

ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΟΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ & ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ



“Μεταβολή της αντιμικροβιακής δράσης αντιβιοτικών, κατά
το σχηματισμό ενώσεων συναρμογής”

Δήμου Φωτεινή
Κωνσταντοπούλου Σοφία

Εισηγητής: κ. Καλογιάννης Σταύρος

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2019

“Μεταβολή της αντιμικροβιακής δράσης αντιβιοτικών, κατά το σχηματισμό ενώσεων συναρμογής”

Δήμου Φωτεινή
Κωνσταντοπούλου Σοφία

Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά τον κ. Σταύρο Καλογιάννη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Επιστημών Διατροφής και Διαιτολογίας του Δι.ΠΑ.Ε, εισηγητή και επιβλέποντα της διπλωματικής μας διατριβής, για τη συνεχή παρουσία και καθοδήγησή του, καθ' όλη τη διάρκεια, τόσο της πειραματικής διαδικασίας όσο και της συγγραφής της.

Επίσης, ευχαριστούμε τον κ. Γεώργιο Ψωμά, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Α.Π.Θ, για την χορηγία των ενώσεων συναρμογής, χωρίς τις οποίες, η παρούσα μελέτη δε θα ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί.

Περίληψη

Η εμφάνιση ανθεκτικών βακτηρίων βρέθηκε ότι μειώνει την αποτελεσματικότητα των αντιμικροβιακών θεραπειών με τα σημερινά αντιβιοτικά, αυξάνοντας έτσι την ανάγκη για πιο αποτελεσματικά φάρμακα για τη θεραπεία λοιμώξεων. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει αύξηση της αντιμικροβιακής δραστηριότητας μετά από την αλληλεπίδραση αρκετών ενώσεων με μεταλλικά ιόντα (Santos A.F., 2014).

Σκοπός της παρούσας έρευνας, είναι η μελέτη της μεταβολής της αντιμικροβιακής δράσης αντιβιοτικών ουσιών, κατά το σχηματισμό ενώσεων συναρμογής. Για το λόγο αυτό, εξετάστηκε η αντιμικροβιακή δράση τριών αντιβιοτικών ουσιών και των συμπλόκων τους με διάφορα μέταλλα, έναντι τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων, των *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* και της *Xanthomonas campestris*. Τα αντιβιοτικά που εξετάστηκαν είναι το ναλιδιξικό οξύ, η μαρβοφλοξασίνη και το σαλικυλικό οξύ.

Τα ligands του σαλικυλικού και του ναλιδιξικού οξέος, εμφανίζουν μέτρια δραστηριότητα έναντι των τεσσάρων βακτηρίων, καθώς παρουσιάζουν τιμές MIC > 50 µg/mL. Τα σύμπλοκά τους, έδωσαν παρόμοιες ή μεγαλύτερες τιμές MIC > 50 µg/mL, έναντι όλων των δοκιμασμένων βακτηρίων σε σχέση με τις ελεύθερες αντιβιοτικές ουσίες. Τέλος το ligand της μαρβοφλοξασίνης και τα σύμπλοκά της, είναι περισσότερο δραστικά έναντι των τεσσάρων βακτηρίων, σε σχέση με τα άλλα ligands, καθώς παρουσιάζουν τιμές MIC ίσες με 0,3125 µg/mL για την μαρβοφλοξασίνη και τιμές MIC στην περιοχή 0,625 – 2,5 µg/mL για τα σύμπλοκά της. Συγκρίνοντας, τις συγκεντρώσεις εκφρασμένες σε μονάδες μοριακότητας (µM), παρατηρείται ότι οι τιμές MIC των συμπλοκών είναι ως επί το πλείστον χαμηλότερες, από τις αντίστοιχες τιμές των ελεύθερων αντιβιοτικών ουσιών. Το ίδιο όμως δεν συμβαίνει με τα σύμπλοκα της μαρβοφλοξασίνης, όπου παραμένουν να είναι ελαφρώς λιγότερο δραστικά σε σχέση με την ελεύθερη μαρβοφλοξασίνη.

Σε γενικές γραμμές, παρατηρήθηκε πως τα σύμπλοκα του ναλιδιξικού και του σαλικυλικού οξέος, παρουσιάζουν παρόμοια ή ελαφρώς καλύτερη δραστηριότητα από τις ελεύθερες αντιβιοτικές ουσίες έναντι των βακτηρίων που ελέγχθηκαν. Το αντίθετο παρατηρείται, για την ελεύθερη μαρβοφλοξασίνη και τα σύμπλοκά της. Παρόμοια ή καλύτερη δραστηριότητα, έναντι όλων των υπό εξέταση βακτηρίων, παρουσίασε το ελεύθερο αντιβιοτικό, παρά τα σύμπλοκά του.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	5
1. Εισαγωγή	8
1.1. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση, MIC	10
1.2. Μέση ανασταλτική συγκέντρωση, IC50.....	10
1.3. Σύμπλοκες ενώσεις μετάλλων (metal complexes) – Υποκαταστάτες (ligands)	10
1.3.1. Κινολόνες (Quinolones) – Φθοροκινολόνες (FQ).....	11
1.3.2. Σαλικυλικό Οξύ	15
1.3.3. Ετεροκυκλικές α-διϊμίνες	16
1.4. Βακτηριακά στελέχη	18
1.4.1. <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	18
1.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>).....	19
1.4.3. <i>Bacillus subtilis</i> (<i>B. subtilis</i>).....	21
1.4.4. <i>Xanthomonas campestris</i>	23
2. Υλικά και μέθοδοι – Μεθοδολογία	24
2.1. Δείγματα	24
2.2. Μικροβιακά στελέχη.....	25
2.3. Θρεπτικά υποστρώματα	25
2.4. Όργανα.....	26
2.5. Μέθοδος	26
3. Αποτελέσματα – Συζήτηση	30
4. Συμπεράσματα	42
5. Βιβλιογραφία	44
6. Παράρτημα	47

1. Εισαγωγή

Ετησίως, εκατομμύρια άνθρωποι πεθαίνουν λόγω λοιμώξεων που προκαλούνται από μικροοργανισμούς ανθεκτικούς στα σημερινά αντιβιοτικά. Όταν ένα αντιβιοτικό ανακαλυφθεί και διατεθεί στο εμπόριο, η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών αρχίζει να μειώνει την κλινική του χρησιμότητα μετά από μια περίοδο αδιάκριτης χρήσης, οδηγώντας σε μελλοντικό περιορισμό χρήσης. Η χρήση αντιβιοτικών με ευρύ φάσμα δράσης και χαμηλής τοξικότητας, μπορεί να μειώσει την αποτελεσματικότητα των μελλοντικών αντιμικροβιακών θεραπειών, οδηγώντας στη χρήση φαρμάκων με μεγαλύτερη εκλεκτική τοξικότητα. Επιπλέον, η περιορισμένη χρήση αντιβιοτικών μπορεί να προκαλέσει την αποτυχία της αντιμικροβιακής θεραπείας, αυξάνοντας έτσι τον ρυθμό νοσηρότητας και θνησιμότητας, μαζί με το κόστος θεραπείας.

Κατά την αναζήτηση νέων αντιμικροβιακών ουσιών, αποτελεσματικών στη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από πολυανθεκτικά βακτήρια, θα πρέπει να δοθεί η δέουσα προσοχή στη σύνθεση φαρμάκων με νέους στόχους ενεργοποίησης, καθώς και στη δυνατότητα ενεργοποίησης των ενώσεων με γνωστή αντιμικροβιακή δράση. Μια νέα στρατηγική στην παραγωγή φαρμάκων προτείνει την αλληλεπίδραση μεταλλικών ιόντων με αντιβιοτικά μέσα σε τρία πεδία έρευνας: το πρώτο με στόχο τη δημιουργία ενός αντιστρεπτού μηχανισμού μικροβιακής αντοχής, η δεύτερη που επιδιώκει να προωθήσει την ανάπτυξη νέων φαρμάκων με μηχανισμό δράσης άγνωστο στα παθογόνα βακτήρια και ένα τρίτο με στόχο τη μείωση της τοξικότητας του μεταλλικού ιόντος με τη μορφή ενός συμπλόκου.

Η αλληλεπίδραση ιόντων μετάλλων με οργανικά προσδέματα δείχνει καλύτερη αντιμικροβιακή δράση σε σύγκριση με τους ελεύθερους προσδέτες (μη συντονισμένες) και ως εκ τούτου δικαιολογεί τη διερεύνηση νέων φαρμάκων, με άγνωστο μηχανισμό δράσης κατά των παθογόνων βακτηρίων. Η χρήση αυτών των νέων ενώσεων είναι πιθανό να έχει μεγάλες δυνατότητες έναντι των παθογόνων βακτηρίων (Santos A.F., 2014).

Σκοπός της παρούσας έρευνας, είναι η μελέτη της μεταβολής της αντιμικροβιακής δράσης αντιβιοτικών ουσιών, κατά το σχηματισμό ενώσεων συναρμογής. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν τρεις αντιβιοτικές ουσίες και έγινε σύγκριση της αντιμικροβιακής τους δράσης, με διάφορα σύμπλοκά τους. Οι αντιβιοτικές ουσίες και τα αντίστοιχα σύμπλοκά τους που μελετήθηκαν, είναι το σύμπλοκο νικελίου (Ni^{2+}) με τον αντιμικροβιακό παράγοντα του ναλιδιξικού οξέος (nalidixic acid), το σύμπλοκο χαλκού (Cu^{2+}) με τον αντιμικροβιακό παράγοντα της μαρβοφλοξασίνης (marbofloxacin) και το σύμπλοκο του μαγγανίου (Mn^{2+}) με τον αντιμικροβιακό παράγοντα του σαλικυλικού οξέος (salicylic acid). Στα παραπάνω σύμπλοκα παρατηρείται απουσία ή παρουσία δοτών ατόμων οξυγόνου, όπως η μεθανόλη (MeOH), ή ατόμων αζώτου, όπως η 2,2'-διπυριδίνη (bipy), η 2,2'-διπυριδυλαμίνη (bipyam) και η 1,10-φαινανθρολίνη (phen). Η αντιμικροβιακή δράση ελέγχθηκε έναντι τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων, των *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* και της *Xanthomonas campestris*. Για την μελέτη της, έγινε προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*Minimum Inhibitory Concentration*, **MIC**) και προσδιορισμός της μέσης μέγιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*Half Maximal Inhibitory Concentration*, **IC₅₀**).

Με μια σύντομη βιβλιογραφική ανασκόπηση, γίνεται εύκολα αντιληπτό το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, πάνω στην αντιμικροβιακή δράση ενώσεων συναρμογής αντιβιοτικών ουσιών με μέταλλα, και ως εκ τούτου, για τη δημιουργία νέων φαρμάκων.

Σε έρευνά τους, οι Sheikh et. al (2012), παρατήρησαν ότι τα μεταλλικά σύμπλοκα Co, Ni και Cu με ligand σαλικυλικού οξέος, έχουν υψηλότερη δραστηριότητα σε σύγκριση με το ελεύθερο ligand, έναντι των ίδιων στελεχών βακτηρίων και μυκήτων, και συμπερασματικά αναφέρουν πως με βάση τα αποτελέσματά τους, τα μεταλλικά σύμπλοκα είναι πιο ισχυρά βακτηριοκτόνα και μυκητοκτόνα από ότι ο ελεύθερος προσδέτης.

Μελέτη του 2019, εξέτασε την αντιμικροβιακή δραστηριότητα τεσσάρων νέων συμπλόκων του ψευδαργύρου, με την κινολόνη τρίτης γενιάς γατιφλοξασίνη, έναντι των βακτηρίων *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* και

Xanthomonas campestris. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα σύμπλοκα, είχαν παρόμοια ή καλύτερη αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με την ελεύθερη γατιφλοξασίνη (Kakoulidou C., 2019). Τα ίδια αποτέλεσμα είχε και έρευνα για σύμπλοκα του χαλκού με την γατιφλοξασίνη που πραγματοποιήθηκε λίγα χρόνια νωρίτερα (Kostelidou A., 2016).

1.1. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση, MIC

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC, Minimum Inhibitory Concentration), ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση μιας αντιμικροβιακής ουσίας, η οποία θα αναστείλει την ορατή ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού μετά από επώαση 24 ωρών. Οι MICs χρησιμοποιούνται από διαγνωστικά εργαστήρια κυρίως για να επιβεβαιώσουν την αντίσταση των αντιμικροβιακών ουσιών, αλλά συχνότερα ως ερευνητικό εργαλείο για τον προσδιορισμό της *in vitro* δραστηριότητας νέων αντιμικροβιακών ουσιών (Andrews J. M., 2001).

1.2. Μέση ανασταλτική συγκέντρωση, IC₅₀

Η μέση ανασταλτική συγκέντρωση (IC₅₀, Half Inhibitory Concentration), είναι μία *in vitro* δοκιμή, που μετρά την κυτταροτοξικότητα και αντιστοιχεί στη συγκέντρωση μιας χημικής ουσίας, που αναστέλλει το 50% του κυτταρικού πληθυσμού (Dhawan A., 2018). Εκφράζεται σε μονάδες συγκέντρωσης της ουσίας στο διαλύτη της (Κυρανάς Ε., 2016)

1.3. Σύμπλοκες ενώσεις μετάλλων (metal complexes) – Υποκαταστάτες (ligands)

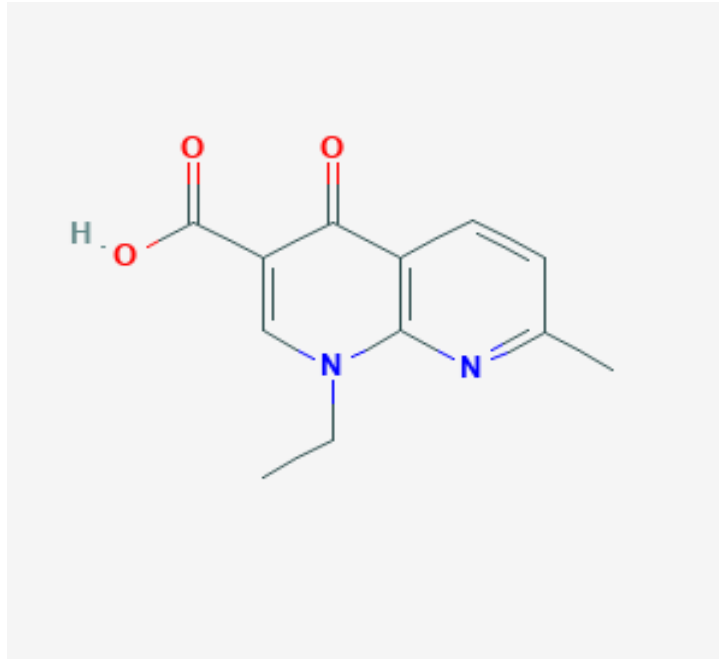
Ένα σύμπλοκο ιόν ή σύμπλοκη ένωση, αποτελείται από ένα κεντρικό μέταλλο ή κατιόν μετάλλου με το οποίο συνδέονται ορισμένα ανιόντα ή και μόρια, καλούμενα

ligands ή υποκαταστάτες. Εκτός από λίγες εξαιρέσεις, τα ελεύθερα ligands έχουν τουλάχιστον ένα ζεύγος ηλεκτρονίων που δεν συμμετέχει σε δεσμό. Τα ligands συναρμόζονται γύρω από το κεντρικό ιόν σε μία πρώτη σφαίρα συναρμογής. Ο αριθμός των ατόμων ή μορίων που είναι ενωμένα απευθείας στο μεταλλικό ιόν ή αλλιώς, ο αριθμός των ligands, καλείται αριθμός συναρμογής του κεντρικού ιόντος. Όσα ιόντα βρίσκονται μέσα στη σφαίρα συναρμογής δε διατηρούν τις ιδιότητες που είχαν πριν συναρμοσθούν. Αντίθετα, αυτά που βρίσκονται έξω από τη σφαίρα συναρμογής διατηρούν τις χημικές τους ιδιότητες. Όταν τα ligands σχηματίζουν δακτυλίους με τα κεντρικά μεταλλικά ιόντα, προκύπτουν σύμπλοκες ενώσεις που καλούνται χηλικές ενώσεις (Λάλια – Καντούρη Μ., 1995).

1.3.1. Κινολόνες (Quinolones) – Φθοροκινολόνες (FQ)

Οι κινολόνες είναι μία σειρά χημικά συγγενών βακτηριοκτόνων παραγόντων προερχόμενων από ναλιδιξικό οξύ (NA) (Εικόνα 1) (Doble A., 2007). Είναι συνθετικά αντιβακτηριακά ευρέος φάσματος, που εμποδίζουν τη σύνθεση βακτηριακού DNA, αναστέλλοντας το βακτηριακό ένζυμο DNA γυράση (Das B., 2017).

Πολλές εκατοντάδες κινολονών έχουν συντεθεί και αξιολογηθεί για αντιβιοτική δραστηριότητα. Οι πιο ισχυροί παράγοντες φέρουν έναν υποκαταστάτη φθορίου στην θέση 6 του πυρήνα της κινολόνης και αυτή η υποοικογένεια, οι φθοροκινολόνες, κυριαρχεί πλέον στην θεραπευτική πρακτική (Doble A., 2007). Οι φθοροκινολόνες δεσμεύονται στο σύμπλοκο DNA γυράσης – DNA, προκαλώντας ελαττώματα στην περιέλιξη του βακτηριακού DNA.



Εικόνα 1. Χημική δομή ναλιδιξικού οξέος

Είναι αντιβιοτικά, τα οποία έχουν πολύ καλή δραστηριότητα έναντι ενός ευρέος φάσματος αερόβιων gram αρνητικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων πολλών ειδών *Pasteurella*, μερικών θετικών κατά gram βακτηρίων και κατά του μυκοπλάσματος και χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των λοιμώξεων, οι οποίες είναι ανθεκτικές σε συμβατικές κατηγορίες αντιβιοτικών (Das B., 2017), (Tohamy M.A., 2013). Ωστόσο, το ευρείας κλίμακας φάσμα των φθοροκινολονών, θα μπορούσε να οδηγήσει στην εξάπλωση ανθεκτικών σε πολλαπλά φάρμακα στελεχών. Οι φθοροκινολόνες χρησιμοποιούνται κυρίως για τη θεραπεία της ενδονοσοκομειακής και της κοινώς μεταδιδόμενης πνευμονίας που προκαλείται από το ανθεκτικό στα φάρμακα *Streptococcus pneumoniae*. Χρησιμοποιούνται επίσης για τη θεραπεία της λοίμωξης από ουροποιητικό καθετήρα που λαμβάνεται από νοσοκομείο και της πολυνεφρίτιδας. Σε κοινώς μεταδιδόμενες λοιμώξεις, οι φθοροκινολόνες συνιστώνται όταν η θεραπεία με αντιβιοτικά αποτυγχάνει εξαιτίας της ανθεκτικότητας σε πολλαπλά φάρμακα (Das B., 2017).

Άλλα βασικά χαρακτηριστικά της δομικής τους δραστηριότητας, είναι η σπουδαιότητα των λειτουργιών σύνδεσης του 3-καρβοξυλίου και 4-καρβονυλίου με

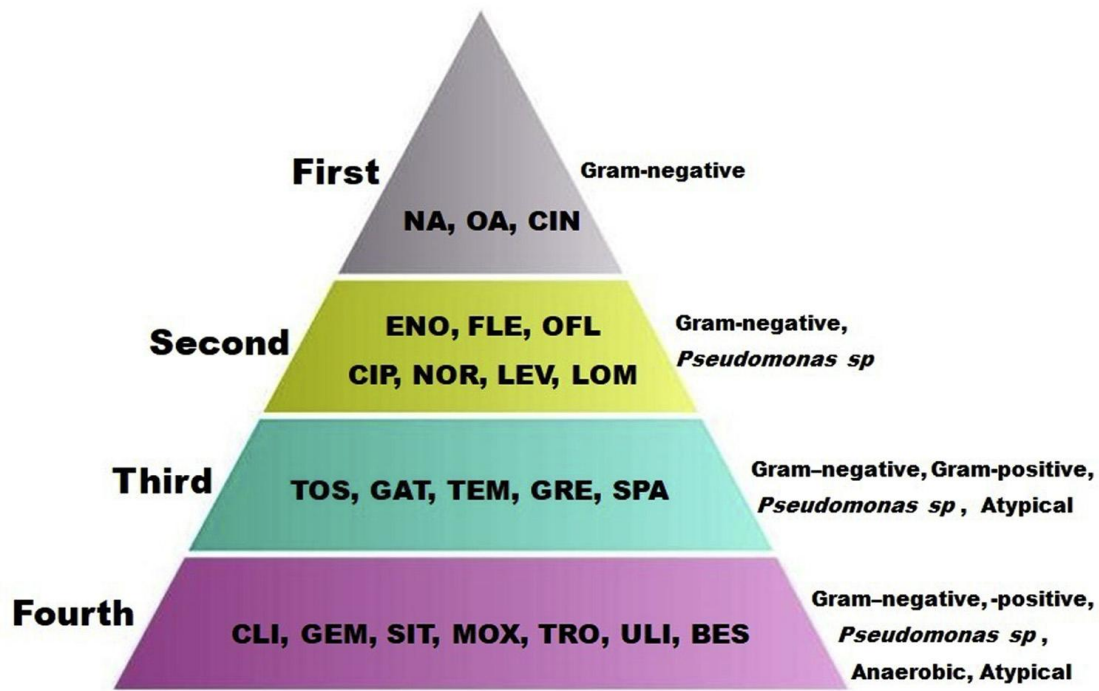
το DNA, και ενός ετεροκυκλικού υποκαταστάτη (συνήθως πιπεραζίνης) στην θέση 7, για αύξηση της ισχύος και διεύρυνση της βακτηριακής εξειδίκευσης (Doble A., 2007), οι μεγάλοι όγκοι κατανομής, η χαμηλή δέσμευση πρωτεϊνών ορού και οι σχετικά χαμηλές ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MIC) έναντι ευαίσθητων μικροοργανισμών στόχων. Οι φθοροκινολόνες είναι δραστικές έναντι βακτηριακών παθογόνων με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση (Tohamy M.A., 2013).

Η **μαρβοφλοξασίνη** (Εικόνα 2) είναι μια φθοροκινολόνη δεύτερης γενιάς, που έχει ένα μεγάλο φάσμα δραστικότητας έναντι gram θετικών, gram αρνητικών στελεχών και διαφόρων ειδών μυκοπλάσματος. Έχει κάποιες φαρμακοκινητικές ιδιότητες όπως η μακρά ημιζωή και η υψηλή βιοδιαθεσιμότητα μετά από χορήγηση από το στόμα (Tohamy M.A., 2013). Η μαρβοφλοξασίνη εγκρίνεται για χρήση σε ζώα συντροφιάς, για τη θεραπεία αναπνευστικών, ουρολογικών και δερματολογικών ασθενειών στις Ηνωμένες Πολιτείες και στην Ευρώπη, σε βοοειδή και χοίρους για τη θεραπεία αναπνευστικών, γαστρεντερικών λοιμώξεων και λοιμώξεων του μαλακού ιστού στην Ευρώπη, και για τη θεραπεία της οξείας μαστίτιδας από *Escherichia coli* στο Ηνωμένο Βασίλειο (Schneider M., 2007).



Εικόνα 2. 3D απεικόνιση χημικής δομής μαρβοφλοξασίνης

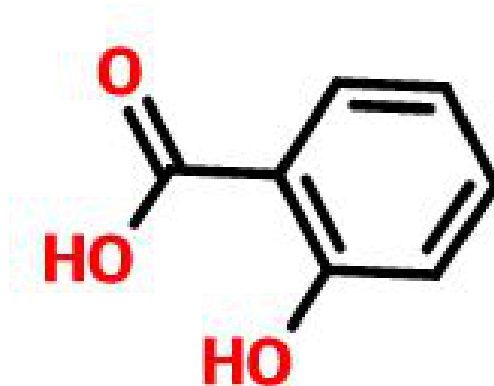
Οι κινολόνες ταξινομούνται σε τέσσερις γενιές με βάση το φαρμακοκινητικό τους προφίλ (Εικόνα 3). Οι πρώτες γενιές των κινολονών, εγκρίθηκαν για τη θεραπεία λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος (UTI) και των σεξουαλικά μεταδιδόμενων ασθενειών (STD). Λίγο μετά την απελευθέρωσή τους στην αγορά, η πρώτη γενιά κινολονών αποσύρθηκε, λόγω της περιορισμένης αποτελεσματικότητάς τους και των καρκινογόνων παρενεργειών. Ειδική ένταξη ενός ατόμου φθορίου στη θέση C-6 και κυκλικής διαμινο-πιπεραζίνης στη θέση C-7, οδήγησε στο σχηματισμό των σημερινών FQs που έχουν σημαντική αποτελεσματικότητα έναντι gram αρνητικών, gram θετικών και αναερόβιων βακτηριδίων. Αργότερα στη δεκαετία του '90, διευκρινίστηκε ότι η παρουσία πιπεραζίνης στη θέση C-7 μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία τοξικών FQs όπως η τροβαφλοξασίνη. Λόγω της έντονης ηπατοτοξικότητάς της και της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας από το στόμα, η τροβαφλοξασίνη αποσύρθηκε επίσης από την αγορά. Η αποτυχία της τροβαφλοξασίνης οδήγησε στην ανάπτυξη τρίτης και τέταρτης γενιάς FQs, η οποία περιέχει μεθοξυομάδα στη θέση C-8 και είναι επί του παρόντος εγκεκριμένη για τη θεραπεία λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένης της θανατηφόρας πνευμονικής φυματίωσης. Καίριας σημασίας, είναι το γεγονός ότι οι FQs τέταρτης γενιάς είναι ενεργές ακόμη και έναντι πνευμονιοκόκκων ανθεκτικών στην σιπροφλοξασίνη (Yadav V., 2019).



Εικόνα 3. Ταξινόμηση των φθοροκινολονών

1.3.2. Σαλικυλικό Οξύ

Τα συγγράμματα του Έλληνα γιατρού Ιπποκράτη, αποκάλυψαν ότι τα φύλλα και οι φλοιοί της ιτιάς, χρησιμοποιούνταν ως αναλγητικά και αντιπυρετικά στην αρχαιότητα. Το ενεργό συστατικό που είναι υπεύθυνο σε αυτή τη φυσική πηγή, αργότερα αναγνωρίστηκε ως σαλικίνη και περιέχει τόσο σάκχαρο όσο και αρωματικό δακτύλιο. Αρχικά ονομάστηκε spirasure και αργότερα σαλικυλικό οξύ.



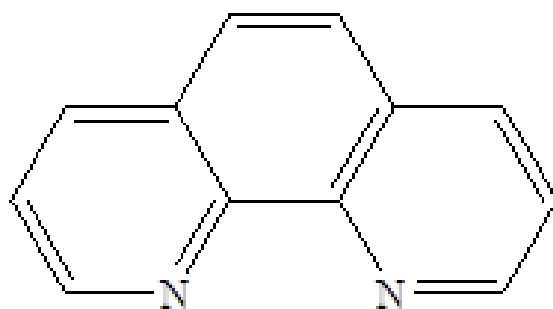
Εικόνα 4. Χημική δομή σαλικυλικού οξέος

Η de-novo σύνθεση του σαλικυλικού οξέος, διεξήχθη αρχικά το 1852 και η δομή του συνάγεται ως 2-υδροξυ βενζοϊκό οξύ. Τα παράγωγα του σαλικυλικού οξέος παρουσίασαν αντιοξειδωτικές, αντιπολλαπλασιαστικές και κυτταροτοξικές ιδιότητες. Το παράγωγο αζω-σαλικυλικού οξέος, σουλφασαλαζίνη είναι ένα εγκεκριμένο φάρμακο για τα τελευταία 40 χρόνια, το οποίο είναι αποτελεσματικό έναντι της ελκώδους κολίτιδας (φλεγμονώδης νόσος του εντέρου). Υπήρξε αύξηση των παρενεργειών λόγω του τμήματος της σουλφαπυριδίνης που δρα ως φορέας. Ο δεσμός αζώτου διασπάται, λόγω του βακτηριακού ενζύμου αζω-αναγωγή, που βρίσκεται στο σημείο του αυλού του κόλον, αφήνοντας το 5-αμινοσαλικυλικό οξύ. Η βιβλιογραφική έρευνα υποστηρίζει, ότι τα αζω-σαλικυλικά οξέα έχουν βιολογική δραστικότητα και επίσης είναι χρήσιμοι πρόδρομοι για τη σύνθεση αντικαρκινικών, αντι-ιικών, αντιμικροβιακών και ανθελονοσιακών παραγόντων. Τα σαλικυλικά έχουν αναλγητικά αποτελέσματα παρόμοια με εκείνα άλλων μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ) για την αναστολή του ενζύμου κυκλοοξυγενάση (COX). Τα ΜΣΑΦ αναστέλλουν τόσο τη δραστικότητα του COX-1 όσο και του COX-2 και συνεπώς την σύνθεση της προσταγλανδίνης και της θρομβοξάνης. Η βιβλιογραφία υποστηρίζει και επίσης υποδεικνύει ότι τα υποκατεστημένα με βρώμιο μόρια, μπορούν να δείξουν δυνητική αναλγητική δραστικότητα. Περαιτέρω, η βιβλιογραφική έρευνα φανερώνει, ότι ο πυρήνας πυραζολόνης είναι το βασικό φαρμακοφόρο και είναι υπεύθυνος για διάφορες φαρμακολογικές δραστικότητες, όπως η αναλγητική και η αντιμικροβιακή δράση. Τα N-φαίνυλο υποκατεστημένα ανθρανυλικά παράγωγα έχουν επίσης αναλγητικές, αντιρευματικές και αντιφλεγμονώδεις δραστηριότητες (Sahoo J., 2015).

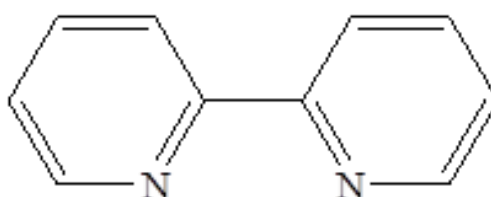
1.3.3. Ετεροκυκλικές α-διϊμίμες

Ως α-διϊμίμες ορίζονται οι ενώσεις που αποτελούνται από δύο ή περισσότερους ετεροκυκλικούς αρωματικούς δακτυλίους, που συνδέονται μεταξύ τους δια μέσου ενός απλού δεσμού και συζυγίας, όπως π.χ. το 2,2'-διπυριδύλλιο (2,2'-bipyridyl, bipy), η ή δια μέσου συζυγιακών συστημάτων συμπυκνωμένων δακτυλίων, όπως η

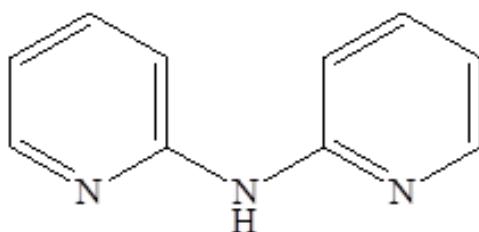
1,10-φαινανθρολίνη (1,10-phenanthroline, phen). Στην κατηγορία αυτή μπορούμε να εντάξουμε και την 2,2'-διπυριδυλαμίνη (bipyam) λόγω των κοινών ιδιοτήτων της με τις α-διμίμες (Αναστασιάδου Δ., 2011). Οι ενώσεις αυτές λαμβάνουν μέρος στη δημιουργία των ενώσεων συναρμογής που μελετήσαμε.



Εικόνα 5. 1,10-φαινανθρολίνη (phen)



Εικόνα 6. 2,2'-διπυριδύλλιο (bipy)



Εικόνα 7. 2,2'-διπυριδυλαμίνη (bipyam)

1.4. Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη είναι:

- ❖ *Escherichia coli*
- ❖ *Staphylococcus aureus*
- ❖ *Bacillus subtilis*
- ❖ *Xanthomonas campestris*

1.4.1. *Escherichia coli* (*E. coli*)

Η *Escherichia coli* (*E. coli*) είναι ένα gram αρνητικό, ραβδόμορφο, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο (κολοβακτηρίδιο), το οποίο απαντάται συνήθως στο κατώτερο τμήμα του εντέρου των θερμόαιμων οργανισμών. Αυτός ο μικροοργανισμός περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Theodor Escherich το 1885. Τα βακτήρια *E. coli* ζουν κανονικά στα έντερα των ανθρώπων και των ζώων. Τα περισσότερα, αποικοδομούν αβλαβώς τον γαστρεντερικό σωλήνα των ανθρώπων και των ζώων ως φυσιολογική χλωρίδα, και στην πραγματικότητα αποτελούν σημαντικό μέρος μιας υγιούς εντερικής οδού. Ωστόσο, υπάρχουν μερικά στελέχη που έχουν εξελιχθεί σε παθογόνα *E. coli*, με την απόκτηση παραγόντων μολυσματικότητας μέσω πλασμιδίων, τρανσποζονίων, βακτηριοφάγων κ.α. Αυτά τα παθογόνα στελέχη, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση ορομάδες, μηχανισμούς παθογονικότητας, κλινικά συμπτώματα ή λοιμογόνους παράγοντες και μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια, εντός ή εκτός εντερικού σωλήνα. Μεταξύ αυτών, τα εντεροαιμορραγικά *E. coli* (EHEC) ορίζονται ως παθογόνα στελέχη *E. coli* που παράγουν τοξίνες Shiga (Stxs) και προκαλούν αιμορραγική κολίτιδα (HC), και το απειλητικό για τη ζωή των ανθρώπων, αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS). Οι τύποι των *E. coli* που μπορεί να προκαλέσουν διάρροια μπορούν να μεταδοθούν μέσω μολυσμένου νερού ή τροφής ή μέσω επαφής με ζώα ή άτομα. Η *E. coli* O157:H7 είναι ο πιο συχνά απομονωμένος ορότυπος του EHEC από άρρωστους ανθρώπους στις Ηνωμένες Πολιτείες, την Ιαπωνία και το Ηνωμένο Βασίλειο (Lim J.Y., 2010) (CDC).

Τα παθογόνα στελέχη *E. coli* κατηγοριοποιούνται σε παθοτυπίες. Έξι τύποι παθοτυπίας συνδέονται με τη διάρροια και συλλογικά αναφέρονται ως διαγρεατικά *E. coli*.

◆ *E. coli* που παράγει Shiga τοξίνη (STEC). Αναφέρεται επίσης ως *E. coli* που παράγει βεροκυτοτοξίνες (VTEC) ή εντεροαιμορραγικό *E. coli* (EHEC).

◆ Εντεροτοξικό *E. coli* (ETEC)

◆ Εντεροπαθογόνο *E. coli* (EPEC)

◆ Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)

◆ Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

◆ Διαφορετικά προσκολλημένο *E. coli* (DAEC) (CDC)



Εικόνα 8. Έγχρωμη ηλεκτρονική μικρογραφία σαρώσεως του *Escherichia coli*, ανεπτυγμένη σε καλλιέργεια

1.4.2 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

Ο *Staphylococcus aureus* είναι ένα gram θετικό, στρογγυλού σχήματος βακτήριο, συνηθισμένο μέλος της μικροχλωρίδας του σώματος, και βρίσκεται συχνά στο άνω

αναπνευστικό σύστημα και στο δέρμα. Είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, που μπορεί να αναπτυχθεί χωρίς την παρουσία του οξυγόνου.



Εικόνα 9. Staphylococcus aureus

Οι σταφυλόκοκκοι μπορούν να προκαλέσουν πολλές μορφές μόλυνσης. Ο *S. aureus* προκαλεί επιφανειακές βλάβες του δέρματος όπως πυώδη εξανθήματα, στίγματα, φουσκάλες, εκζέματα προσώπου κ.α., καθώς και τοπικά αποστήματα σε άλλες περιοχές. Είναι υπεύθυνος ακόμα και για πιο σοβαρές λοιμώξεις του δέρματος, όπως η φουρουλκίαση. Μπορεί επίσης να προκαλέσει πιο σοβαρές λοιμώξεις, ιδιαίτερα σε άτομα που είναι εξασθενημένα από χρόνιες ασθένειες, τραυματικές βλάβες, εγκαύματα ή ανοσοκαταστολή. Αυτές οι μολύνσεις περιλαμβάνουν πνευμονία, βαθιά αποστήματα, οστεομυελίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, φλεβίτιδα, μαστίτιδα και μηνιγγίτιδα και συχνά σχετίζονται με νοσηλευόμενους ασθενείς παρά με υγιή άτομα στην κοινότητα. Ο *S. aureus* είναι η κύρια αιτία της νοσοκομειακής μόλυνσης των χειρουργικών τραυμάτων, και με το *S. epidermidis*, είναι συνηθισμένες αιτίες λοιμώξεων που σχετίζονται με εγκατεστημένες ιατρικές συσκευές και βοηθήματα, όπως προσθετικά αρθρώσεων, καρδιαγγειακές συσκευές και τεχνητές βαλβίδες καρδιάς. Είναι υπεύθυνος για δηλητηριάσεις από τα τρόφιμα, αφού απελευθερώνει εντεροτοξίνες σε αυτά και τέλος προκαλεί το σύνδρομο του τοξικού σοκ με απελευθέρωση υπεραντιγόνων στη ροή του αίματος (Foster T., 1996). Ο *S. aureus* αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 7°C έως 48°C, ενώ

παράγει εντεροτοξίνη σε θερμοκρασίες από 10°C έως 46°C, με άριστη θερμοκρασία παραγωγής να κυμαίνεται μεταξύ 40°C και 45°C. (Κοτζεκίδου-Ρουκά Π., 2004).

Η πολλαπλή αντίσταση στα αντιβιοτικά είναι όλο και συχνότερη όσον αφορά στον *S. aureus*, αλλά και σε άλλα είδη σταφυλοκόκκων. Η αντοχή στη μεθεικιλλίνη είναι ενδεικτική της πολλαπλής αντίστασης. Ο ανθεκτικός στη μεθεικιλλίνη *S. aureus* (MRSA) προκαλεί εστίες στα νοσοκομεία και μπορεί να είναι επιδημιακός (Foster T., 1996).

1.4.3. *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*)

Ο *Bacillus subtilis*, γνωστός και ως βακίλλος του χόρτου, είναι ένα θετικό κατά Gram βακτήριο, που βρίσκεται στο έδαφος και στο γαστρεντερικό σωλήνα των μηρυκαστικών και των ανθρώπων. Είναι ραβδόμορφος, και μπορεί να σχηματίσει ένα σκληρό, προστατευτικό ενδοσπόριο, που του επιτρέπει να ανέχεται ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Υπήρχε μια μακροχρόνια πεποίθηση ότι ο *Bacillus subtilis* είναι ένα αυστηρά αερόβιο βακτήριο. Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει ότι μπορεί να αναπτυχθεί αναερόβια, είτε με χρήση νιτρικού ή νιτρώδους άλατος ως τελικού αποδέκτη ηλεκτρονίων, είτε με ζύμωση. Τα δεδομένα αυτά τον κατατάσσουν στην κατηγορία των προαιρετικά αναερόβιων βακτηρίων (Nakano M.M., 1998). Θεωρείται το καλύτερα μελετώμενο gram θετικό βακτήριο, και ένας πρότυπος οργανισμός για τη μελέτη της αντιγραφής του βακτηριδιακού χρωμοσώματος και της κυτταρικής διαφοροποίησης. Ο *B. subtilis* και η *E. coli* K-12 είναι και τα δύο καλώς χαρακτηρισμένα βακτήρια μοντέλα, και χρησιμοποιούνται ως ξενιστές για πληθώρα βιοτεχνολογικών εφαρμογών (Juhas M., 2014).



Εικόνα 10. Bacillus Subtilis

Ο *B. subtilis* είναι πανταχού παρών στο περιβάλλον και μπορεί να απομονωθεί από το νερό, το έδαφος, τον αέρα και την αποσύνθεση των φυτών. Πιθανότατα ως έμμεσο αποτέλεσμα της κατανάλωσης φυτικής ύλης, πολυάριθμα είδη *Bacillus* έχουν επίσης βρεθεί στο γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων. Τα είδη αυτά είναι σημαντική πηγή ενζύμων που χρησιμοποιούνται για τρόφιμα, ζωοτροφές και άλλες βιομηχανικές εφαρμογές, και πολλά στελέχη έχουν διατεθεί στο εμπόριο ως προβιοτικά συμπληρώματα για κατανάλωση από τον άνθρωπο, στην Ασία, την Ευρώπη και τις ΗΠΑ. Ο *B. subtilis* είναι μέσα σε αυτά τα στελέχη, καθώς τα σπόριά του, δρουν ως προβιοτικά. Φαίνεται ότι ασκεί επωφελείς προβιοτικές επιδράσεις, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής αντιμικροβιακών, της διέγερσης του ανοσοποιητικού συστήματος και της γενικής ενίσχυσης της μικροχλωρίδας του εντέρου. Μέλη του *B. subtilis* έχουν επίσης καθιερωμένο ιστορικό χρήσης στην παρασκευή αρκετών παραδοσιακών ζυμωμένων τροφίμων, που έχουν μακρά ιστορία κατανάλωσης στη Νοτιοανατολική Ασία και την Αφρική και η κατανάλωση αυτών των τροφών πιστεύεται ότι συνδέεται με πολλά οφέλη για την υγεία, όπως ανοσία, μειωμένη απώλεια οστικής μάζας σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες καθώς και αντιαλλεργικές επιδράσεις (Lefevre M., 2017).

1.4.4. *Xanthomonas campestris*

Η *Xanthomonas campestris* είναι αερόβιο, αρνητικό κατά gram, ραβδόμορφο βακτήριο, το οποίο είναι γνωστό για την πρόκληση της μαύρης σήψης στα λαχανικά του γένους brassica, όπως το κουνουπίδι, το λάχανο, το kale, το μπρόκολο, τα λαχανάκια Βρυξελλών, το γογγύλι, τα φυτά μουστάρδας κ.α., σκουραίνοντας τους αγγειακούς τους ιστούς. Αξίζει να σημειωθεί πως η μαύρη σήψη, θεωρείται η σημαντικότερη και πιο καταστροφική ασθένεια των σταυρανθών, που μολύνει όλες τις καλλιεργούμενες ποικιλίες brassica παγκοσμίως (Vicente J.G., 2013). Η *X. campestris* είναι μεσόφιλο βακτήριο, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, τους 25-30°C, ενώ είναι ανενεργό σε θερμοκρασίες κάτω από 10°C.

Η *X. Campestris* ευθύνεται για την παραγωγή της ξανθάνης (ή ξανθανικό κόμμα ή κόμμα ξανθάνης). Πρόκειται για έναν πολυσακχαρίτη, ο οποίος αποτελείται από μονάδες επανάληψης πεντασακχαριτών, που περιλαμβάνουν γλυκόζη, μαννόζη και γλυκουρονικό οξύ σε μοριακή αναλογία, και χρησιμοποιείται εκτενώς, ως σταθεροποιητής, πηκτικό μέσο και γαλακτωματοποιητής τόσο στη μαγειρική, όσο και σε φαρμακευτικές βιομηχανίες και βιομηχανίες καλλυντικών (Kulkarni V.S., 2016) (Kariduraganavar M.Y., 2014).



Εικόνα 11. Μαύρη σήψη σταυρανθών από *Xanthomonas campestris*

2. Υλικά και μέθοδοι – Μεθοδολογία

2.1. Δείγματα

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν, οι αντιβιοτικές ουσίες και τα σύμπλοκά τους, ήταν χορηγία του κ. Γεώργιου Ψωμά, καθηγητή του τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, και παρατίθενται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Οι αντιβιοτικές ουσίες και τα σύμπλοκά τους που μελετήθηκαν.

Αντιβιοτική Ουσία (ligand)		Σύμπλοκο (Compound)
Όνομασία	Χημικός τύπος	Χημικός τύπος
5-μέθυλο-σαλικυλαλδεΰδη	5-CH ₃ -salOH	Mn(5-CH ₃ -salO) ₂ (MeOH) ₂
5-βρωμο-σαλικυλαλδεΰδη	5-Br-salOH	[Mn(5-Br-salO) ₂ (MeOH) ₂]
		[Mn(5-Br-salO) ₂ (bipyam)]
5-χλωρο-σαλικυλαλδεΰδη	5-Cl-salOH	[Mn(5-Cl-salO) ₂ (bipyam)]
		[Mn(5-Cl-salO) ₂ (MeOH) ₂]
4-μέθοξυ-σαλικυλαλδεΰδη	4-OMe-salOH	[Mn(4-OMe-salO) ₂ (bipy)]
		[Mn(4-OMe-salO) ₂ (phen)]
		[Mn(4-OMe-salO) ₂ (MeOH) ₂]
		[Mn(4-OMe-salO) ₂ (bipyam)]
4-μέθοξυ-σαλικυλαλδεΰδη	3-OMe-salOH	[Mn(3-OMe-salO) ₂ (MeOH) ₂]
Ναλιδιξικό οξύ	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	[Ni(nal) ₂ (phen)]
Μαρβοφλαξασίνη	C ₁₇ H ₁₉ FN ₄ O ₄	[Cu(marbo)(phen)Cl]
		[Cu(marbo)(bipy)Cl]
		[Cu(marbo)(bipyam)Cl]

2.2. Μικροβιακά στελέχη

Τα μικροβιακά στελέχη που μελετήθηκαν είναι τα εξής:

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

2.3. Θρεπτικά υποστρώματα

Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν και η σύστασή τους ανά 100 mL είναι τα εξής:

- *Nutrient broth*: για τους μικροοργανισμούς *S. aureus* και *B. subtilis*.
Σύσταση: Peptone 0,5 g, Meat Extract 0,3 g
- *Luria-broth*: για τον μικροοργανισμό *E. coli*.
Σύσταση: Tryptone 1 g, Yeast Extract 0,5 g, NaCl 1g
- *Yeast and Mold broth*: για τον μικροοργανισμό *X. campestris*.
Σύσταση: Yeast Extract 0,3 g, Malt Extract 0,3 g, Peptone 0,5 g, Dextrose 1 g.
- *Mueller-Hinton broth*, για την ανακαλλιέργεια όλων των προς εξέταση μικροοργανισμών.
Σύσταση: 21 g σκόνης Mueller-Hinton σε 1 L απιονισμένο νερό.

Για την παρασκευή των υγρών θρεπτικών υποστρωμάτων, αρχικά ζυγίστηκαν τα συστατικά των θρεπτικών μέσων σε ζυγαριά ακριβείας, στη συνέχεια προστέθηκαν σε ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό και το μίγμα θερμάνθηκε υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί. Έπειτα, ψύχθηκε, κατανεμήθηκε σε κωνικές φιάλες και αποστειρώθηκε. Για την παρασκευή των στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων προστέθηκε και άγαρ 2 g/100 mL.

2.4. Όργανα

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία ήταν:

- Φασματοφωτόμετρο
- Κλίβανος αποστείρωσης
- Επωαστικός κλίβανος
- Biosafety cabinet
- Vortex
- Λουτρό υπερήχων

2.5. Μέθοδος

Προσδιορισμός Ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC)

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα που έχει ένας αντιμικροβιακός παράγοντας να αναστέλλει πλήρως την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού (Andrews, 2001).

Διαδικασία

Όλες οι διεργασίες που αφορούν την διαχείριση των μικροοργανισμών, εκτελέστηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες, μέσα σε biosafety cabinet ή δίπλα σε φλόγα, καθώς τουλάχιστον 2 από τους 4 μικροοργανισμούς (*S. aureus* & *E. coli*), είναι παθογόνοι για τον άνθρωπο. Λόγω της ανάγκης επώασης των μικροοργανισμών, η πειραματική διαδικασία χωρίζεται σε 3 ημέρες.

1^η ημέρα πειραματικής διαδικασίας

Αραιώσεις

Τα προς εξέταση δείγματα, τα ligands και τα αντίστοιχα σύμπλοκα μετάλλων, ποσότητας 5 mg το κάθε ένα, διαλύθηκαν σε 5 mL διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) σε δοκιμαστικό σωλήνα, προς επίτευξη συγκέντρωσης 1000 µg/mL. Για καλύτερη

διαλυτοποίηση ορισμένων δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε αναδευτήρας vortex και λουτρό υπερήχων. Για την παρασκευή των αραιώσεων εφαρμόστηκε η διαδικασία διαδοχικών αραιώσεων σε μία σειρά από 7 erpendorfs. Από το αρχικό διάλυμα των 1000 µg/mL, μεταφέρθηκαν 750µL στο 1^ο erpendorf και προστέθηκε 750µL DMSO. Στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση με τη συσκευή vortex. Στα erpendorf με αριθμό 2 έως 7 προστέθηκε 750 µL DMSO και μεταφέρθηκε κάθε φορά 750 µL από το προηγούμενο erpendorf στο επόμενο. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2) παρουσιάζονται οι διαδοχικές αραιώσεις με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.

Πίνακας 2. Διαδοχικές αραιώσεις ligands-συμπλόκων μετάλλων και καθορισμός τελικής συγκέντρωσης.

	Αραίωση 1 ^η	Αραίωση 2 ^η	Αραίωση 3 ^η	Αραίωση 4 ^η	Αραίωση 5 ^η	Αραίωση 6 ^η	Αραίωση 7 ^η
	µg/mL						
Συγκέντρωση δείγματος 1000 µg/mL	500	250	125	62.5	31.25	15.625	7.81
Συγκέντρωση δείγματος 50 µg/mL	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39
Συγκέντρωση δείγματος 20 µg/mL	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.156

Παρασκευή προκαλλιέργειας

Σε biosafety cabinet, έπειτα από την αποστείρωση του κρίκου, λήφθηκε μικρή ποσότητα από την στερεή καλλιέργεια και μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη, η οποία περιείχε 25 mL υγρό θρεπτικό υλικό. Ο κρίκος ανακινήθηκε μέσα στη κωνική φιάλη και στη συνέχεια αφαιρέθηκε και αποστειρώθηκε. Έπειτα, η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε σε επωαστικό κλίβανο με την βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του

εκάστοτε μικροοργανισμού, υπό ανάδευση στις 200 στροφές/λεπτό για 24 ώρες. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για όλους τους μικροοργανισμούς.

2^η ημέρα πειραματικής διαδικασίας

Προετοιμασία εμβολίου

Η προκαλλιέργεια εξετάστηκε για τον βαθμό της κυτταρικής ανάπτυξης του μικροοργανισμού με φωτομέτρηση στα 600nm έπειτα από αραιώση με το αντίστοιχο θρεπτικό μέσο σε αναλογία 1:20. Σύμφωνα με τον τύπο της αραιώσης υπολογίστηκε η επιθυμητή ποσότητα της προκαλλιέργειας η οποία προστέθηκε σε μέσο ανάπτυξης Mueller-Hinton. Το εμβόλιο φωτομετρήθηκε στα 600nm για την επαλήθευση της καταλληλότητας του. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για όλους τους μικροοργανισμούς.

Εμβολιασμός

Υπό ασηπτικές συνθήκες και δίπλα σε φλόγιστρο, προστέθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες εις διπλούν, 100 μ L, 50 μ L ή 20 μ L του ligand και των αραιώσεων του, καθώς και 100 μ L, 50 μ L και 20 μ L καθαρού DMSO σε τρεις μάρτυρες, εις τριπλούν. Έπειτα προστέθηκε ποσότητα εμβολίου προς επίτευξη τελικού όγκου 1 mL. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για όλους τους μικροοργανισμούς. Στη συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο με την βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του εκάστοτε μικροοργανισμού, υπό ανάδευση στις 200 στροφές/λεπτό για 24 ώρες.

3^η ημέρα πειραματικής διαδικασίας

Λήψη αποτελεσμάτων

Οι καλλιέργειες αφαιρέθηκαν από τον επωαστικό κλίβανο και εντοπίστηκαν εκείνοι με τη χαμηλότερη συγκέντρωση στους οποίους δεν παρατηρήθηκε θολερότητα. Η συγκέντρωση αυτή καθορίστηκε ως MIC. Στη συνέχεια, για επαλήθευση, η MIC φωτομετρήθηκε στα 600nm με αποδεκτή τιμή απορρόφησης $A < 0,100$. Επίσης φωτομετρήθηκαν και οι 3 επόμενες αραιώσεις. Οι τιμές της μέσης μέγιστης

ανασταλτικής συγκέντρωσης (IC_{50}) υπολογίστηκαν υπολογίστηκε με την κατασκευή διαγραμμάτων συγκέντρωσης των υπό εξέταση ουσιών και απορρόφησης των καλλιεργειών που αναπτύχθηκαν. Υπολογίστηκε με βάση την καλύτερη γραμμική προσαρμογή της απορρόφησης των καλλιεργειών που αναπτύχθηκαν σε τουλάχιστον τρεις συγκεντρώσεις του αντιμικροβιακού παράγοντα.

3. Αποτελέσματα - Συζήτηση

Όπως ήδη αναφέρθηκε, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της μεταβολής της αντιμικροβιακής δράσης αντιβιοτικών ουσιών (ligands), όταν αυτά δημιουργούν σύμπλοκα με μέταλλα. Τα τέσσερα βακτηριακά στελέχη, αναπτύχθηκαν παρουσία των αντιβιοτικών ουσιών του σαλικυλικού και του ναλιδιξικού οξέος και των συμπλοκών τους, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0 έως 100 µg/mL, καθώς και της μαρβοφλοξασίνης και των συμπλόκων της, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0 έως 10 µg/mL, προκειμένου να προσδιοριστούν οι τιμές της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC και οι τιμές της μέσης ανασταλτικής συγκέντρωσης (IC₅₀). Στον πίνακα 3 και 4, δίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της MIC και της IC₅₀ αντίστοιχα, σε μονάδες συγκέντρωσης µg/mL και μοριακότητας µM.

Πίνακας 3. Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης των αντιβιοτικών ουσιών και των συμπλόκων τους ως η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) σε µg/mL και µM.

Σύμπλοκο	<i>X. campestris</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>E. coli</i>	
	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM
5-CH ₃ -salOH	50	375,59	>100	>751,18	>100	>751,18	>100	>751,18
[Mn(5-CH ₃ -salO) ₂ (MeOH) ₂]	100	262,30	>100	>262,30	-	-	-	-
5-Br-SalOH	50	271,72	100	543,45	100	543,45	100	543,45
[Mn(5-Br-salO) ₂ (MeOH) ₂]	50	103,09	100	206,17	100	206,17	>100	>206,17
[Mn(5-Br-salO) ₂ (bipyam)]	50	84,44	>100	>168,88	>100	>168,88	100	168,88
5-Cl-salOH	100	716,54	100	716,54	100	716,54	100	716,54
[Mn(5-Cl-salO) ₂ (MeOH) ₂]	100	277,26	>100	>277,26	>100	>277,26	>100	>277,26
[Mn(5-Cl-salO) ₂ (bipyam)]	100	213,77	>100	>213,77	>100	>213,77	>100	>213,77
3-OMe-salOH	100	670,58	100	670,58	>100	>670,58	>100	>670,58
[Mn(3-OMe-salO) ₂ (MeOH) ₂]	100	251,74	>100	>251,74	>100	>251,74	100	251,74
4-OMe-SalOH	>100	>670,58	>100	>670,58	>100	>670,58	>100	>670,58
[Mn(4-OMe-salO) ₂ (MeOH) ₂]	>100	>251,74	-	-	-	-	-	-
[Mn(4-OMe-salO) ₂ (phen)]	50	97,40	50	97,40	-	-	-	-
[Mn(4-OMe-salO) ₂ (bipy)]	>100	>204,36	>100	>204,36	-	-	-	-
[Mn(4-OMe-	100	198,27	>100	>198,27	-	-	-	-

salo) ₂ (bipyam)]								
Nalidixic Acid	100	430,60	50	215,30	50	215,30	50	215,30
[Ni(nal) ₂ (phen)]	>100	>142,58	100	142,58	50	71,29	100	142,58
Marbofloxacin	0,3125	8,62	0,3125	8,62	0,3125	8,62	0,3125	8,62
[Cu(marbo)(phen)Cl]	0,625	9,76	0,625	9,76	0,625	9,76	0,625	9,76
[Cu(marbo)(bipy)Cl]	0,625	10,15	0,625	10,15	0,625	10,15	1,25	20,31
[Cu(marbo)(bipyam)Cl]	1,25	19,79	2,5	39,58	2,5	39,58	2,5	39,58

Από τα αποτελέσματα που πάρθηκαν από την παρούσα μελέτη, ο προσδιορισμός της IC₅₀ ήταν εφικτός μόνο στη μαρβοφλοξασίνη και τα σύμπλοκά της, καθώς στις υπόλοιπες ομάδες, οριακά ήταν εφικτός ο προσδιορισμός της MIC.

Πίνακας 4. Μέση μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση (IC₅₀) των αντιβιοτικών ουσιών και των συμπλόκων τους σε µg/mL και µM.

Σύμπλοκο	<i>X. campestris</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>E. coli</i>	
	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM
Marbofloxacin	0,196	0,54	0,213	0,59	0,206	0,57	0,1765	0,49
[Cu(marbo)(phen)Cl]	0,348	0,54	0,392	0,61	0,39	0,61	0,3799	0,59
[Cu(marbo)(bipy)Cl]	0,363	0,59	0,406	0,66	0,82	1,33	0,6276	1,02
[Cu(marbo)(bipyam)Cl]	0,769	1,22	1,594	2,52	1,604	2,54	1,358	2,15

Στα αποτελέσματα που παρατίθενται στους παραπάνω πίνακες, οι γκρι γραμμές αντιστοιχούν στα ligands και ακριβώς κάτω από αυτά, βρίσκονται τα σύμπλοκά τους. Συνολικά υπάρχουν επτά ομάδες.

Τα ligands του σαλικυλικού και του ναλιδιξικού οξέος και τα σύμπλοκά τους, εμφανίζουν μέτρια δραστηριότητα έναντι των τεσσάρων βακτηρίων, καθώς παρουσιάζουν τιμές MIC > 50 µg/mL. Όπως μπορεί να φανεί στον Πίνακα 3, τα σύμπλοκα έδωσαν παρόμοιες ή μεγαλύτερες τιμές MIC > 50 µg/mL, έναντι όλων των δοκιμασμένων βακτηρίων σε σχέση με τις ελεύθερες αντιβιοτικές ουσίες. Τέλος το ligand της μαρβοφλοξασίνης και τα σύμπλοκά της, είναι περισσότερο δραστικά έναντι των τεσσάρων βακτηρίων, σε σχέση με τα άλλα ligands, καθώς παρουσιάζουν τιμές MIC ίσες με 0,3125 µg/mL για την μαρβοφλοξασίνη και τιμές MIC στην περιοχή 0,625 – 2,5 µg/mL για τα σύμπλοκά της.

Συγκρίνοντας, τις συγκεντρώσεις εκφρασμένες σε μονάδες μοριακότητας (µM), παρατηρείται ότι οι τιμές MIC των συμπλόκων είναι ως επί το πλείστον

χαμηλότερες, από τις αντίστοιχες τιμές των ελεύθερων αντιβιοτικών ουσιών. Το ίδιο όμως δεν συμβαίνει με τα σύμπλοκα της μαρβοφλοξασίνης, όπου παραμένουν να είναι ελαφρώς λιγότερο δραστικά σε σχέση με την ελεύθερη μαρβοφλοξασίνη.

Επεξήγηση αποτελεσμάτων της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) εκφρασμένες ως $\mu\text{g}/\text{mL}$

Ligands σαλικυλικού οξέος και συμπλόκων του

Ομάδα 5-CH₃-salOH – και συμπλόκων του

Παρατηρείται (Πίνακας 5) πως το 5-μέθυλο-σαλικυλικό οξύ παρουσιάζει MIC ίση με 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ στον μικροοργανισμό *X. campestris*, ενώ το αντίστοιχο σύμπλοκό του με το μέταλλο του μαγγανίου, ίση με 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

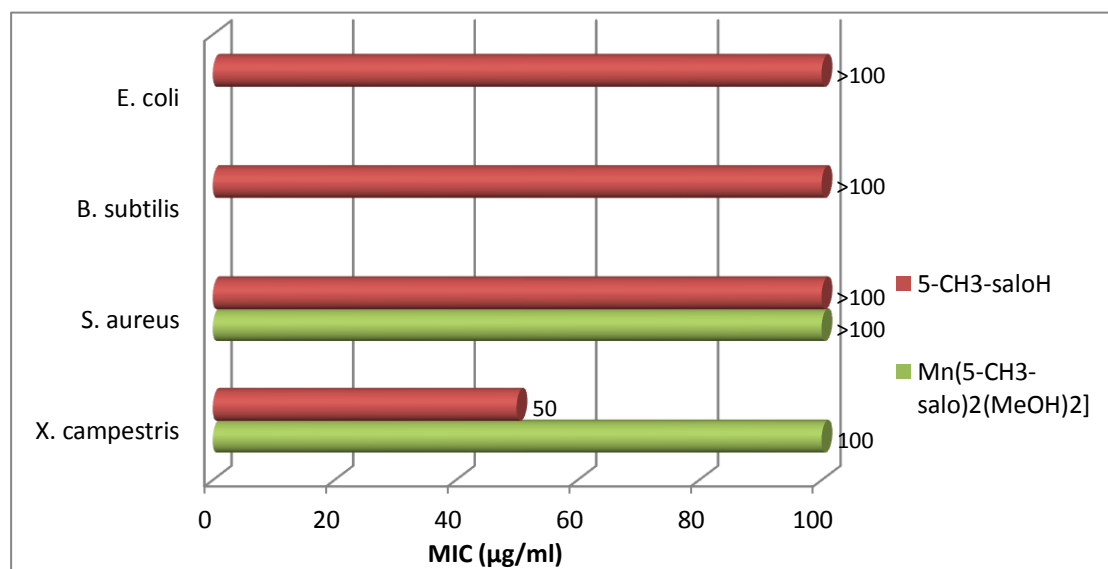
Πίνακας 5. Αποτελέσματα ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) σε $\mu\text{g}/\text{mL}$ του 5-CH₃-salOH και του συμπλόκου του σε τέσσερις μικροοργανισμούς (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *X. campestris*).

	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	<i>X. campestris</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
5-CH ₃ -salOH	50	>100	>100	>100
Mn(5-CH ₃ -salO) ₂ (MeOH) ₂	100	>100	-	-

Επομένως, η αντιμικροβιακή δράση του 5-μέθυλο-σαλικυλικού οξέος, δεν βελτιώνεται κατά το σχηματισμό ενώσεων συναρμογής του με το μαγγάνιο παρουσία δότη οξυγόνου.

Για τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς, ο προσδιορισμός της MIC του 5-CH₃-salOH υπολογίστηκε ως μεγαλύτερη των 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, καθώς παρατηρήθηκε ανάπτυξη τους και στην συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ του 5-CH₃-salOH. Το πρωτόκολλο της έρευνας δεν επιτρέπει να γίνει υπέρβαση αυτής της συγκέντρωσης των δραστικών ουσιών, καθώς θα απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα του μέσου διάλυσης της δραστικής ουσίας (DMSO) και πιθανόν να ευθύνεται για την αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Τέλος, η τιμή της MIC του [Mn(5-CH₃-salO)₂(MeOH)₂] για τον *S. aureus* υπολογίστηκε μεγαλύτερη των 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ενώ για τους μικροοργανισμούς

B. subtilis και *E. coli*, δεν ήταν δυνατό να υπολογιστεί, λόγω αστάθειας της ένωσης στο μέσο διάλυσής της, με το πέρασμα του χρόνου. Τα παραπάνω αποτελέσματα, αποτυπώνονται στο Γράφημα 1.



Γράφημα 1. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) σε μg/mL του 5-CH₃-saloH και του συμπλόκου του σε τέσσερις μικροοργανισμούς (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *X. campestris*).

Ομάδα 5-Br-saloH – και συμπλόκων του

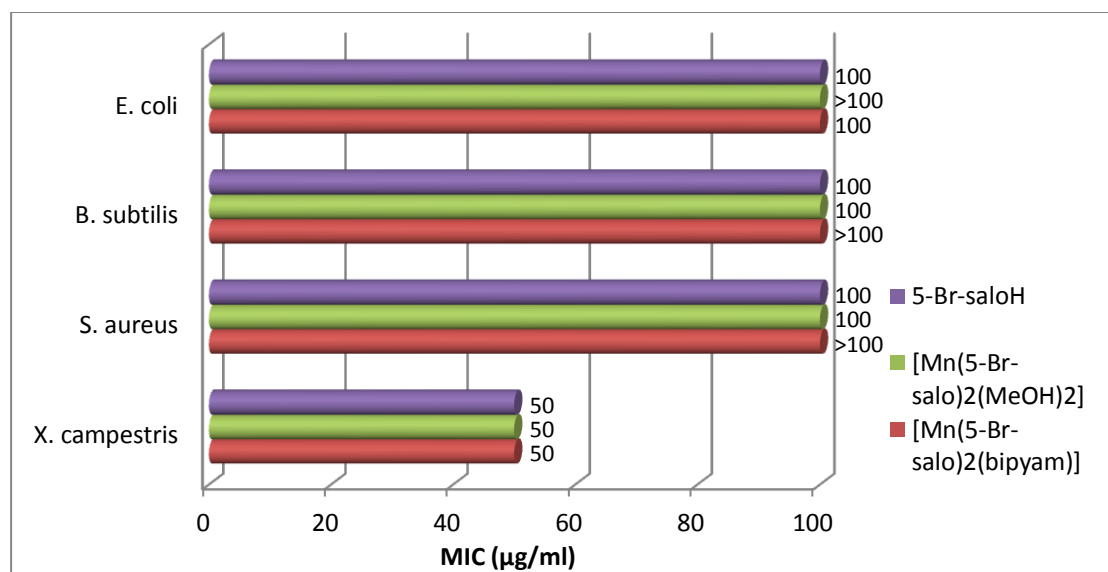
Στον Πίνακα 6, παρατηρείται πως τα σύμπλοκα του 5-Br-saloH με το Mn και δύο διαφορετικούς δότες, ο ένας οξυγόνου και ο άλλος αζώτου, δεν επιφέρει καμία βελτίωση στην αντιμικροβιακή δράση, σε σχέση με την ελεύθερη αντιβιοτική ουσία, σε κανέναν από τους τέσσερις μικροοργανισμούς.

Πίνακας 6. Αποτελέσματα ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) σε μg/mL του 5-Br-saloH και των συμπλόκων του σε τέσσερις μικροοργανισμούς (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *X. campestris*).

	MIC (μg/ml)			
	<i>X. campestris</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
5-Br-saloH	50	100	100	100
[Mn(5-Br-salo) ₂ (MeOH) ₂]	50	100	100	>100
[Mn(5-Br-salo) ₂ (bipyam)]	50	>100	>100	100

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτυπώνονται και στο Γράφημα 2. Η αντιβιοτική ουσία 5-Br-saloH και τα σύμπλοκά του, παρουσιάζουν στον μικροοργανισμό *X.*

campestris ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση ίση με 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και ελαφρώς καλύτερη αντιμικροβιακή δράση από ότι στους υπόλοιπους μικροοργανισμούς.



Γράφημα 2. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) σε $\mu\text{g}/\text{mL}$ του 5-Br-saloH και των συμπλόκων του σε τέσσερις μικροοργανισμούς (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *X. campestris*).

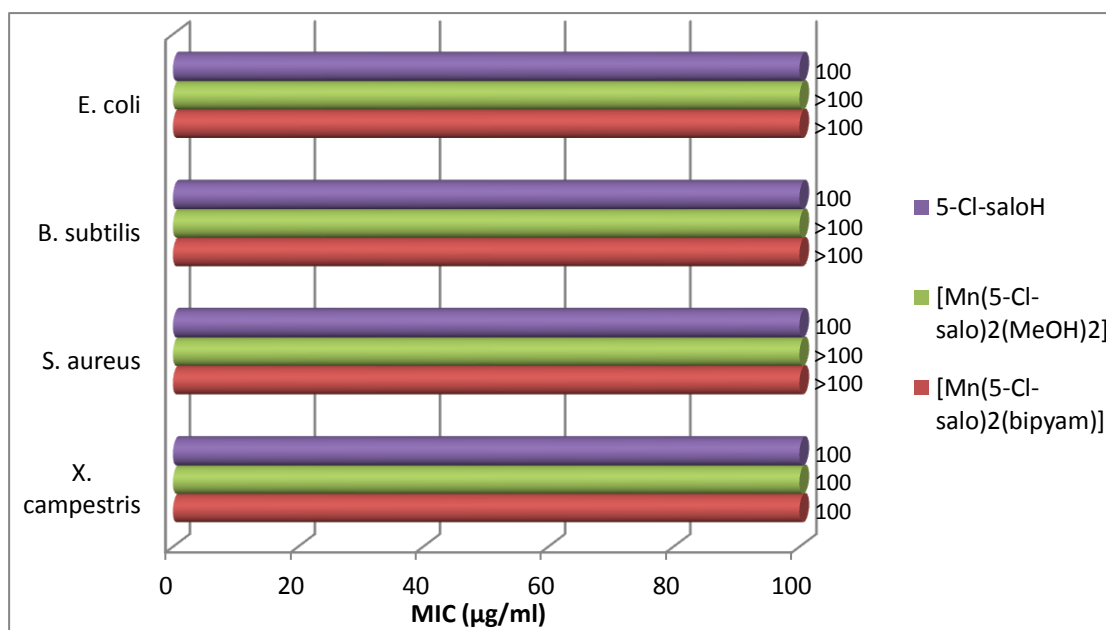
Ομάδα 5-Cl-saloH – και συμπλόκων του

Για τα σύμπλοκα του ligand 5-Cl-saloH, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι εμφανίζουν ίση ή μικρότερη δραστηριότητα έναντι των τεσσάρων μικροοργανισμών.

Πίνακας 7. Αποτελέσματα ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) σε $\mu\text{g}/\text{mL}$ του 5-Cl-saloH και των συμπλόκων του σε τέσσερις μικροοργανισμούς (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *X. campestris*).

	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	<i>X. campestris</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
5-Cl-saloH	100	100	100	100
[Mn(5-Cl-salo) ₂ (MeOH) ₂]	100	>100	>100	>100
[Mn(5-Cl-salo) ₂ (bipyam)]	100	>100	>100	>100

Για τον μικροοργανισμό *X. campestris* η MIC είναι ίση με 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ δραστικής ουσίας, για το ligand και τα σύμπλόκά του, ενώ για τους υπόλοιπους τρεις μικροοργανισμούς τα σύμπλοκα του 5-Cl-saloH, παρουσιάζουν μικρότερη αντιμικροβιακή δράση.



Γράφημα 3. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) σε $\mu\text{g}/\text{mL}$ του 5-Cl-saloH και των συμπλόκων του σε τέσσερις μικροοργανισμούς (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *X. campestris*).

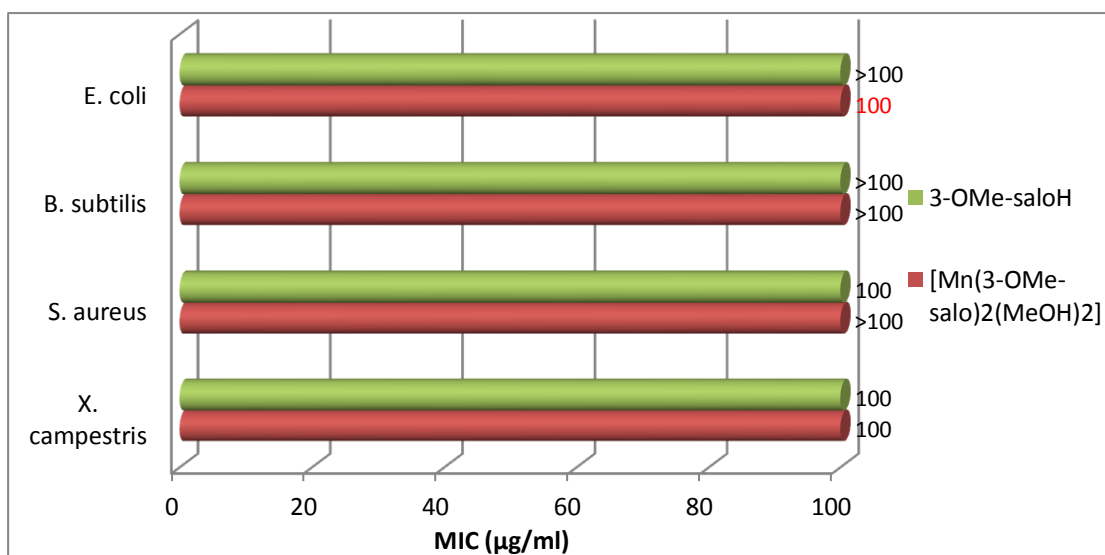
Ομάδα 3-OMe-saloH – και συμπλόκων του

Το σύμπλοκο $[\text{Mn}(3\text{-OMe-salo})_2(\text{MeOH})_2]$, εμφανίζει ίση ή μεγαλύτερη MIC, επομένως μικρότερη δραστικότητα, από ότι το αντίστοιχο ligand 3-OMe-saloH, για τους τρεις μικροοργανισμούς εκτός της *E. coli*.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) σε $\mu\text{g}/\text{mL}$ του 3-OMe-saloH και του συμπλόκου του σε τέσσερις μικροοργανισμούς (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *X. campestris*).

	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	<i>X. campestris</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
3-OMe-saloH	100	100	>100	>100
$[\text{Mn}(3\text{-OMe-salo})_2(\text{MeOH})_2]$	100	>100	>100	100

Για την *E. coli*, το σύμπλοκο του μαγγανίου με τον αντιμικροβιακό παράγοντα του σαλικυλικού οξέος (της μορφής 3-OMe-saloH), παρουσία δότη ατόμου οξυγόνου (της μορφής MeOH), παρουσίασε μεγαλύτερη δραστικότητα από ότι ο αντίστοιχος ελεύθερος αντιμικροβιακός παράγοντας. Η τιμή MIC του συμπλόκου υπολογίστηκε ίση με $100 \mu\text{g}/\text{mL}$, ενώ αυτή του ligand προσδιορίστηκε ως $>100 \mu\text{g}/\text{mL}$.



Γράφημα 4. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) σε µg/mL του 3-OMe-saloH και του συμπλόκου του σε τέσσερις μικροοργανισμούς (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *X. campestris*).

Ομάδα 4-OMe-saloH – και συμπλόκων του

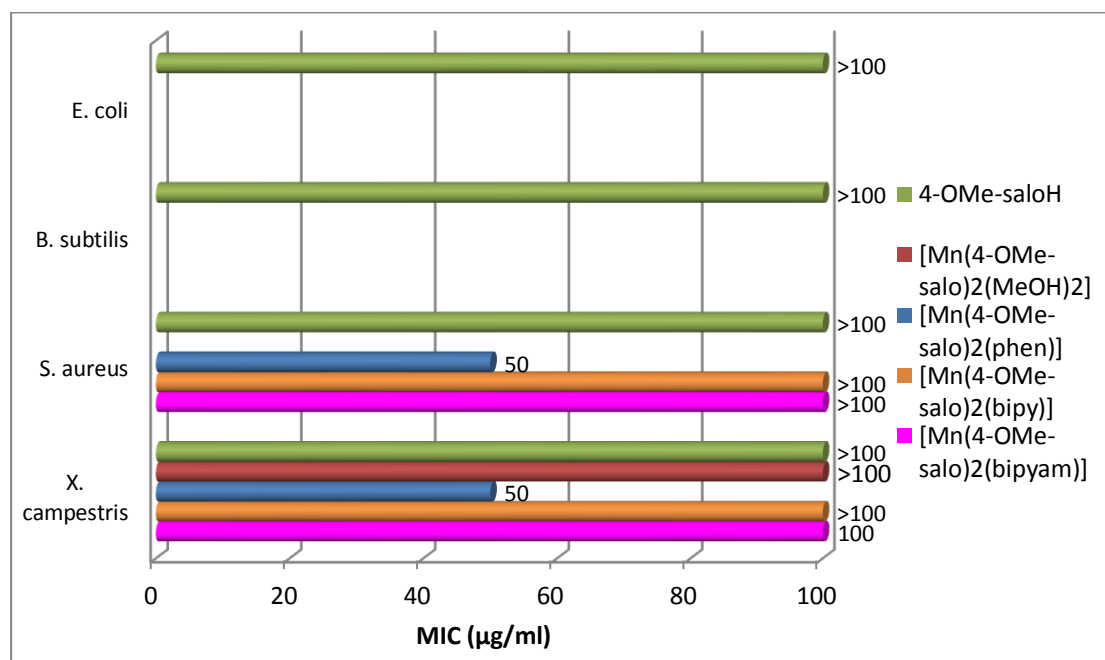
Στην παρούσα μελέτη, υπάρχουν τέσσερα σύμπλοκα του μαγγανίου της αντιβιοτικής ουσίας 4-OMe-saloH, παρουσία δοτών ατόμων οξυγόνου και αζώτου. Έγινε σύγκριση δηλαδή της αντιμικροβιακής δράσης του ligand 4-OMe-saloH, με τέσσερα σύμπλοκά του, όπως φαίνεται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9. Αποτελέσματα ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) σε µg/mL του 4-OMe-saloH και των συμπλόκων του σε τέσσερις μικροοργανισμούς (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *X. campestris*).

	MIC (µg/mL)			
	<i>X. campestris</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
4-OMe-saloH	>100	>100	>100	>100
[Mn(4-OMe-salo) ₂ (MeOH) ₂]	>100	-	-	-
[Mn(4-OMe-salo) ₂ (phen)]	50	50	-	-
[Mn(4-OMe-salo) ₂ (bipy)]	>100	>100	-	-
[Mn(4-OMe-salo) ₂ (bipyam)]	100	>100	-	-

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του ligand υπολογίστηκε πως είναι μεγαλύτερη των 100 µg/mL σε όλους τους υπό εξέταση μικροοργανισμούς. Το σύμπλοκο [Mn(4-OMe-salo)₂(MeOH)₂] εξετάστηκε μόνο στον μικροοργανισμό *X.*

campestris και είχε τα ίδια αποτελέσματα με το ligand. Στους υπόλοιπους μικροοργανισμούς δεν ήταν δυνατός ο υπολογισμός της MIC, λόγω αστάθειας της ένωσης στο μέσο διάλυσής της. Το ίδιο συνέβη και με το σύμπλοκο $[\text{Mn}(4\text{-OMe-salo})_2(\text{bipy})]$, με τη μόνη διαφορά ότι η σταθερότητά του διήρκησε κάποιο χρονικό διάστημα παραπάνω και εξετάστηκε και ο μικροοργανισμός *S. aureus*. Τα αποτελέσματα της MIC αυτού του συμπλόκου ήταν ίδια με αυτά του ligand.



Γράφημα 5. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) σε $\mu\text{g}/\text{mL}$ του 4-OMe-saloH και των συμπλόκων του σε τέσσερις μικροοργανισμούς (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *X. campestris*).

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα των υπολοίπων δύο συμπλόκων του 4-OMe-saloH, $[\text{Mn}(4\text{-OMe-salo})_2(\text{bipyam})]$ και $[\text{Mn}(4\text{-OMe-salo})_2(\text{phen})]$, καθώς φαίνεται να εμφανίζουν μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι του ελεύθερου αντιμικροβιακού παράγοντα για τους μικροοργανισμούς *X. campestris* και *S. aureus* (για τον *S. aureus* μόνο το σύμπλοκο $[\text{Mn}(4\text{-OMe-salo})_2(\text{phen})]$). Με τη μόνη διαφορά όμως, ότι και τα συγκεκριμένα σύμπλοκα, παρουσίασαν αστάθεια με τη πάροδο του χρόνου και έτσι δεν ήταν δυνατό να εξεταστεί η MIC τους για τους μικροοργανισμούς *B. subtilis* και *E. coli*.

Το σύμπλοκο [Mn(4-OMe-salo)₂(bipyam)] με δότη ατόμων αζώτου την 2,2' – διπυριδυλαμίνη (bipyam), παρουσίασε μεγαλύτερη δραστικότητα (MIC=100 µg/mL) έναντι του ελεύθερου 4-OMe-saloH (MIC>100 µg/mL) στον μικροοργανισμό *X. campestris*, ενώ δεν παρατηρείται το ίδιο για τον μικροοργανισμό *S. aureus*.

Το σύμπλοκο [Mn(4-OMe-salo)₂(phen)] με δότη ατόμων αζώτου την 1,10 – φαινανθρολίνη (phen), εμφάνισε μικρότερη ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC=50 µg/mL) έναντι του ελεύθερου 4-OMe-saloH (MIC>100 µg/mL) και στους δύο υπό εξέταση μικροοργανισμούς (*X. campestris*, *S. aureus*).

Γίνεται φανερό επομένως, ότι η αύξηση της δραστικότητας των συμπλόκων του μαγγανίου της 4-μέθοξυ-σαλικυλαλδεΐδης (4-OMe-saloH) έναντι μικροοργανισμών, οφείλεται στη παρουσία των δοτών ατόμων αζώτου της 2,2'-Διπυριδυλαμίνης (bipyam) και της 1,10 – φαινανθρολίνης (phen).

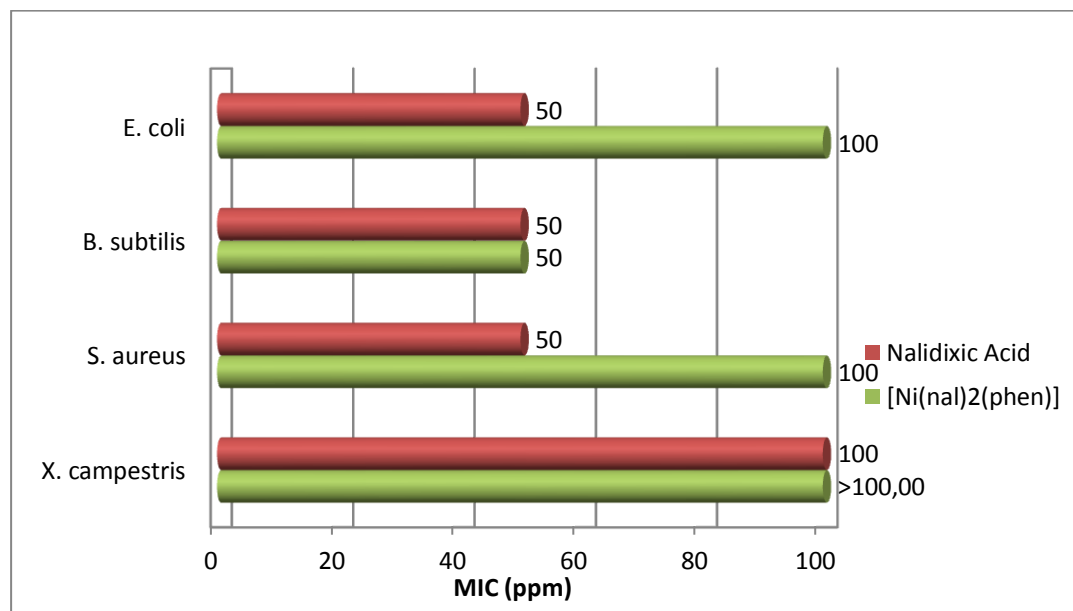
Ομάδα nalidixic acid – και συμπλόκου του

Η δεύτερη αντιβιοτική ουσία που εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη, είναι το ναλιδιξικό οξύ (nalidixic acid). Μελετήθηκε η δραστικότητά της έναντι του συμπλόκου της με κεντρικό μέταλλο το νικέλιο και ένα δότη ατόμων αζώτου την 1,10 – φαινανθρολίνη ([Ni(nal)₂(phen)]).

Πίνακας 10. Αποτελέσματα ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) σε µg/mL του ναλιδιξικού οξέος και του συμπλόκου του σε τέσσερις μικροοργανισμούς (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *X. campestris*).

	MIC (µg/mL)			
	<i>X. campestris</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Nalidixic Acid	100	50	50	50
[Ni(nal) ₂ (phen)]	>100	100	50	100

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 10, αλλά και στο Γράφημα 6, το σύμπλοκο του ναλιδιξικού οξέος δεν παρουσίασε μεγαλύτερη δραστηριότητα σε κανέναν από τους υπό εξέταση μικροοργανισμούς.



Γράφημα 6. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) σε $\mu\text{g}/\text{mL}$ του ναλιδιξικού οξέος και του συμπλόκου του σε τέσσερις μικροοργανισμούς (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *X. campestris*).

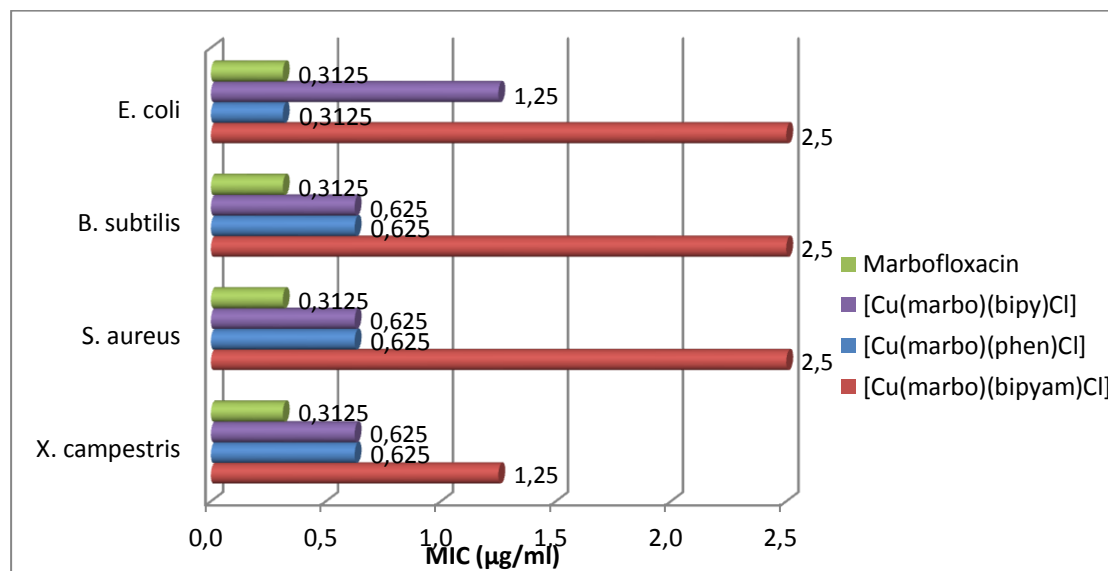
Ομάδα marbofloxacin – και συμπλόκων του

Η τρίτη αντιβιοτική ουσία που εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη, είναι η μαρβοφλοξασίνη (marbofloxacin). Εξετάστηκαν τρεις σύμπλοκες ενώσεις με κεντρικό μέταλλο το Cu, παρουσία δοτών ατόμων αζώτου, όπως φαίνονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11. Αποτελέσματα ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) σε $\mu\text{g}/\text{mL}$ του marbofloxacin και των συμπλόκων του σε τέσσερις μικροοργανισμούς (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *X. campestris*).

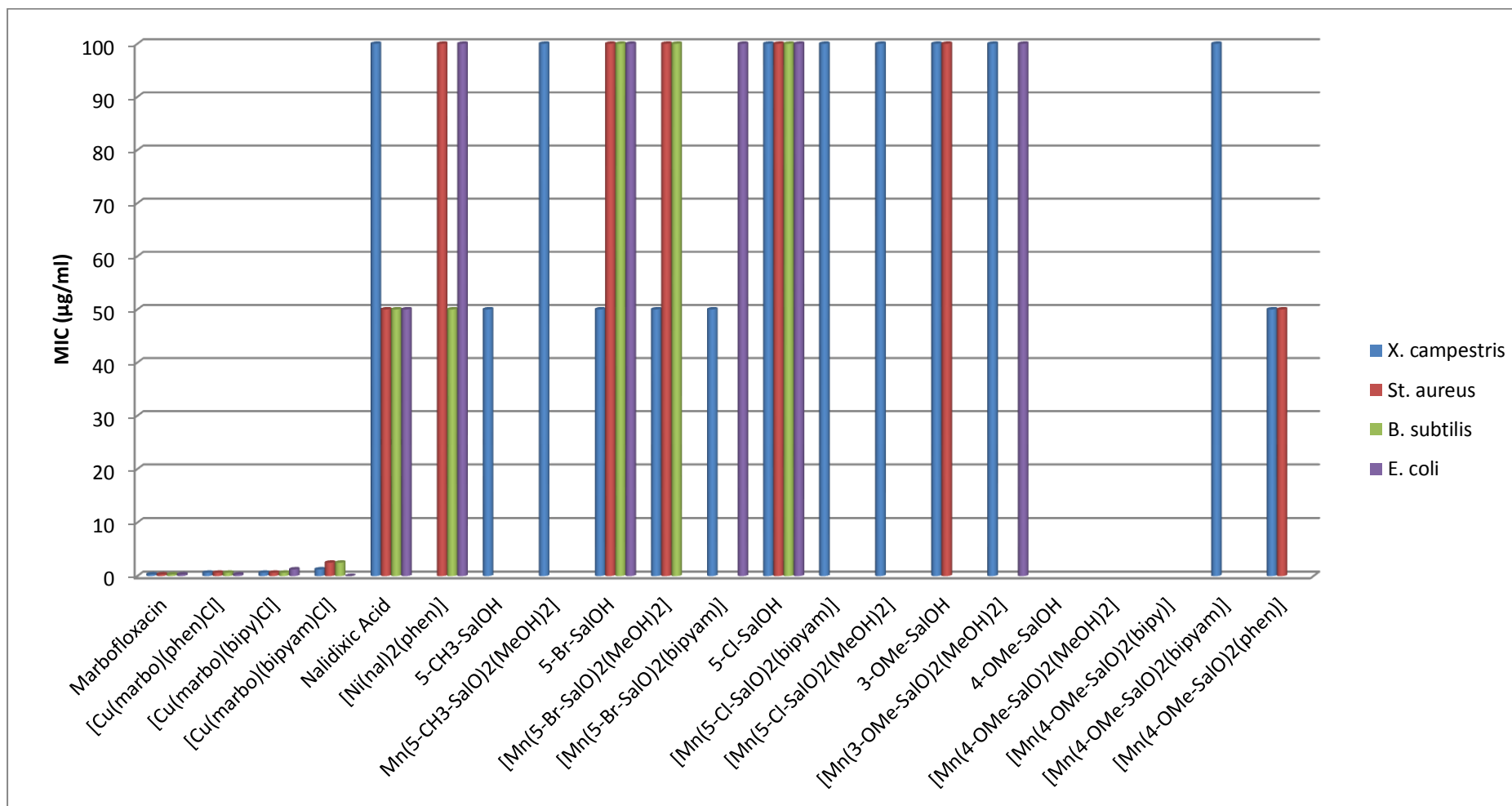
	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	<i>X. campestris</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Marbofloxacin	0,3125	0,3125	0,3125	0,313
[Cu(marbo)(bipy)Cl]	0,625	0,625	0,625	1,25
[Cu(marbo)(phen)Cl]	0,625	0,625	0,625	0,313
[Cu(marbo)(bipyam)Cl]	1,25	2,5	2,5	2,5

Γίνεται φανερό, πως την μεγαλύτερη δραστικότητα κατά των τεσσάρων μικροοργανισμών εμφανίζει το ελεύθερο αντιβιοτικό (ligand), έναντι των τριών συμπλόκων του (Γράφημα 7).



Γράφημα 7. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) σε μg/mL του marbofloxacin και των συμπλόκων του σε τέσσερις μικροοργανισμούς (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *X. campestris*).

Στο Γράφημα 8, παρατίθενται συγκεντρωτικά όλοι οι αντιμικροβιακοί παράγοντες που εξετάστηκαν και στους τέσσερις μικροοργανισμούς και είχαν ως αποτέλεσμα μέχρι την τιμή MIC=100 μg/mL.



Γράφημα 8. Αποτελέσματα ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (έως 100 µg/mL) των αντιμικροβιακών ουσιών για τους τέσσερις μικροοργανισμούς.

4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκε η αντιμικροβιακή δράση τριών αντιβιοτικών ουσιών και των συμπλόκων τους με διάφορα μέταλλα. Η αντιμικροβιακή δράση ελέγχθηκε έναντι τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων, των *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* και της *Xanthomonas campestris*.

Η δραστηριότητα των συμπλόκων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Οι πέντε συνηθέστεροι που οδηγούν σε ενισχυμένη αντιμικροβιακή δραστηριότητα σε σύμπλοκα είναι το χηλικό φαινόμενο των ligands, η φύση των ligands, η φύση και η πυρηνικότητα του μετάλλου, το συνολικό φορτίο και η ύπαρξη και φύση αντίθετων ιόντων (Barmra A., 2018).

Κάτι τέτοιο γίνεται φανερό στην παρούσα μελέτη, καθώς μεταβάλλεται η δραστηριότητα μεταξύ των συμπλόκων του σαλικυλικού οξέος, όταν αλλάζει το χηλικό αποτέλεσμα και η φύση των προσδεμάτων. Ο δότης ατόμων αζώτου (bipyam), αυξάνει την δραστηριότητα των συμπλόκων $[Mn(5-Cl-salo)_2(bipyam)]$ και $[Mn(5-Br-salo)_2(bipyam)]$ και στους τέσσερις προς εξέταση μικροοργανισμούς, έναντι του δότη ατόμων οξυγόνου (MeOH) (Πίνακας 3). Τέλος, στα σύμπλοκα της 4-OMe-SalOH, ο δότης ατόμων αζώτου (phen), αυξάνει τη δραστηριότητα τους στους μικροοργανισμούς *S. aureus* και *X. campestris* και ακολουθούν οι δότες ατόμου αζώτου (bipyam) και (bipy).

Ένας ακόμη παράγοντας που αναφέρθηκε παραπάνω είναι και η φύση του ligand και του μετάλλου. Το ναλιδιξικό οξύ είναι κινολόνη 1^{ης} γενιάς, όπως επίσης και η φλουμεκίνη. Οι Τσίτσα κ.ά. (2016), σε μελέτη τους αναφέρουν πως τα σύμπλοκα Co και Cu της φλουμεκίνης εμφανίζουν τιμές MIC στην περιοχή 1 – 64 µg/mL έναντι των *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* και της *Xanthomonas campestris*. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, δείχνουν πως το ναλιδιξικό οξύ και το σύμπλόκό του με το Ni, εμφανίζουν τιμές MIC στην περιοχή >50 µg/mL έναντι των ίδιων μικροοργανισμών.

Ανακεφαλαιώνοντας, τα ligands του σαλικυλικού και του ναλιδιξικού οξέος και τα σύμπλοκά τους, εμφανίζουν μέτρια δραστικότητα έναντι των τεσσάρων βακτηρίων, καθώς παρουσιάζουν τιμές MIC > 50 µg/mL. Τα σύμπλοκα έδωσαν παρόμοιες ή μεγαλύτερες τιμές MIC > 50 µg/mL, έναντι όλων των δοκιμασμένων βακτηρίων σε σχέση με τις ελεύθερες αντιβιοτικές ουσίες. Τέλος το ligand της μαρβοφλοξασίνης και τα σύμπλοκά της, είναι περισσότερο δραστικά έναντι των τεσσάρων βακτηρίων, σε σχέση με τα άλλα ligands, καθώς παρουσιάζουν τιμές MIC ίσες με 0,3125 µg/mL για την μαρβοφλοξασίνη και τιμές MIC στην περιοχή 0,625 – 2,5 µg/mL για τα σύμπλοκά της. Συγκρίνοντας, τις συγκεντρώσεις εκφρασμένες σε μονάδες μοριακότητας (µM), παρατηρείται ότι οι τιμές MIC των συμπλοκών είναι ως επί το πλείστον χαμηλότερες, από τις αντίστοιχες τιμές των ελεύθερων αντιβιοτικών ουσιών. Το ίδιο όμως δεν συμβαίνει με τα σύμπλοκα της μαρβοφλοξασίνης, όπου παραμένουν να είναι ελαφρώς λιγότερο δραστικά σε σχέση με την ελεύθερη μαρβοφλοξασίνη.

Συμπερασματικά, από όλες τις αντιβιοτικές ουσίες και τα σύμπλοκά τους που εξετάστηκαν στην παρούσα έρευνα, η μαρμποφλοξασίνη και τα σύμπλοκά της είναι αυτές με την μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι όλων των υπό εξέταση μικροοργανισμών. Τέλος, στις περισσότερες περιπτώσεις, εκτός της μαρβοφλοξασίνης, τα σύμπλοκα παρουσιάζουν παρόμοια ή ελαφρώς καλύτερη δραστικότητα από τις ελεύθερες αντιβιοτικές ουσίες έναντι των βακτηρίων που ελέγχθηκαν.

5. Βιβλιογραφία

- Andrews J. M. 2001.** Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001, Τόμ. 48, 1, σσ. 5-16.
- Barmpa A., Frousiou O., Kalogiannis S., Perdih F., Turel I., Psomas G. 2018.** Manganese (II) complexes of the quinolone family member flumequine: Structure, antimicrobial activity and affinity for albumins and calf-thymus DNA. *Polyhedron*. 2018, 145, σσ. 166-175.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov>. [Ηλεκτρονικό]
<https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>.
- Das B., Patra S., 2017.** Chapter 1 - Antimicrobials: Meeting the Challenges of Antibiotic Resistance Through Nanotechnology. *Nanostructures for Antimicrobial Therapy*. s.l. : Anton Fikai and Alexandru Mihai Grumezescu, 2017, σσ. 1-22.
- Debnath A., Mogha N.K., Masra D.T., 2015.** Metal Complex of the First-Generation Quinolone Antimicrobial Drug Nalidixic Acid: Structure and Its Biological Evaluation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2015, Τόμ. 175, 5, σσ. 2659–2667.
- Dhawan A., Kwon S., 2018.** *In Vitro Toxicology*. 2018.
- Doble A. 2007.** *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. 2007. σσ. 1-3.
- Foster T. 1996.** Chapter 12: Staphylococcus. *Medical Microbiology*. Galveston : Samuel Baron, 1996.
- Juhas M., Reuβ D.R., Zhu B., Commichau F.M., 2014.** Bacillus subtilis and Escherichia coli essential genes and minimal cell factories after one decade of genome engineering. *Microbiology*. 2014, Τόμ. 160, 11, σσ. 2341-2351.
- Kakoulidou C., Kalogiannis S., Angaridis P., Psomas G., 2019.** Synthesis, characterization and biological activity of Zn coordination compounds with the quinolone gatifloxacin. *Polyhedron*. 2019, Τόμ. 166, σσ. 98-108.
- Kariduraganavar M.Y., Kittur A.A., Kamble R.R., 2014.** Chapter 1 - Polymer Synthesis and Processing. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*. 2014, σσ. 1-31.
- Kostelidou A., Kalogiannis S., Begou O., Perdih F., Turel I., Psomas G., 2016.** Synthesis, structure and biological activity of copper(II) complexes with gatifloxacin. *Polyhedron*. 2016, Τόμ. 119, σσ. 359-370.
- Kulkarni V.S., Shaw C., 2016.** Chapter 5 - Use of Polymers and Thickeners in Semisolid and Liquid Formulations. *Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages*. 2016, σσ. 43-69.

Lefevre M., Racedo S.M., Denayrolles M., Desfougères T., Lobach A.R., Simon R., Pélerin F., Jüsten P., Urdaci M.C., 2017. Safety assessment of *Bacillus subtilis* CU1 for use as a probiotic in humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2017, Τόμ. 83, σσ. 54-65.

Lim J.Y., Yoon J.W., Hovde C.J., 2010. A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010, Τόμ. 20, 1, σσ. 5-14.

Nakano M.M., Zuber P., 1998. Anaerobic Growth of a “Strict Aerobe” (*Bacillus Subtilis*). *Annual Review of Microbiology*. 1998, Τόμ. 52, σσ. 165-190.

Sahoo J., Paidesetty S.K., 2015. Antimicrobial, analgesic, antioxidant and in silico study of synthesized salicylic acid congeners and their structural interpretation. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2015, Τόμ. 2, σσ. 268-280.

Santos A.F., Brotto D.F., Favarin L.R.V., Cabeza N.A., Andrade G.R., Batistote M., Cavalheiro A.A., Neves A., Rodrigues D.C.M., Anjos A., 2014. Study of the antimicrobial activity of metal complexes and their ligands through bioassays applied to plant extracts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2014, Τόμ. 24, σσ. 309-315.

Schneider M., Vallé M., Woehrlé F., Boisramé B., 2007. Pharmacokinetics of Marbofloxacin in Lactating Cows After Repeated Intramuscular Administrations and Pharmacodynamics Against Mastitis Isolated Strains. *Journal of Dairy Science*. January 2007, Τόμ. 87, 1, σσ. 202-211.

Sheikh R.A., Shreaz S., Sharma G.S., Khan L.A., Hashmi A.A., 2012. Synthesis, characterization and antimicrobial screening of a novel organylborate ligand, potassium hydro(phthalyl)(salicylyl)borate and its Co(II), Ni(II), and Cu(II) complexes. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2012, Τόμ. 16, σσ. 353-361.

Tohamy M.A., El-Gendy A.A.M., 2013. Some pharmacokinetic aspects and bioavailability of marbofloxacin in foals. *Beni - Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 2013, Τόμ. 2, σσ. 46-50.

Tsitsa I., Tarushi A., Doukoume P., Perdih F., Almeida A., Papadopoulos A., Kalogiannis S., Casini A., Turel I., Psoma G. 2016. Structure and biological activities of metal complexes of flumequine. *RSC Advances*. 2016, 23, σσ. 19555-19570.

Vicente J.G., Holub E.B., 2013. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular Plant Pathology*. 2013, Τόμ. 14, 1, σσ. 2-18.

Yadav V., Talwar P., 2019. Repositioning of fluoroquinolones from antibiotic to anti-cancer agents: An underestimated truth. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019, Τόμ. 111, σσ. 934-946.

Αναστασιάδου Δ. 2011. Σύνθεση και χαρακτηρισμός της δομής ενώσεων συναρμογής του ψευδαργύρου, με διδραστικές αζωτούχες βάσεις και 2-Υδροξυ-3-Μεθοξυ-Βενζαλδεΐδη. Θεσσαλονίκη : s.n., 2011.

Κοτζεκίδου-Ρουκά Π. 2004. *Μικροβιολογία τροφίμων.* Θεσσαλονίκη : Υπηρεσία Δημοσιευμάτων Α.Π.Θ., 2004. σσ. 232-238.

Κυρανάς Ε. 2016. *Πρόσθετα Τροφίμων και Νομοθεσία.* Θεσσαλονίκη : Εκδόσεις Τζιόλα, 2016.

Λάλια – Καντούρη Μ., Παπαστεφάνου Σ., 1995. *Γενική & Ανόργανη Χημεία.* Θεσσαλονίκη : Εκδόσεις Ζήτη, 1995.

6. Παράρτημα

Μεθοδολογία

Παρασκευή αρχικής στερεής καλλιέργειας

Έχοντας αναμμένη την φλόγα μέσα στο biosafety cabinet ξεκινάμε τη διαδικασία αποστειρώνοντας τον μικροβιολογικό κρίκο, τοποθετώντας τον στον φλόγα έως ότου πυρακτωθεί.

Έπειτα ανοίγουμε την υγρή καλλιέργεια και τον δοκιμαστικό σωλήνα με το κεκλιμένο άγαρ, περνώντας το στόμιο τους από την φλόγα για να αποτρέψουμε τυχόν επιμόλυνση.

Με τον μικροβιολογικό κρίκο παίρνουμε μία μικρή ποσότητα από την υγρή καλλιέργεια και κάνουμε εγκάρσιες τομές επάνω στο κεκλιμένο άγαρ. Τελειώνοντας ακολουθούμε την ίδια διαδικασία αποστείρωσης στην φλόγα.

Ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετείται ανεστραμμένος μέσα σε κλίβανο επώασης στην βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης για 24 ώρες. Μετά την επώαση αποθηκεύεται ανεστραμμένος σε ψυγείο στους 4°C για 4-6 εβδομάδες.

Αραιώσεις

Τις αντιμικροβιακές ουσίες τις οποίες θα εξετάσουμε τις λαμβάνουμε σε ξηρή κρυσταλλική μορφή, γι' αυτό το λόγο πρέπει πρώτα να διαλυθούν μέσα σε DMSO. Η επιλεγμένη ποσότητα DMSO στην οποία θα διαλυθούν οι αντιμικροβιακές ενώσεις είναι 5mL για 5g ουσίας προς επίτευξη συγκέντρωσης 1000μg/mL.

Για την πειραματική διαδικασία προσδιορισμού MIC είναι αναγκαίο να δουλέψουμε διαδοχικές αραιώσεις της προς εξέταση ουσίας. Η διαδικασία γίνεται ως εξής:

1. Σε πλαστικά δοκιμαστικά σωληνάκια erpendorf, σημειώνουμε τον κωδικό της αντιμικροβιακής ουσίας και τα αριθμούμε ανάλογα με τον αριθμό των αραιώσεων που χρειαζόμαστε.
2. Προσθέτουμε σε όλα τα erpendorf από 750μL DMSO.

3. Έπειτα στο 1^ο errendorf προσθέτουμε 750μL της διαλυμένης ένωσης, κλείνουμε το καπάκι και αναδεύουμε σε vortex.
4. Από το 1^ο errendorf παίρνουμε 750μL και τα προσθέτουμε στο 2^ο errendorf, κλείνουμε το καπάκι και αναδεύουμε σε vortex.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και για τα υπόλοιπα σωληνάκια.

Τα σωληνάκια τοποθετούνται σε στατό και αποθηκεύονται σε θερμοκρασία άνω των 19°C προς αποφυγή στερεοποίησης του DMSO.

Η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων βασίζεται στον τύπο της αραιώσης: $C_1V_1=C_2V_2$ και λύνοντας ως προς το C_2 έχουμε:

$$1000*750=C_2*1500$$

$$C_2=500\mu\text{g}/\text{mL}$$

Έτσι από το αρχικό διάλυμα των 1000μg/mL, προχωράμε στο 1^οerrendorf το οποίο έχει 500μg/mL, έπειτα στο 2^ο το οποίο έχει 250μg/mL κ.ο.κ.

Παρασκευή υγρού υποστρώματος

Επιλέγουμε κωνικές φιάλες επιθυμητής χωρητικότητας και σημειώνουμε με ανεξίτηλο μαρκαδόρο την ποσότητα και το όνομα του υποστρώματος που θα τοποθετήσουμε σε κάθε μια (πχ. MH, 50mL). Η χωρητικότητα της κάθε φιάλης πρέπει να ικανοποιεί τις ανάγκες μας για δημιουργία επαρκούς ποσότητας εμβολίου, για τυχόν αραιώση του εμβολίου και για χρήση ως μάρτυρα κατά την φωτομέτρηση. Για παράδειγμα, ο εμβολιασμός 50 δοκιμαστικών σωλήνων με περίπου 1mL εμβολίου απαιτεί τουλάχιστον 50 mL υποστρώματος (Mueller-Hinton) και τουλάχιστον 25mL ακόμα για τυχόν αραιώση και φωτομέτρηση.

Σε ένα ποτήρι ζέσεως βάζουμε ένα μαγνητάκι ανάδευσης και τοποθετούμε το ποτήρι σε θερμαντήρα-αναδευτήρα. Σε ογκομετρικό κύλινδρο μετράμε την επιθυμητή ποσότητα απεσταγμένου νερού και το προσθέτουμε στο ποτήρι ζέσεως. Σε ζυγαριά ακριβείας ζυγίζουμε την ποσότητα των συστατικών που χρειαζόμαστε, πλην του άγαρ, και τα προσθέτουμε στο ποτήρι ζέσεως.

Υπό συνεχή ανάδευση περιμένουμε μέχρι το μείγμα να έρθει σε σημείο βρασμού, έπειτα το ψύχουμε, μετράμε την επιθυμητή ποσότητα σε ογκομετρικό κύλινδρο και την προσθέτουμε στην ανάλογη κωνική φιάλη.

Σφραγίζουμε τις κωνικές φιάλες με υδρόφοβο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο και τις αποστειρώνουμε στον κλίβανο. Μετά την αποστείρωση τις αποθηκεύουμε σε biosafety cabinet.

Για τη δημιουργία της αρχικής στερεής καλλιέργειας σε δοκιμαστικούς σωλήνες με κεκλιμένο άγαρ, προσθέτουμε και άγαρ 2g/100mL στην αρχική συνταγή του κάθε υποστρώματος.

Παρασκευή προκαλλιέργειας

Η διαδικασία είναι παρόμοια με αυτή που ακολουθήθηκε κατά την παρασκευή της αρχικής καλλιέργειας.

Σε biosafety cabinet με ανοιχτή φλόγα αποστειρώνουμε τον μικροβιολογικό κρίκο και το στόμιο του δοκιμαστικού σωλήνα και της κωνικής φιάλης. Με τον κρίκο λαμβάνουμε μία μικρή ποσότητα από την στερεή καλλιέργεια και την βυθίζουμε στο υγρό υπόστρωμα της κωνικής φιάλης, κάνοντας κυκλικές κινήσεις ενάντια στα τοιχώματα της φιάλης έως ότου αποκολληθεί το δείγμα από τον κρίκο. Έπειτα αποστειρώνουμε ξανά τον κρίκο.

Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία 5 φορές μεταφέροντας με τον κρίκο μικρή ποσότητα από την αρχική κωνική φιάλη προς μία δεύτερη κωνική φιάλη με το ίδιο υπόστρωμα. Αυτό γίνεται για να επιτύχουμε μικρότερη ανάπτυξη στην δεύτερη κωνική φιάλη ώστε να μας διευκολύνει κατά την δημιουργία του εμβολίου.

Τέλος, οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε επωαστήρα με την βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού και υπό ανάδευση στις 200 στροφές/λεπτό για 24 ώρες.

Παρασκευή εμβολίου

Ανοίγουμε το φασματοφωτόμετρο και το ρυθμίζουμε στα 600nm. Σε 2 κυψελίδες φωτομέτρησης των 4mL προσθέτουμε καθαρό υπόστρωμα και με αυτές μηδενίζουμε το φασματοφωτόμετρο.

Σε biosafety cabinet με ανοιχτή φλόγα ανοίγουμε μια κωνική φιάλη με προκαλλιέργεια, στην οποία υπήρξε ανάπτυξη του μικροοργανισμού και περνάμε το στόμιό της από την φλόγα. Με μικροπιπέτα και αποστειρωμένο ρύγχος προσθέτουμε σε μία κυψελίδα 100μL προκαλλιέργειας και 3900μL καθαρού υποστρώματος, προς τελικό όγκο 4mL με αναλογία αραιώσης 1:40. Φωτομετρούμε το δείγμα και υπολογίζουμε την απορρόφηση της μη αραιωμένης προκαλλιέργειας με τον τύπο $A_1=A*40$, όπου A_1 : απορρόφηση μη αραιωμένης προκαλλιέργειας, A: απορρόφηση αραιωμένης προκαλλιέργειας.

Υπολογίζουμε την ποσότητα προκαλλιέργειας που πρέπει να προσθέσουμε στο καθαρό υπόστρωμα Mueller-Hinton (MH) για να επιτύχουμε απορρόφηση εμβολίου $A_2=0,100$ (με αποδεκτά όρια 0,85-0,120) με τον τύπο $V_{in}=(0,1*V_{MH})/(A_1-0,1)$, όπου V_{in} : όγκος προστιθέμενης προκαλλιέργειας με mL, V_{MH} : όγκος υποστρώματος MH. Προσθέτουμε την ποσότητα που υπολογίσαμε και φωτομετρούμε το εμβόλιο αφού πρώτα μηδενίσουμε το φασματοφωτόμετρο με καθαρό MH.

Σε περίπτωση απόκλισης από τα αποδεκτά όρια 0,85-0,120 εφαρμόζουμε τους παρακάτω τύπους διόρθωσης:

- *Εάν η απορρόφηση είναι κάτω της αποδεκτής τιμής εφαρμόζουμε τον τύπο:*

$$V_{in2} = [V_{in1} * (0,1 - A_2)] / A_2$$

Όπου:

V_{in1} : Όγκος προκαλλιέργειας κατά την πρώτη προσθήκη

V_{in2} : Όγκος προκαλλιέργειας που θα προσθέσουμε για διόρθωση

A_2 : Τιμή της απορρόφησης μετά από την πρώτη προσθήκη

- Εάν η απορρόφηση είναι άνω της αποδεκτής τιμής εφαρμόζουμε τον τύπο:

$$V_{MH} = [(A_2 - 0,1) * V_{in1}] / A_2$$

Όπου:

V_{MH} : Όγκος Mueller-Hinton που θα προσθέσουμε για διόρθωση

V_{in1} : Όγκος προκαλλιέργειας κατά την πρώτη προσθήκη

A_2 : Τιμή της απορρόφησης μετά από την πρώτη προσθήκη

Εμβολιασμός

Σημειώνουμε στους αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες την ονομασία του μικροοργανισμού που θα προσθέσουμε, των κωδικό της αντιμικροβιακής ουσίας, τον αριθμό της αραιώσης και την ποσότητά της. Για κάθε αντιμικροβιακή ουσία το πείραμα θα γίνει εις διπλούν. Επίσης ετοιμάζουμε εις τριπλούν μάρτυρες με καθαρό DMSO σε ποσότητες 100μL, 50μL και 20μL.

Με μικροπιπέτα και αποστειρωμένο ρύγχος κοντά σε φλόγα, προσθέτουμε στους δοκιμαστικούς σωλήνες την ανάλογη ποσότητα της επιλεγμένης αντιμικροβιακής ουσίας, περνώντας κάθε φορά το στόμιο του σωλήνα από την φλόγα μόλις τον ανοίξουμε και πριν τον ξανακλείσουμε.

Με την ίδια διαδικασία προσθέτουμε το εμβόλιο σε κάθε σωλήνα (και τους μάρτυρες), με τόση ποσότητα ώστε να έχουμε τελικό όγκο 1mL και αναδεύουμε σε vortex.

Προς αποφυγή διαστραυρούμενης επιμόλυνσης, το ρύγχος της μικροπιπέτας πρέπει να αντικαθίσταται με άλλο, αποστειρωμένο ρύγχος, κάθε φορά που προσθέτουμε διαφορετική αντιμικροβιακή ουσία, διαφορετικό μικροοργανισμό ή σε περίπτωση που έρθει σε επαφή το ρύγχος με την αντιμικροβιακή ουσία κατά την προσθήκη του μικροοργανισμού.

Ο εμβολιασμός πρέπει να γίνεται όσο το δυνατόν συντομότερα από τη στιγμή της δημιουργίας του εμβολίου.

Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία του εμβολιασμού, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε επωαστήρα με την βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού και υπό ανάδευση στις 200 στροφές/λεπτό για 24 ώρες.

Λήψη αποτελεσμάτων

Με την ίδια διαδικασία που κατασκευάσαμε το υγρό υπόστρωμα, προετοιμάζουμε διάλυμα φυσιολογικού ορού 0,8% (8g NaCl σε 1L H₂O).

Αφαιρούμε τους δοκιμαστικούς σωλήνες από τον επωαστήρα και παρατηρούμε σε ποιους υπήρξε εμφανής ανάπτυξη (θολερότητα) και σε ποιους δεν υπήρξε (διαυγές).

Προσθέτουμε 5mL φυσιολογικού ορού σε κάθε σωλήνα που θα φωτομετρήσουμε, στους μάρτυρες, καθώς και σε ένα αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα όπου έχουμε προσθέσει 1mL καθαρού ΜΗ, ο οποίος θα χρησιμοποιηθεί για μηδενισμό του φωτόμετρου και αναδεύουμε σε vortex.

Φωτομετρούμε στα 600nm και για στατιστικούς λόγους συγκρατούμε την τιμή απορρόφησης της συγκέντρωσης όπου παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης (<0,100), καθώς και την τιμή των 3 αμέσως επόμενων διαδοχικών αραιώσεων.

Για κάθε μία φωτομέτρηση χρησιμοποιούμε διαφορετική κυψελίδα.

Καθαρισμός και αποστείρωση

Πριν και μετά από κάθε πειραματική διαδικασία οι επιφάνειες εργασίας πρέπει να αποστειρώνονται και οι ερευνητές να πλένουν καλά τα χέρια τους με απολυμαντικό. Επίσης στον χώρο του εργαστηρίου οι ερευνητές πρέπει να φορούν ειδική ποδιά, προστατευτικά γάντια latex, προστατευτικά γυαλιά και να χειρίζονται τους μικροοργανισμούς μέσα σε biosafety cabinet. Οι κωνικές φιάλες που περιέχουν μικροοργανισμούς αποστειρώνονται σε κλίβανο πριν πλυθούν. Τα ρύγχη για τις μικροπιπέτες αποστειρώνονται σε κλίβανο πριν τη χρήση τους. Μετά τη χρήση τους σε διάλυμα που περιείχε μικροοργανισμό πρέπει να απορρίπτονται σε δοχείο και να αποστειρώνονται σε κλίβανο μαζί με το δοχείο. Οι κυψελίδες φωτομέτρησης που χρησιμοποιήθηκαν με διάλυμα μικροοργανισμού πρέπει επίσης να αποθηκεύονται σε δοχείο και να αποστειρώνονται σε κλίβανο μαζί με το δοχείο.

Λόγω της ανάγκης για 24ωρη επώαση των μικροοργανισμών, η πειραματική διαδικασία χωρίζεται σε 3 ημέρες. Την 1^η ημέρα γίνεται η δημιουργία του υγρού υποστρώματος και η δημιουργία της προκαλλιέργειας. Την 2^η ημέρα γίνεται η δημιουργία του εμβολίου και ο εμβολιασμός. Την 3^η ημέρα γίνεται η λήψη των αποτελεσμάτων.