl]	0.8	0,4	0.8	0.2
AK202	[Cu(FLERO)(bipyam)Cl]	>3.2	>1,6	>1.6	1.6
AK203Γ	[Cu(FLERO)(phen)Cl]	0.8	0,8	0.8	0.8
AK204	[Co(FLERO)2(MeOH)2]	1.6	0,4	0.8	0.4
AK205A	[Co(FLERO)2(bipy)]	1.6	0,8	0.8	0.4
AK206A	[Co(FLERO)2(bipyam)]	1.6	0,8	0.8	0.8
AK207B	[Co(FLERO)2(phen)]	1.6	0,8	0.8	0.4
AK208A	[Ni(FLERO)2(MeOH)2]	1.6	0,4	0.4	0.4
AK210A	[Ni(FLERO)2(bipyam)]	3.2	0,8	0.8	0.8
AK211B	[Ni(FLERO)2(phen)]	1.6	0,8	0.8	0.4
AK212	[Mn(FLERO)2(MeOH)2]	1.6	0,4	0.4	0.4

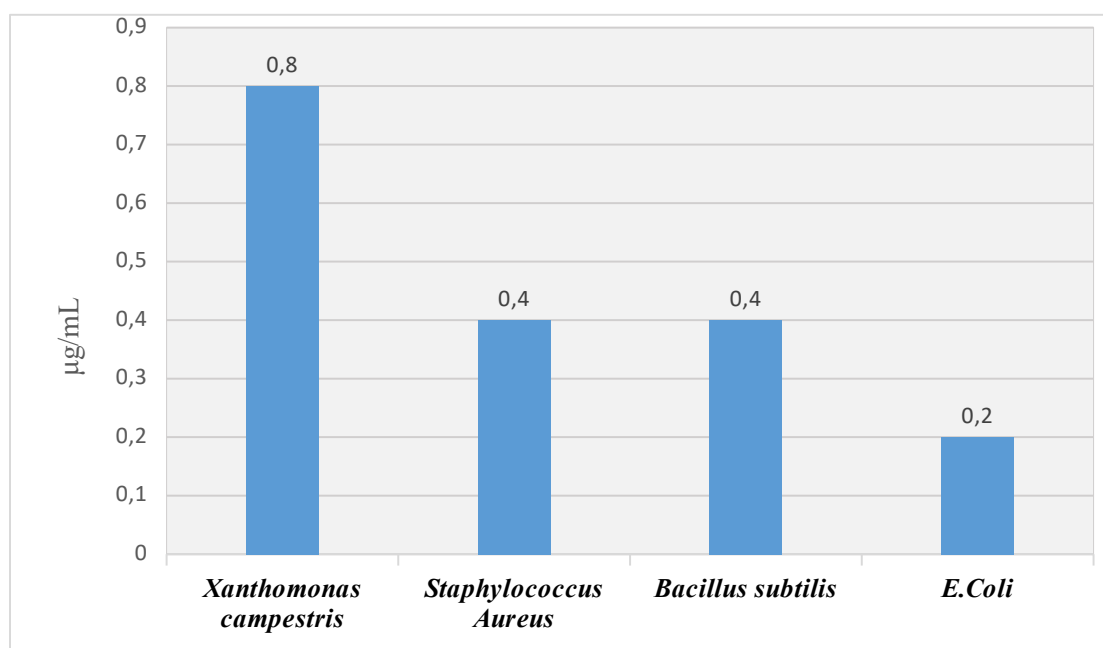
AK222B	[Mn(FLERO)2(bipyam)]	>3.2	1,6	1.6	1.6
AK215B	[Mn(FLERO)2(phen)]	1.6	0,8	0.8	0.4
AK228A	[Zn(FLERO)2(MeOH)2]	3.2	0,8	0.8	0.4
AK229	[Zn(FLERO)2(bipy)]	1.6	0,8	0.8	0.4
AK230A	[Zn(FLERO)2(bipyam)]	1.6	0,8	0.4	0.4
AK231A	[Zn(FLERO)2(phen)]	1.6	0,8	0.8	0.4

**Πίνακας 3.2:** IC50 των μελετηθέντων ενώσεων συναρμογής του αντιβιοτικού fleroxacin.

ΚΩΔΙΚΟ Σ	ΤΥΠΟΣ	Xanthomonas campestris μg/mL	Staphylococcus aureus μg/mL	Bacillus subtilis μg/mL	E.Coli μg/mL
	FLEROXACIN	0,7	0,2	0,2	0,1
AK200	[Cu(FLERO)2(H2O)]	0,4	0,4	0,4	0,2
AK217	[Cu(FLERO)(bipy)Cl]	0,4	0,2	0,3	0,1
AK202	[Cu(FLERO)(bipyam)Cl]	2,8	-	-	0,8
AK203Γ	[Cu(FLERO)(phen)Cl]	0,5	0,5	0,5	0,4
AK204	[Co(FLERO)2(MeOH)2]	0,8	0,2	0,3	0,3
AK205A	[Co(FLERO)2(bipy)]	0,9	0,4	0,5	-
AK206A	[Co(FLERO)2(bipyam)]	0,9	0,4	0,5	-
AK207B	[Co(FLERO)2(phen)]	0,9	0,4	0,4	-
AK208A	[Ni(FLERO)2(MeOH)2]	1,0	0,2	0,2	0,2   0,3

AK210A	[Ni(FLERO)2(bipyam)]	2,0	0,4	0,4	0,4	0,5
AK211B	[Ni(FLERO)2(phen)]	1,1	0,3	0,4	0,3	0,3
AK212	[Mn(FLERO)2(MeOH)2]	0,9	0,2	0,2	0,2	0,3
AK222B	[Mn(FLERO)2(bipyam)]	-	1,0	1,0	-	-
AK215B	[Mn(FLERO)2(phen)]	1,2	0,5	0,4	0,2	0,3
AK228A	[Zn(FLERO)2(MeOH)2]	1,5	0,4	0,4	0,2	0,2
AK229	[Zn(FLERO)2(bipy)]	0,9	0,5	0,4	0,2	0,2
AK230A	[Zn(FLERO)2(bipyam)]	0,9	0,4	0,3	0,2	0,2
AK231A	[Zn(FLERO)2(phen)]	0,9	0,5	0,4	0,2	0,2

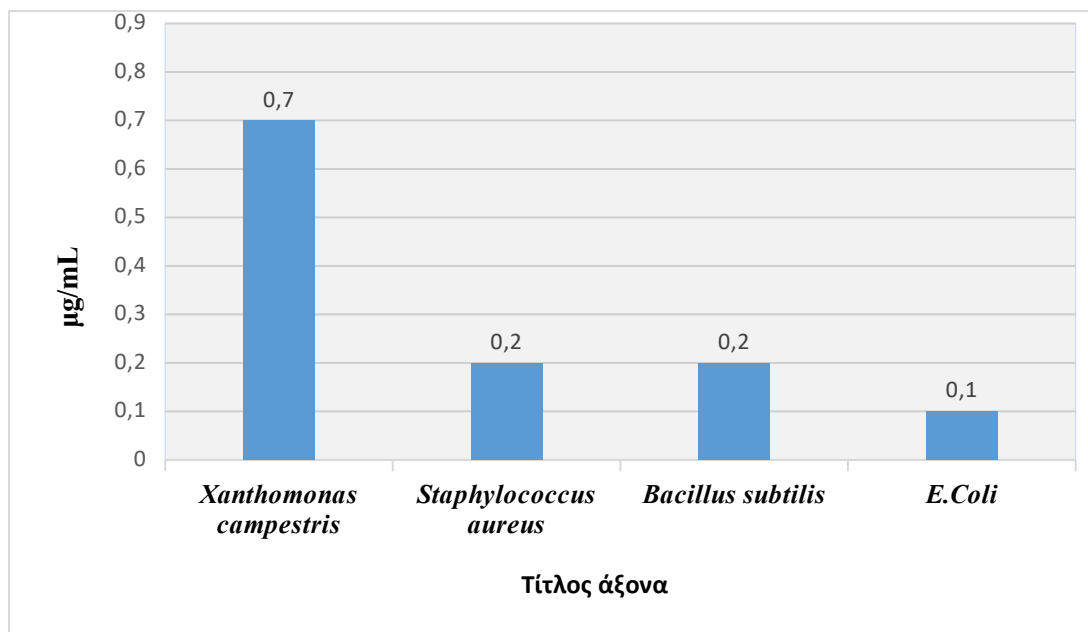
### 3.1. MIC FLEROXACIN



### Διάγραμμα 1: MIC Fleroxacin

Το Fleroxacin ανήκει στις κινολόνες και είναι αρκετά δραστικό ενάντια σε Gram-θετικά αλλά και Gram-αρνητικά βακτήρια. Στο διάγραμμα διακρίνουμε πως το Fleroxacin είναι πολύ δραστικό (MIC: 0,200 µg/mL) στα στελέχη της *E.Coli* που είναι Gram-αρνητικό βακτήριο. Στο στέλεχος *Bacillus subtilis* (Gram-θετικό) είναι λιγότερο δραστικό με πολύ μικρή διαφορά (MIC: 0,400 µg/mL). Στα στελέχη *Xanthomonas campestris* και *Staphylococcus aureus* έδειξε τη μικρότερη δραστικότητα με MIC: 0.800 µg/mL.

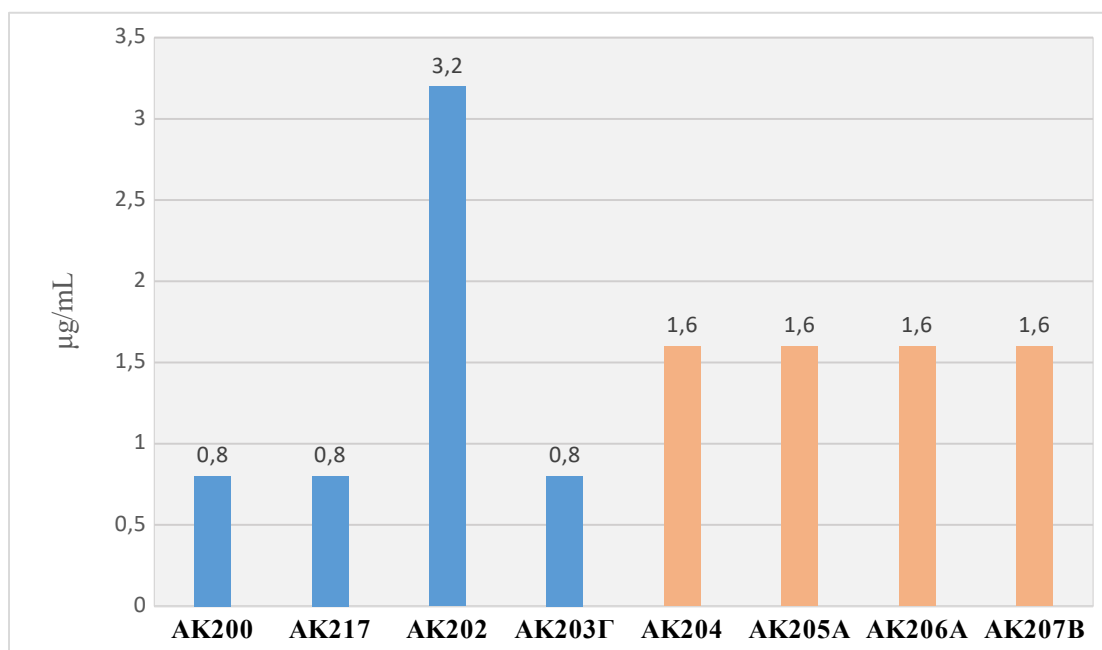
### IC50 FLEROXACIN



## Διάγραμμα 2: IC50 Fleroxacin

Στο διάγραμμα παρατηρούμε την μέση μέγιστη ανασταλτική δράση του Fleroxacin. Σύμφωνα με το FDA, η IC50 αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση ενός φαρμάκου που απαιτείται για 50% αναστολή in vitro. Φαίνεται πως το Fleroxacin είναι πολύ δραστικό στα στελέχη της *Escherichia coli*, με μικρή διαφορά ακολουθούν τα στελέχη *Staphylococcus aureus* και *Bacillus subtilis*. Λιγότερο δραστικό φαίνεται να είναι στο στέλεχος της *Xanthomonas campestris*.

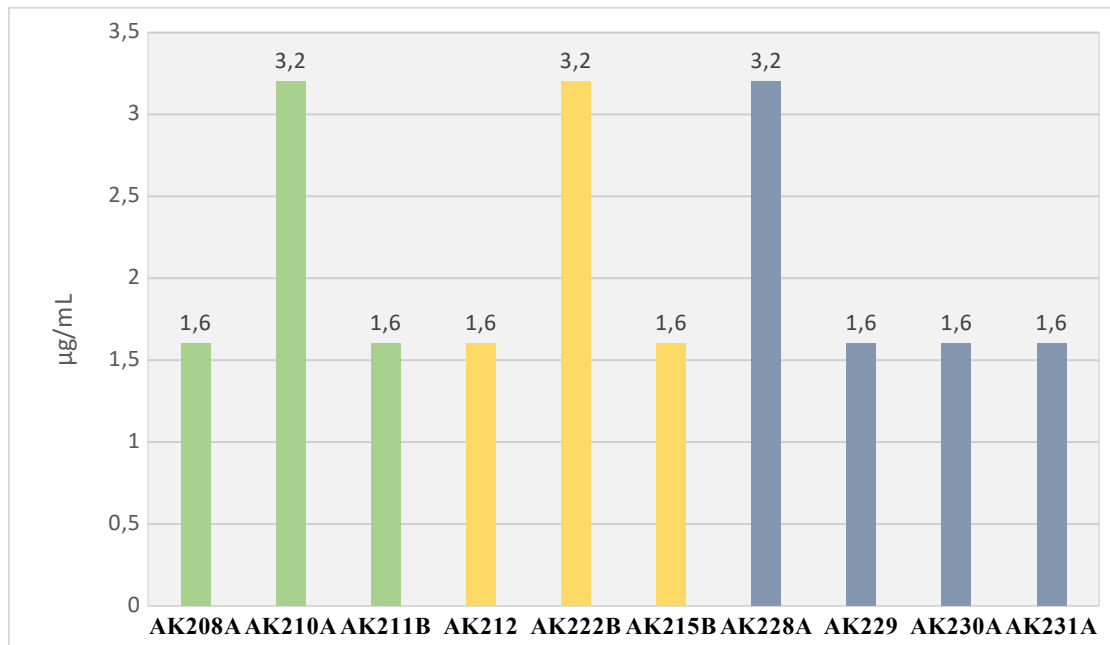
### 3.1.1. MIC *Xanthomonas campestris*



## Διάγραμμα 3: MIC *X. Campestris*

Στο διάγραμμα παρατηρούμε τα MICs των ενώσεων συναρμογής με το Fleroxacin. Οι ενώσεις με το χαλκό παρουσιάζουν την ίδια αντιμικροβιακή δράση απέναντι στη *Xanthomonas campestris* εκτός από το AK202 ([Cu(FLEO)(bipyam)Cl] ) το οποίο παρουσιάζει μικρότερη δραστικότητα απέναντι στο βακτήριο. Όλες οι ενώσεις με το κοβάλτιο παρουσιάζουν μειωμένη αντιμικροβιακή δράση στο Fleroxacin.

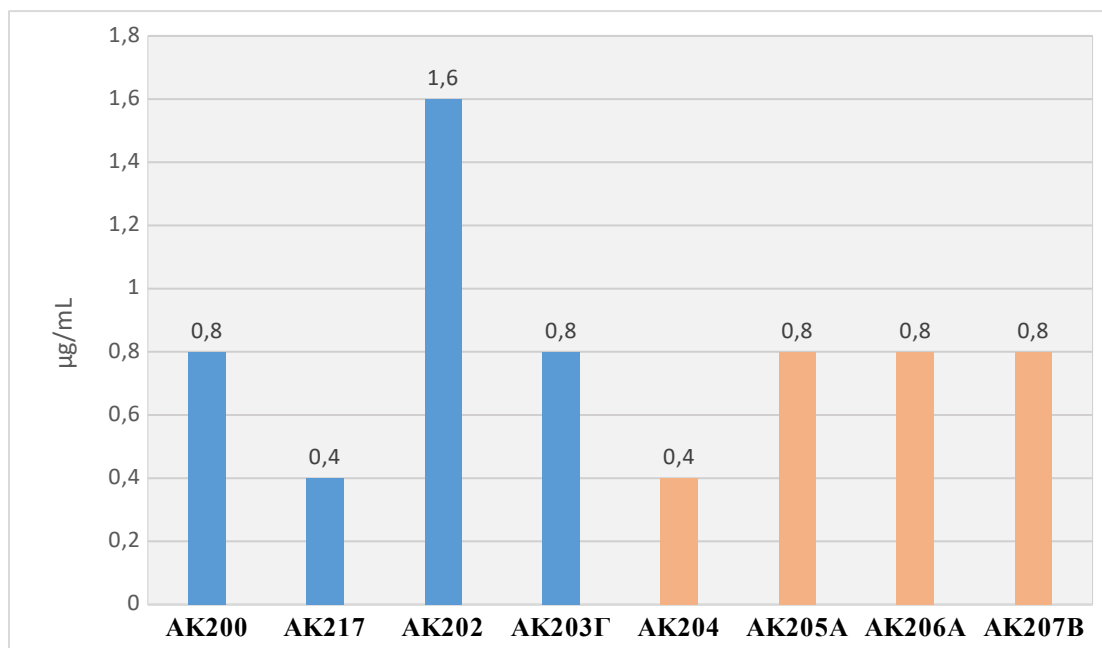




**Διάγραμμα 4:** MIC *X. Campestris*

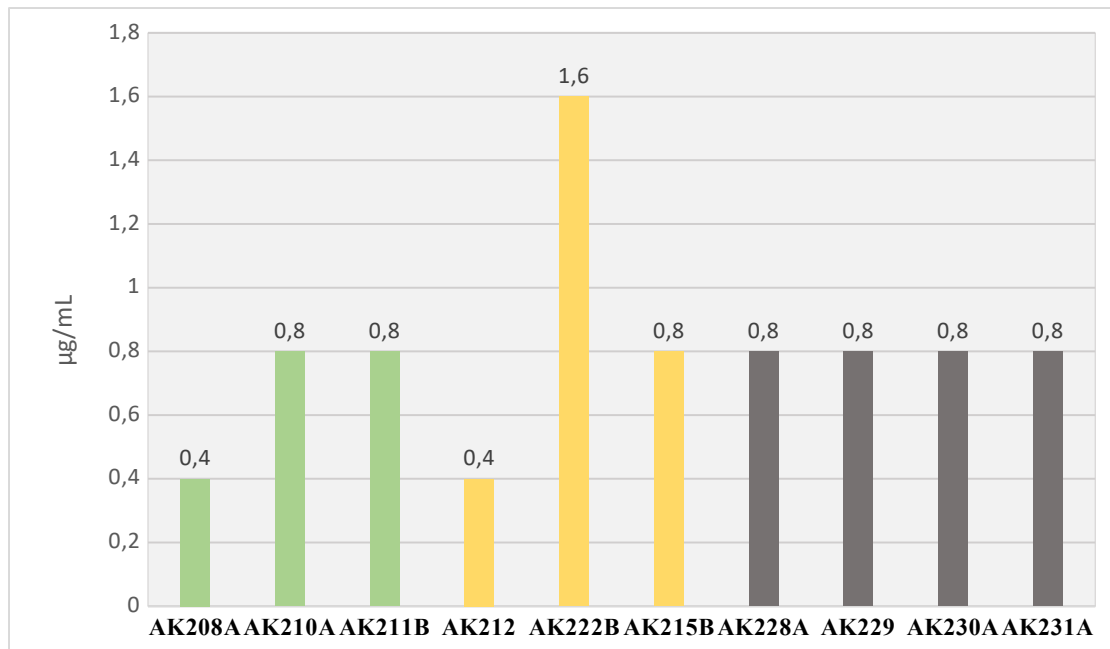
Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε πως οι ενώσεις με το νικέλιο είναι επίσης λιγότερο δραστικές με διαφορά το AK210A ( $[\text{Ni}(\text{FLERO})_2(\text{bipyam})]$ ) που είναι ακόμα λιγότερο δραστικό. Την ίδια χαμηλή δραστικότητα έχουν και οι ενώσεις με το μαγγάνιο από τις οποίες το AK222B ( $[\text{Mn}(\text{FLERO})_2(\text{bipyam})]$ ) είναι το λιγότερο δραστικό. Τέλος οι ενώσεις συναρμογής με το ψευδάργυρο είναι και αυτές πιο χαμηλά σε δραστικότητα με το λιγότερο δραστικό να είναι το AK228A ( $[\text{Zn}(\text{FLERO})_2(\text{MeOH})_2]$ ).

### 3.1.2. MIC *Staphylococcus aureus*



**Διάγραμμα 5:** MIC *Staphylococcus aureus*

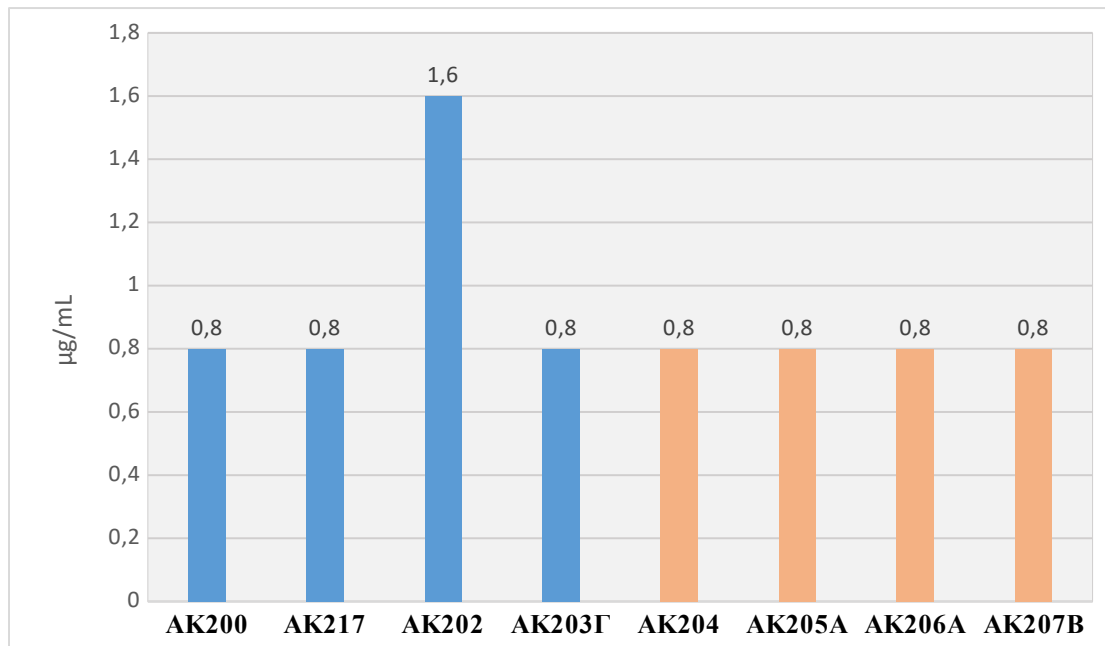
Στο διάγραμμα παρατηρούμε πως εκτός απο την ένωση AK217 με το χαλκό και την AK204 με το κοβάλτιο που παρουσιάζουν ίδια αντιμικροβιακή δράση, όλες οι υπόλοιπες ενώσεις συναρμογής έχουν επιφέρει μείωση στην δραστικότητα του Fleroxacin.



**Διάγραμμα 6:** MIC *Staphylococcus aureus*

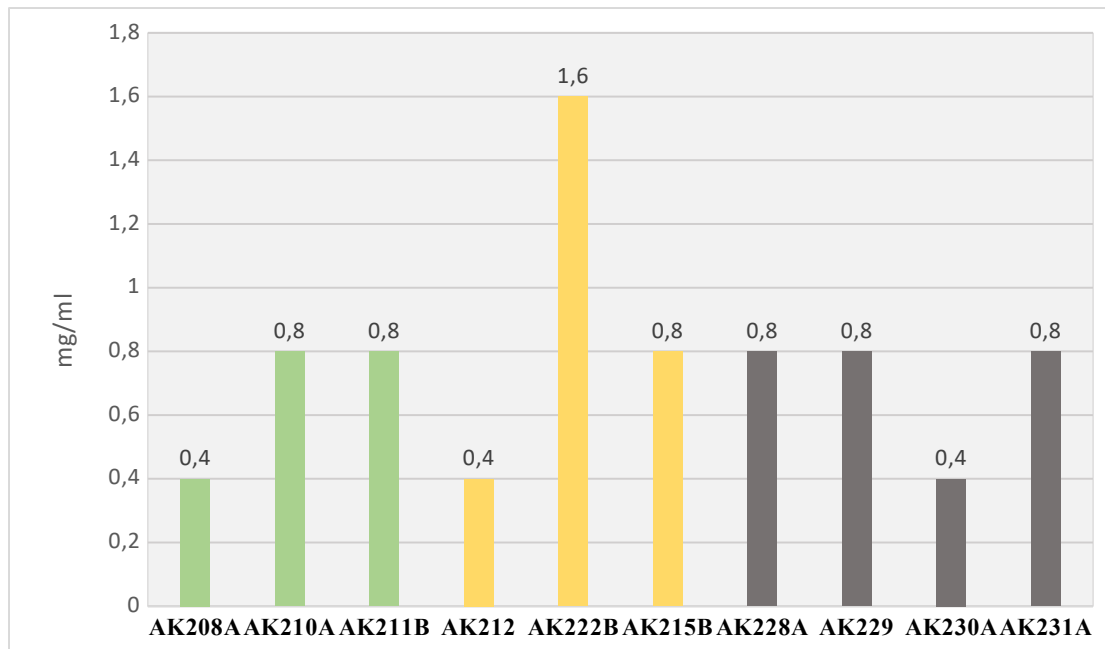
Στο παραπάνω διάγραμμα και στις ενώσεις με το νικέλιο εκτός από το AK208A ( $[\text{Ni}(\text{FLERO})_2(\text{MeOH})_2]$ ) που φαίνεται να έχει ίδια δραστηριότητα οι άλλες δύο ενώσεις συναρμογής είναι λιγότερο δραστικές. Το ίδιο συμβαίνει και στις ενώσεις με το μαγγάνιο. Το AK212 ( $[\text{Mn}(\text{FLERO})_2(\text{MeOH})_2]$ ) έχει ίδια αντιμικροβιακή δράση ενώ στις άλλες δύο ενώσεις συναρμογής έχει μειωθεί η δραστηριότητα τους. Τέλος οι ενώσεις με το ψευδάργυρο δεν παρουσιάζουν βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση στο Fleroxacin.

### 3.1.3. MIC *Bacillus subtilis*



Διάγραμμα 7: MIC *Bacillus subtilis*

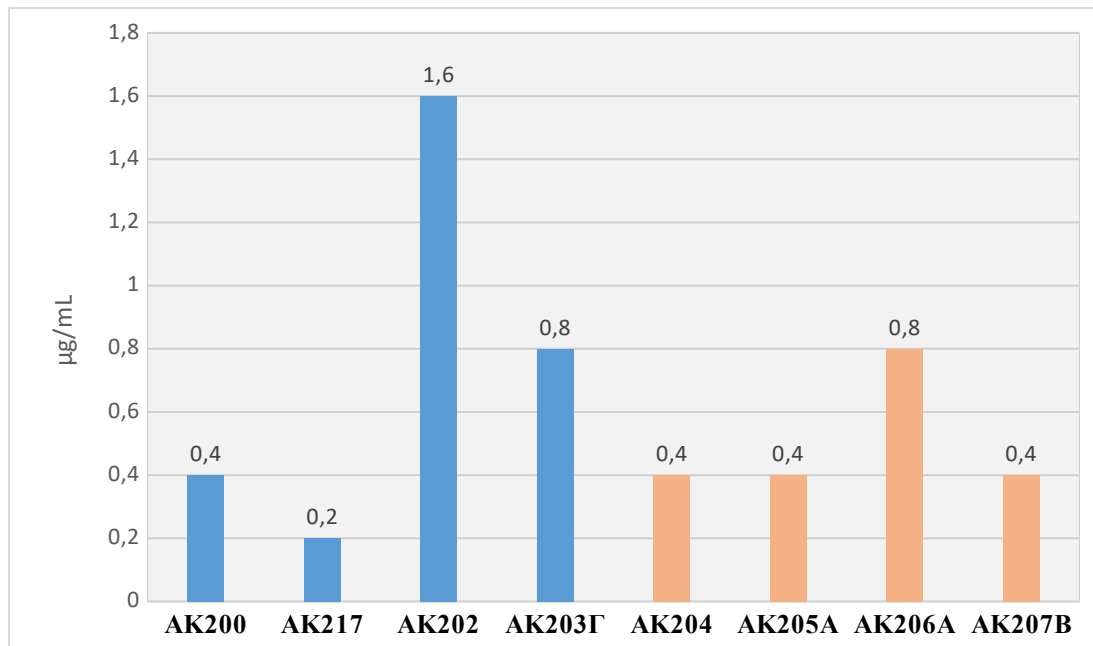
Στο διάγραμμα παραπάνω φαίνεται πως καμία ένωση συναρμογής δεν έχει επιφέρει βελτίωση στην αντιμικροβιακή δράση του Fleroxacin προς το στέλεχος του *Bacillus subtilis*. Αντίθετα την έχουν μειώσει ειδικά αυτή με το χαλκό AK202.



**Διάγραμμα 8:** MIC *Bacillus subtilis*

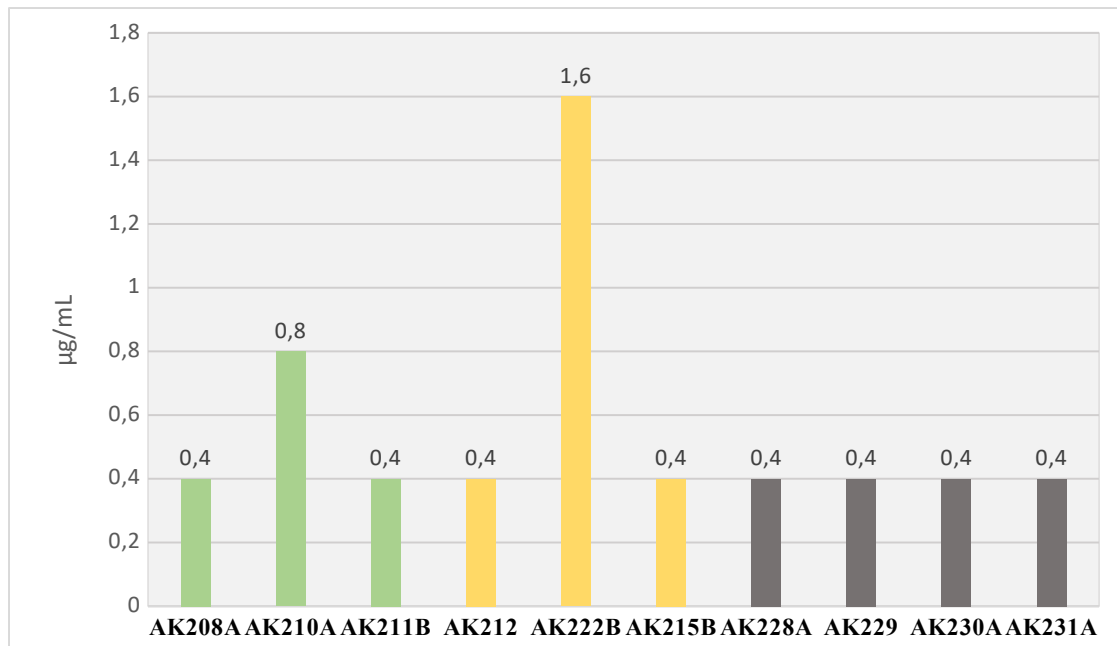
Το ίδιο φαίνεται και σε αυτό το διάγραμμα. Σε όλες τις ενώσεις συναρμογής έχει μειωθεί η αντιμικροβιακή τους δράση απέναντι στο βακτήριο εκτός από τρεις που έχει παραμείνει η ίδια αντιμικροβιακή δράση. Μία ένωση με νικέλιο (AK208A), μία με μαγγάνιο (AK212) και μία με ψευδάργυρο (AK230A).

### 3.1.4. MIC *Escherichia coli*



**Διάγραμμα 9:** MIC *Escherichia coli*

Στο διάγραμμα παρατηρούμε πως κανένας συνδυασμός μετάλλου με το Fleroxacin δεν έχει επιφέρει βελτίωση στην αντιμικροβιακή του δράση απέναντι στο στέλεχος της *E.Coli*, αντίθετα είναι λιγότερο δραστικά. Μόνο η ένωση συναρμογής με το χαλκό AK217 βρέθηκε να έχει την ίδια αντιμικροβιακή δράση με MIC: 0.200 µg/mL. Η ένωση AK202 με το χαλκό φαίνεται να έχει τη μικρότερη αντιμικροβιακή δράση με MIC: 1.600 µg/mL.



**Διάγραμμα 10:** MIC *E.Coli*

Σε αυτό το διάγραμμα επίσης παρατηρούμε πως κανένας συνδυασμός συμπλόκου με το Fleroxacin δεν έχει βελτίωση στην αντιμικροβιακή του δράση. Οι ενώσεις AK210A με το νικέλιο και το AK222B με το μαγγάνιο έχουν τη μικρότερη αντιμικροβιακή δράση με MICs: 0.800 μg/mL και 1,600 μg/mL αντίστοιχα.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το Fleroxacin ανήκει στις κινολόνες 2<sup>ης</sup> γενιάς και είναι αρκετά δραστικό σε Gram-αρνητικά βακτήρια αλλά και σε Gram-θετικά. Αυτό είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης όπου παρατηρήθηκε σημαντική αντιμικροβιακή δράση τόσο σε Gram-αρνητικό βακτήριο ( *E.Coli*) όσο και σε Gram-θετικό (*B.Subtilis*). Γενικά η συμπλοκοποίηση του Fleroxacin με μέταλλα που μελετήθηκαν δεν παρουσίασαν βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση. Συγκεκριμένα στο στέλεχος *Xanthomonas campestris* το Fleroxacin είχε τιμή MIC 0,8 µg/mL. Εκτός από τρεις ενώσεις με χαλκό όπου η δραστικότητα παρέμεινε η ίδια, στις υπόλοιπες φαίνεται να έχει μειωθεί η αντιμικροβιακή τους δράση. Το ίδιο συνέβη και στα στελέχη του *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli*.

Το αποτέλεσμα είναι πως δεν βρέθηκε καμία βελτίωση στην αντιμικροβιακή δράση του Fleroxacin με τις ενώσεις συναρμογής. Ωστόσο απαιτούνται περισσότερα στοιχεία προκειμένου να μπορεί να γίνει πλήρης αξιολόγηση και αξιοποίηση του μεγάλου όγκου δεδομένων που προκύπτουν.

Τέλος, κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας παρατηρήσαμε πως το στέλεχος της *E.Coli* δεν ήταν σταθερό ως προς τα αποτελέσματα στην μέτρηση απορρόφησης. Αυτό συνέβη διότι κατά την ανάπτυξη του σχηματίζει έλικες και συσσωματώματα τα οποία καθιζάνουν πολύ γρήγορα. Αυτό το γεγονός εκτός του ότι δεν μας επέτρεπε να πάρουμε σωστή ποσότητα με την πιπέτα των 100 µL δεν μας έδινε και αξιόπιστα αποτελέσματα στις απορροφήσεις. Καταλήξαμε πως το καλύτερο δυνατόν που μπορεί να γίνει είναι να παρθεί η απαιτούμενη ποσότητα με πιπέτα του 1 mL και να γίνει η διαδικασία μέτρησης της απορρόφησης όσο το δυνατόν γρηγορότερα ώστε να μην προλάβουν οι έλικες που σχηματίστηκαν να καθιζάνουν.



## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Andrews M. Jennifer**, Determination of minimum inhibitory concentration, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2001) 48, Suppl. S1, 5-16, p.5.
- **Asahina Y, Iwase K, Iinuma F, Hosaka M, Ishizaki T.** "Synthesis and antibacterial activity of 1-(2-fluorovinyl)-7-substituted-4-quinolone-3-carboxylic acid derivatives, conformationally restricted analogues of fleroxacin". *Journal of Medicinal Chemistry*. **48** (9): 3194–202. (May 2005)
- **Barrere, G.C., C.E. Barber, and M.J. Daniels**, Intl. J. Biological Macromolecules, 8(6): 372-374, 1986.
- **Federico Katzen, Diego U. Ferreiro, Cristian G. Oddo, M. Veronica, Ielmini, Anke Becker, Alfred Puhler and Luis Ielpi**, Xanthomonas campestris pv. Campestris gum Mutants: Effects on Xanthan Biosynthesis and Plant Virulence, *Journal of Bacteriology*, April 1998 vol. 180 no.7 1607-1617.
- **Hooper, D.C.**, Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones, *Clin. Infect. Dis.* **2000**, 31, S24-S28.
- [Http://www.chemicool.com/definition/ligand.html](http://www.chemicool.com/definition/ligand.html)
- **Imran, M., Iqbal, J., Iqbal S., Ijaz N.**, In Vitro antibacterial studies of ciprofloxacin-imines and their complexes with Cu(II), Ni(II), Co(II), and Zn(II), *Truk.J.Biol.* **2007**, 31, 67-72.
- **IUPAC**, *Compendium of Chemical Terminology*, 2<sup>nd</sup> ed. (the "Gold Book") (1997)
- **King, D.E., Malone R., Lilley S.H.**, New classification and update on the quinolones antibiotics, *Am. Fam. Phys.* **2000**, 61,2741-1748
- **Kluytmans J, van Belcum A, Verbrugh H**, "Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks". *Clinic Microbiology Rev.* 10 (3): 505-20, July **1997**.

- **Lambert R.J.W. and Pearson J.**, Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values, *Journal of Applied Microbiology*.
- **Maxwell A.**, The molecular basis of quinolones action, *J. Antimicrob. Chemother.* **1992**, 30, 409-414.
- **Oliphant, C.M., Green, G.M.** Quinolones: A comprehensive review. *Am. Fam. Phys.* **2002**, 65, 455-464.p. 11153-1157.
- **Patel N.H., Parekh H.M., Patel M.N.**, Synthesis, physicochemical characteristics, and biocidal, activity of some transition metal mixed-ligand complexes with bidentate (NO and NN) Schiff bases. *Pharm. Chem. J.* **2007**, 41, 78-82.
- **Tumer, M., Koksall, H., Sener, M.K., Serin, S.** Antimicrobial activity studies of the binuclear metal complexes derived from tridentate Schiff base ligands, *Transit. Met. Chem.* **1999**, 24, 414-420.
- **Uivarosi Valentina**, Metal complexes of Quinolone Antibiotics and Their Applications:An Update, *Molecules* 2013, 18, 11153-11197, Volume\_88, Issue\_5, pages 784-790, May **2000**
- **Yoshida H, Nakamura M, Bogaki M, Ito H, Kojima T, Hattori H, Nakamura S.** "Mechanism of action of quinolones against *Escherichia coli* DNA gyrase". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* (**1993**) , **37** (4): 839–45.
- **Wolfson JS, Hooper DC.** "The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* (**1985**),**28** (4): 581–6.
- **[www.fda.gov](http://www.fda.gov), IC50 versus EC50**
- **Zhanel, G.G., Walkty, A.: Vercaigne, L., Karlowsky, J.A., Embil, J., Gin, A.S., Hoban , D.J.**, The new fluoroquinolones: A critical review. *Can. J. Infect. Dis.* **1999**, 10, 207-238.