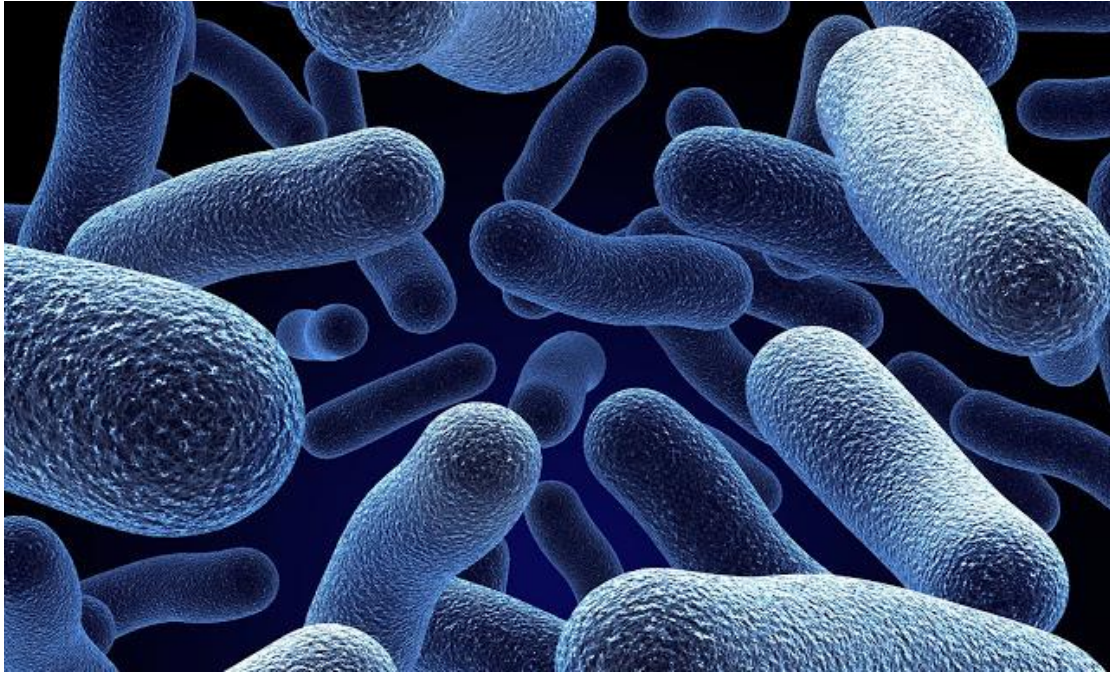




**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ**



**Προσδιορισμός Ελάχιστης Ανασταλτικής
Συγκέντρωσης (MIC) σε Κινολόνες και Σύμπλοκα
Μετάλλων**

**Πτυχιακή Εργασία Των: Ντουκουμέ Παναγιώτα
Διαμαντούλη Αθανασία**

Εισηγητής: Καλογιάννης Σταύρος

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2015

Ευχαριστίες

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

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

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

Ευχαριστούμε τον κ. Γεώργιο Ψωμά για την ευγενική χορηγία του στις κινολόνες και στα σύμπλοκα μετάλλων.

Ευχαριστίες θα θέλαμε να αποδώσουμε στον κ.Δήμα που μας παραχωρούσε το εργαστήριο φυτικής παραγωγής ώστε να ολοκληρώσουμε τη διεξαγωγή του πειράματος.

Περίληψη

Εισαγωγή Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) έχει πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων αλλά και στη καθημερινή ζωή. Ως εργαλείο έρευνας η MIC παρέχει μια ξεκάθαρη ενδεικτική σύγκριση της δραστηριότητας ανάμεσα σε διαφορετικές ενώσεις.

Σκοπός Της παρούσας μελέτης είναι να προσδιορισθεί η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του αντιβιοτικού με σύμπλοκα μετάλλων που θα αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού μετά από ολονύκτια επώαση. Ωστόσο εφαρμόστηκε και μια μέθοδος παρακολούθησης on- line της κινητικής ανάπτυξης των μικροοργανισμών για 48 ώρες σε πλάκες ELISA στηριγμένη την οπτική απορρόφηση στα 600 nm παρουσία των υπό μελέτη αντιμικροβιακών παραγόντων.

Συμπεράσματα-Αποτελέσματα Στο σύνολο της δοκιμής MIC τα σύμπλοκα σε συνδυασμό με τις κινολόνες Oxolinic acid, Flumequine δεν παρουσίασαν αυξημένη αντιμικροβιακή δράση. Ωστόσο στην on-line μέθοδο παρατηρήθηκε πως ο σχηματισμός συμπλόκων ενώσεων τροποποιεί τον τρόπο με τον οποίο επιβραδύνεται η μικροβιακή ανάπτυξη, υποδεικνύοντας πιθανώς πως κάποιες από τις συμπλοκές ενώσεις που συντέθηκαν έχουν διαφορετικό μηχανισμό δράσης από το ligand. Ωστόσο περισσότερα στοιχεία απαιτούνται προκειμένου να μπορεί να γίνει πλήρης αξιολόγηση και αξιοποίηση του μεγάλου όγκου δεδομένων που προκύπτουν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (MIC)	5
1.1.1. Ορισμός Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης	5
1.2. Σύμπλοκα Μετάλλων (Metal Complexes)-Κινολόνες (Quinolones) Προσδέτες (Ligand)	6
1.2.1. Σύμπλοκα Μετάλλων (Metal Complexes).....	6
1.2.2 Κινολόνες (Quinolones).....	7
1.2.3. Προσδέτες (Ligands).....	9
1.2.4. Αντιμικροβιακή δράση του συμπλόκου Μετάλλου- Κινολόνης	10
1.3. Βακτηριακά Στελέχη	11
1.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.3.2. <i>Escherichia coli</i>	13
1.3.3. <i>Bacillus subtilis</i>	13
1.3.4. <i>Xanthomonas campestris</i>	15
1.4. ΣΚΟΠΟΣ.....	16
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	17
2.1. Μικροβιακά στελέχη	17
2.2. Θρεπτικά μέσα	17
2.2.1. Άλλα θρεπτικά μέσα.....	18
2.3. Ενοφθαλμισμός του στερεού μέσου ανάπτυξης με το Μικροοργανισμό	18
2.4. Συντήρηση μικροοργανισμών	19
2.5. Προκαλλιέργεια- Ενοφθαλμισμός του υγρού μέσου ανάπτυξης με το μικροοργανισμό από στερεή καλλιέργεια	19
2.6. Δείγματα για αντιμικροβιακή δράση	20
2.7. Όργανα	21

2.8. Προσδιορισμός MIC	21
2.9. Διαδικασία παρακολούθησης της ανάπτυξης με την επίδραση αντιμικροβιακών παραγόντων	23
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	25
3.1. Oxolinic acid	26
3.1.1. <i>X.campestris</i>	27
3.1.2. <i>S.aureus</i>	28
3.1.3. <i>B.subtilis</i>	29
3.1.4. <i>E.coli</i>	30
3.2. Flumequine.....	31
3.2.1.. <i>X.campestris</i>	32
3.2.2. <i>S.aureus</i>	33
3.2.3. <i>B.subtilis</i>	34
3.2.4. <i>E.coli</i>	35
3.3. Αραιώσεις αντιμικροβιακού και συμπλόκων μετάλλων	36
3.3.1.Επίδραση αντιμικροβιακού στην καμπύλη ανάπτυξης	37
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	41
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	43

1.Εισαγωγή

1.1. Ελάχιστες Ανασταλτικές Συγκεντρώσεις (MIC)

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) θεωρείται ο «χρυσός κανόνας» για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των οργανισμών σε αντιβιοτικά και ως εκ τούτου χρησιμοποιούνται για να κρίνουν την απόδοση ευαισθησίας όλων των άλλων με 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 δοκιμών, 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 mg/L, 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 ανάπτυξη 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 ένα 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 και Parish 1989). Επί του παρόντος, οι σωλήνες έχουν αντικατασταθεί από μια ημι-αυτοματοποιημένη μέθοδο μικρο-τιτλοδότησης. Η θολότητα του περιεχομένου του κάθε σωλήνα που παρατηρείται, επηρεάζεται από την δοκιμή και οι δείκτες 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)].

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 ligand, για συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη.

1.2. Σύμπλοκα μετάλλων (Metal Complexes)- Κινολόνες (Quinolones) και Προσδέτες (Ligands)

1.2.1 Σύμπλοκα μετάλλων (Metal complexes)

Ένα σύμπλοκο μετάλλου αποτελείται από ένα κεντρικό άτομο ή κατιόν, το οποίο συνήθως είναι μεταλλικό και καλούνται 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).

Πολλά σύμπλοκα μετάλλων 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 προς 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).

1.2.2 Κινολόνες (Quinolones)

Οι κινολόνες είναι συνθετικά αντιβιοτικά ευρέως –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 δύο αντιβακτηριακά ένζυμα-κλειδιά, την DNA-γυράση (τοποϊσομεράσης II) και την DNA τοποϊσομεράση 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:

I. Κινολόνες Πρώτης Γενιάς:

- Δραστικές έναντι gram αρνητικών βακτηριδίων.
- Υψηλής πρωτεϊνικής σύνδεσης.
- Βραχεία ημιζωή.
- Χαμηλού ορού και συγκεντρώσεων των ιστών.

- Απλές λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος. Από του στόματος χορήγηση.

II. Κινολόνες Δεύτερης Γενιάς:

A' Κλάσης

- Αυξημένη δραστικότητα έναντι των Gram αρνητικών βακτηριδίων.
- Πρωτεϊνική Δέσμευση κατά ποσοστό 50%.
- Μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής από ότι η πρώτη γενιά.
- Μετρίου ορού και συγκεντρώσεων των ιστών.
- Απλές ή περίπλοκες λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος.
- Από του στόματος χορήγηση.

B' Κλάσης

- Αυξημένη δραστικότητα έναντι των Gram αρνητικών βακτηριδίων.
- Πρωτεϊνική Δέσμευση κατά ποσοστό 20%-50%.
- Μετρίου έως μακρύ χρόνου ημιζωής.
- Υψηλότερες συγκεντρώσεις στον ορό και στους ιστούς σε σχέση με την A' Κλάση.
- Περίπλοκες λοιμώξεις του ουροποιητικού, γαστρεντερίτιδα, προστατίτιδα, νοσοκομειακές λοιμώξεις.
- Από του στόματος και ενδοφλέβια χορήγηση.

III. 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.

IV. Κινολόνες Τέταρτης Γενιάς:

- Εκτεταμένη δραστηριότητα ενάντια σε Gram θετικά και Gram αρνητικά βακτήρια.
- Ενεργείς ενάντια 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., Malone R., Lilley S.H., 2000), (Zhanel, G.G. et al., 1999)

Οι κινολόνες που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες της πειραματικής διαδικασίας είναι, το Oxolinic acid και η Flumequine τα οποία ανήκουν στις κινολόνες πρώτης γενιάς.

Oxolinic acid : Το οξολινικό οξύ ανήκει στις κινολόνες, που αποτελούν συνθετικά καρβοξυλικά οξέα. Έχει βακτηριοκτόνο δράση αναστέλλοντας το ένζυμο DNA-γυράση, που είναι απαραίτητο για τη σύνθεση των βακτηριακών πυρηνικών οξέων και για την αδιάσπαστη περιέλιξη των ελίκων του βακτηριακού DNA. Το οξολινικό οξύ είναι δραστικό εναντίον των λοιμώξεων που οφείλονται τόσο σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια όσο και σε Gram θετικά βακτήρια.

Flumequine: είναι ένα συνθετικό αντιβιοτικό χρησιμοποιείται για την θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων. Είναι πρώτης γενιάς φθοριοκινολόνη που έχει απομακρυνθεί από την κλινική χρήση και δεν είναι πλέον στο εμπόριο. Η φλουμεκίνη χρησιμοποιήθηκε στην κτηνιατρική ως φάρμακο για την θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων, αλλά μόνο σε περιορισμένο αριθμό χωρών. Είναι δραστική σε Gram αρνητικά, αλλά και Gram θετικά βακτήρια.

1.2.3. 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 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 της ίδιας και το κεντρικό άτομο μετάλλου ή ιόντος (Chemicoool.com, 2014). Τα ligands των κινολονών με τα σύμπλοκα μετάλλων που έλαβαν μέρος στον προσδιορισμό των MIC, απεικονίζονται αναλυτικά σε πίνακες στο κεφάλαιο 3 των αποτελεσμάτων.

1.2.4. 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 συμπλόκων βασίζεται στα αποτελέσματα των ελάχιστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων (MICs) ενάντια κατά Gram θετικών ή κατά Gram-αρνητικών μικροοργανισμών κύριοι παράγοντες για τη 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.

Η διαφοροποίηση των ligands γίνεται προφανής μεταξύ πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενιάς κινολονών. Χαρακτηριστικές κινολόνες πρώτης γενιάς (Οξαλικό οξύ και πιπεμιδικό οξύ), δείχνουν σημαντική μείωση της δραστηριότητάς τους σε σύγκριση με κινολόνες δεύτερης (ενροφλοξακίνη και N-προπυλο-νορφλοξακίνη) και τρίτης γενιάς (σπαρφλοξακίνη), όχι μόνο ως ελεύθερες κινολόνες αλλά και στα σύμπλοκα τους. Η καλύτερη ανασταλτικότητα έναντι των τριών μικροοργανισμών που έχουν δοκιμαστεί, παρέχονται από το σύμπλοκο [Cu (ERX) 2 (H₂O)], το οποίο είναι ένα ligand κινολόνες δεύτερης γενιάς (Uivarosi Valentina 2013)

1.3. 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 Enterodacteriaceae
- Ο *Bacillus subtilis* της οικογένειας Bacillaceae και
- Η *Xantomonas campestris* της οικογένειας Xanthomonadacea

1.3.1 *Staphylococcus aureus*

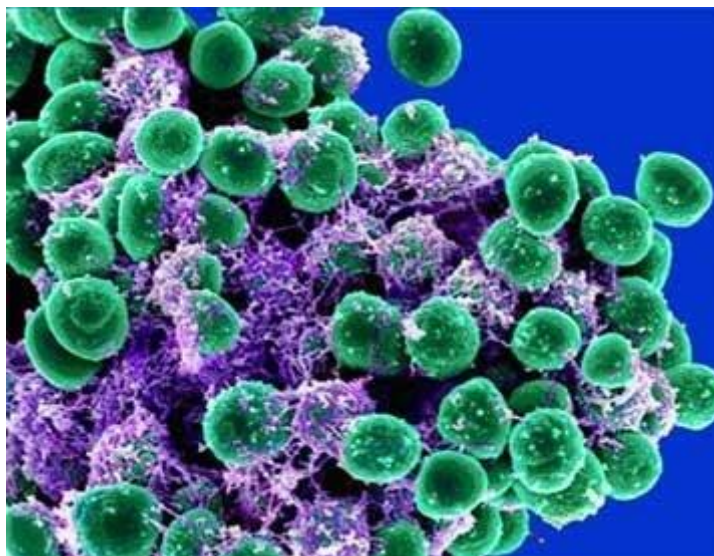
Οι Σταφυλόκοκκοι είναι μικροοργανισμοί και συγκεκριμένα βακτήρια. Κατατάσσονται στα δυνητικά αερόβια καταλάση-θετικά γένη των Gram-θετικών κόκκων. Τα βασικά τους χαρακτηριστικά είναι:

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

Το όνομά 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 $^{\circ}\text{C}$.

Εικόνα 1: Στέλεχος *Staphylococcus aureus*



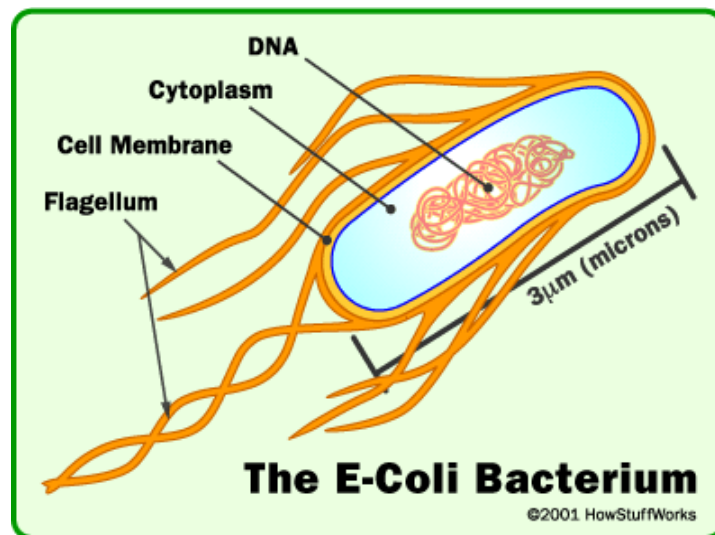
Οι σταφυλόκοκκοι απαντώνται στο δέρμα και στους ανθρώπινους βλεννογόνους. Μερικοί από αυτούς απαντώνται σε συγκεκριμένες θέσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Είναι σημαντικά παθογόνα για τον άνθρωπο και προκαλούν ένα ευρύ φάσμα απειλητικών για τη ζωή λοιμώξεων στο δέρμα, στα μαλακά μόρια, στα οστά, στην ουροποιητική οδό καθώς και ευκαιριακές λοιμώξεις. Οι σταφυλόκοκκοι, εκτός του Σταφυλόκοκκου 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 χωρίς τη χρήση αντιβιοτικών. Η ανάπτυξη 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).

1.3.2. *Escherichia coli*

Το *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 *E-coli*



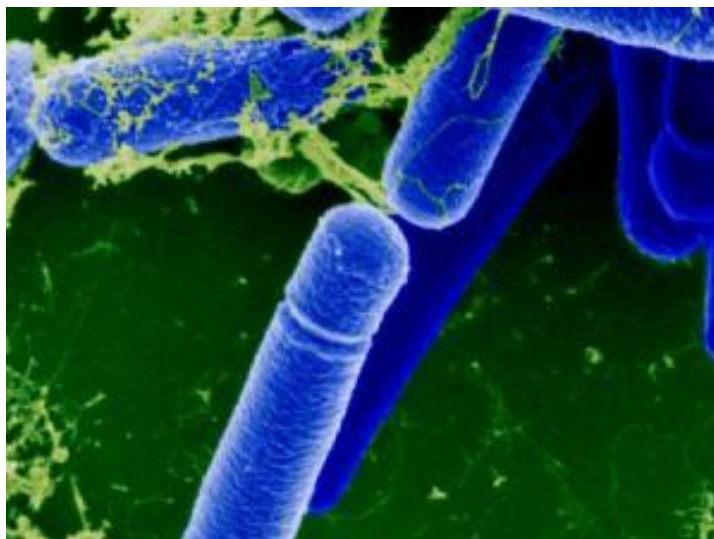
Απαντώνται συχνά στα κόπρανα των ζώων και των ανθρώπων. Επίσης, όταν βρεθεί σε διπλανά όργανα όπως την ουροδόχο κύστη μπορεί να προκαλέσει ουρολοίμωξη. Το βακτήριο δεν αντέχει σε υψηλές θερμοκρασίες και πεθαίνει όταν ζεσταίνεται στους 70 °C για αρκετό χρονικό διάστημα, ενώ μπορεί να επιβιώσει στο ψυγείο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

1.3.3. *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 *B. Subtilis*



Ο *B. subtilis* είναι μόνο γνωστό, ότι προκαλεί νόσο σε σοβαρά ανοσοανεπαρκείς 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 σουμπτιλίσινης. Τα σπόρια του *B. subtilis* μπορούν να επιβιώσουν την υπερβολική ζέστη στο οποίο εκτίθενται κατά το μαγείρεμα.

Αν και αυτό το είδος βρίσκεται συνήθως στο έδαφος, περισσότερα στοιχεία δείχνουν ότι *B. subtilis* είναι ένα κανονικό συμβιωτικό έντερο 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 συμβατικό έντερο.

1.3.4. *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 πολυσακχατίτη υψηλού μοριακού βάρους που ονομάζεται κόμμι ξανθάνης (Katzen Federico et al., 1998).

Εικόνα 4: *X. campestris*



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 πρόληψη διαχωρισμού δυο συστατικών). Αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες πεντασακχαρίτη, που περιλαμβάνει γλυκόζη, μαννόζη και γλυκουρονικό οξύ. Παράγεται 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 σε μια λεπτή σκόνη (Barrere G.C. et al. 1986)

1.4.Σκοπός πειραματικής διαδικασίας

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 κινολονων 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)

Οι κινολόνες που χρησιμοποιήθηκαν ως ligand και τα αντίστοιχα μέταλλα για το σχηματισμό σύμπλοκων ενώσεων είναι:

- Το Oxolinic acid με σύμπλοκα Co και
- Η Flumequine με σύμπλοκα Co και Cu

Ωστόσο, σύμφωνα με μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η κοινή off-line παρακολούθηση κατά τον προσδιορισμό του τελικού σημείου μετά από 18- 24 ώρες, θα μπορούσε να μην είναι επαρκής για αξιόπιστη ανάπτυξη και αξιολόγηση της ευαισθησίας των αντιβιοτικών. Για το λόγο αυτό εφαρμόστηκε μια μέθοδος παρακολούθησης on- line της κινητικής ανάπτυξης των μικροοργανισμών για 48 ώρες σε πλάκες ELISA στηριγμένη την οπτική απορρόφηση στα 600 nm παρουσία των υπό μελέτη αντιμικροβιακών παραγόντων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Μικροβιακά στελέχη

Προσδιορίστηκαν οι MIC στα εξής μικροβιακά στελέχη

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

Το μικροβιακό στέλεχος *Xanthomonas campestris* ήταν ευγενική προσφορά του κ. Χαράλαμπου Κοτζαμανίδη, Ελληνική Βιομηχανία Ζάχαρης Α.Ε. και τα υπόλοιπα της κ. Ελένης Λυκοτραφίτη, τμήμα τεχνολογίας Τροφίμων, ΤΕΙ Θεσσαλονίκης.

2.2 Θρεπτικά μέσα

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

Πίνακας 2.2.1: Σύσταση ανά 100ml του θρεπτικού μέσου Nutrient-Broth Agar

Peptone	0.5g
Meat extract	0.3g
Agar	2g

Πίνακας 2.2.2: Σύσταση ανά 100ml του θρεπτικού μέσου Luria Broth – Agar

Tryptone	1g
Yeast extract	0.5g
NaCl	1g
Agar	2g

Πίνακας 2.2.3: Σύσταση ανά 100ml του θρεπτικού μέσου Yeast and Mold Broth- Agar

Yeast Extract	0.3g
Malt Extract	0.3g
Peptone	0.5g
Dextrose	1 g
Agar	2 g

2.2.1. Άλλα θρεπτικά μέσα

Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστικού οίκου, για τη Παρασκευή του Muellern Hinton αρκεί να διαλυθούν 21g σκόνης, σε ένα λίτρο μέσου με ανάδευση ακολουθώντας τις οδηγίες, όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα.

2.3.Ενοφθαλισμός του στερεού μέσου ανάπτυξης με το μικροοργανισμό

Αρχικά ο κρίκος αποστειρώνεται με πυράκτωση στη φλόγα και εμβαπτίστηκε στην υγρή καλλιέργεια.

Ακολούθησε η σπορά με εγκάρσιες γραμμές στο κεκλιμένο άγαρ με προσοχή προς αποφυγή επιμόλυνσης της καλλιέργειας και πάντα δουλεύοντας κοντά στη φλόγα. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν

ανεστραμμένοι στο κλίβανο επώασης για την ανάπτυξη των αποικιών στην επιφάνεια. Πρέπει να σημειωθεί ότι όλη η διαδικασία του ενοφθαλισμού πραγματοποιήθηκε εντός του biosafety cabinet και σε στείρες συνθήκες προς αποφυγή οποιαδήποτε επιμόλυνσης.

Πίνακας 2.3.1 : Θερμοκρασίες επώασης μικροοργανισμών (24h)

Xanthomonas campestris	28 ° C
Escherichia coli	35 ° C
Bacillus subtilis	35 ° C
Staphylococcus aureus	35 ° C

2.4. Συντήρηση μικροοργανισμών

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

Πίνακας 2.4.1: Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ανά μικροοργανισμό

Nutrient Broth- Agar	Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus
YM- agar	Xanthomonas campestris
Luria Broth- Agar	Escherichia coli

2.5 Προκαλλιέργεια- Ενοφθαλισμός του υγρού μέσου ανάπτυξης με το μικροοργανισμό από στερεή καλλιέργεια

Μετά την αποστείρωση του κρίκου λαμβάνετε μικρή ποσότητα από τη παραπάνω στερεή καλλιέργεια. Στη συνέχεια περνάμε το στόμιο του δοκιμαστικού σωλήνα από τη φλόγα και προσθέτουμε το ανυδρόφιλο βαμβάκι. Βυθίζουμε το κρίκο μέσα σε 20ml υγρό θρεπτικό υλικό. Κινούμε τον

κρίκο για λίγο πάνω-κάτω, βγάζουμε τον κρίκο. Έπειτα αποστειρώνουμε στη φλόγα. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε εντός του biosafety cabinet και σε στείρες συνθήκες. Τέλος τοποθετούμε τη κωνική στον επωαστικό κλίβανο στη κατάλληλη θερμοκρασία ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε μικροοργανισμού (πίνακας 4) σε ανάδευση 200 στροφών για περίπου 24h.

2.6 Δείγματα για αντιμικροβιακή δράση

Οι κινολόνες με τα σύμπλοκα τους ήταν ευγενική χορηγία του κ. Γεωργίου Ψωμά, Τμήματος χημείας Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Πίνακας 2.6.1: Δείγματα για αντιμικροβιακή δράση

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΤΥΠΟΣ
Hoxo	Oxolinic acid
HE-O1	[Co(oxo) ₂ (MeOH) ₂]
HE-O6	[Co(oxo) ₂ (bipy)]
HE-04	[Co(oxo) ₂ (bipyam)]
HE-17	[Co(oxo) ₂ (phen)]
HE-12	[Co(oxo) ₂ (py) ₂]
HE-16	[Co(oxo) ₂ (4bzpy) ₂]
Hflmq	Flymequine
IT-01	[Co(flmq) ₂ (MeOH) ₂]
IT-04	[Co(flmq) ₂ (bipy)]
IT-19	[Co(flmq) ₂ (bipyam)]
IT-12	[Co(flmq) ₂ (phen)]
XE-01	[Co(flmq) ₂ (H ₂ O) ₂]
XE-07	[Co(flmq) ₂ (phen)Cl]
XE-08	[Co(flmq) ₂ (bipy)Cl]
XE-12	[Co(flmq) ₂ (py) ₂]
XE-20	[Co(flmq) ₂ (bipyam)Cl]

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

2.7. Όργανα

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή του πειράματος είναι τα εξής:

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

2.8. Προσδιορισμός MIC

Η διαδικασία που ακολουθήσαμε για το προσδιορισμό MIC ήταν όμοια για τα ligand , τα συμπλοκα και τους μικροοργανισμούς. Αναλυτικότερα εφαρμόστηκαν τα παρακάτω

1^η μέρα

Αρχικά γίνεται ενοφθαλμισμός του μικροοργανισμού από στερεή σε υγρή καλλιέργεια 20ml υπό στείρες συνθήκες

Οι αραιώσεις των συμπλόκων δεν είναι απαραίτητο να γίνουν υπό στείρες συνθήκες και πραγματοποιούνται σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία

Λαμβάνουμε σωληνάκια erpendorf που περιέχουν, αρχικό στερεό δείγμα ligand και συμπλόκων ποσότητας 5mg το καθένα. Στην συνέχεια προσθέτουμε 1ml DMSO με πιπέτα του 1ml. Έπειτα ακολουθεί διάλυση με τη βοήθεια συσκευής Vortex ή υπερήχων, οπότε προκύπτει διάλυμα

συγκέντρωσης 5.000mg/ml. Στη συνέχεια παρασκευάζεται 50ml αραίο διάλυμα DMSO συγκέντρωσης 5%

Τοποθετούνται 5 σειρές από 11 σωληνάκια errendorf. Πάνω σε κάθε σωληνάκι σημειώνουμε αριθμούς από το 1 έως το 11 καθώς επίσης και τον κωδικό της ουσίας που περιέχει το καθένα. Στο σωληνάκι errendorf με νούμερο 1 προστίθενται 448μL από το αρχικό errendorf με συγκέντρωση 5000μg/ml και 952ml διαλύματος DMSO και αναδεύεται σε συσκευή vortex. Στη συνέχεια σε κάθε σειρά προστίθενται στα errendorf με αρίθμηση 2 εως 11 700μl διαλύματος DMSO. Σύμφωνα με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων μεταφέρονται 700μl στο επόμενο αντίστοιχο σωληνάκι του καθενός και αναδεύονται σε συσκευή vortex.

Πίνακας 2.8.1: Αραιώσεις ligand – συμπλόκων μετάλλων

Αρίθμηση δειγμάτων	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
μg/ml στο Errendorf	1600	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,563
μg/ml στο δοκ.σωλήνα	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03

Τα δείγματα που προέκυψαν φυλάσσονται για περαιτέρω δοκιμές.

2^η μέρα:

Στα διαλύματα των εμβολιασμών που παρασκευάστηκαν την προηγούμενη ημέρα, εξετάστηκε η κυτταρική ανάπτυξη των μικροοργανισμών με φωτομετρική μέτρηση των διαλυμάτων στα 600 nm. Προκειμένου να χρωμετρηθούν τα διαλύματα αραιώθηκαν με φυσιολογικό ορό σε αναλογία 1:10. Σύμφωνα με τον τύπο της αραιώσης υπολογίστηκε η κατάλληλη ποσότητα του βακτηριακού διαλύματος, το οποίο προστέθηκε στη συνέχεια σε μέσο ανάπτυξης Mueller Hinton. Προκειμένου να εξακριβωθεί ότι προστέθηκε η επιθυμητή ποσότητα βακτηριακού διαλύματος πραγματοποιήθηκε φωτομετρική μέτρηση στα 600nm μετά την αραιώση.

Για κάθε περίπτωση ligand και συμπλόκων δοκιμάστηκε από δυο φορές η επίδρασή τους στην ανάπτυξη του βακτηριακού πληθυσμού. Πιο συγκεκριμένα σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 20μL από κάθε

3^η μέρα:

Από τη σειρά των δοκιμαστικών σωλήνων εντοπίστηκαν οι σωλήνες με τη μικρότερη συγκέντρωση στους οποίους δεν εντοπίστηκε θόλωμα. Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε για κάθε ένωση ξεχωριστά και καταγράφηκαν τα αποτελέσματα.

2.9.Διαδικασία παρακολούθησης της ανάπτυξης με την επίδραση αντιμικροβιακών παραγόντων

Η Μέτρηση πραγματοποιείται μετά τον προσδιορισμό MIC.

Μέρος 1^ο

Προσθήκη αντιμικροβιακού παράγοντα στην πλάκα.

Προστέθηκαν 20 μL επιλεγμένης συγκέντρωσης στα βοηθία

Μέρος 2^ο

Προσθήκη εμβολίου

1. Παρασκευάζεται όπως το εμβόλιο για τις καλλιέργειες προσδιορισμού MIC με τη διαφορά πως στόχος είναι η τελική απορρόφηση να είναι 0,150 και ο όγκος του παρασκευαζόμενου εμβολίου είναι 25 mL.

2. Το παρασκευασθέν εμβόλιο με τη σωστή απορρόφηση (A_{600}) μεταφέρεται στη βάση γεμίσματος πολυπιπέτας.

3. Προσθήκη 230μL του παρασκευασμένου εμβολίου σε όλα τα βοηθία.

Μέρος 3^ο

Μέτρηση ανάπτυξης εμβολίων

1. Καλύπτουμε την πλάκα.
2. Τη μεταφέρουμε στο ELISA plate reader στη Φυτική Παραγωγή.
3. Εισάγουμε την πλάκα.
4. Παραλαμβάνουμε τις μετρήσεις έπειτα από 48 ώρες.

3.Αποτελέσματα- Συζήτηση

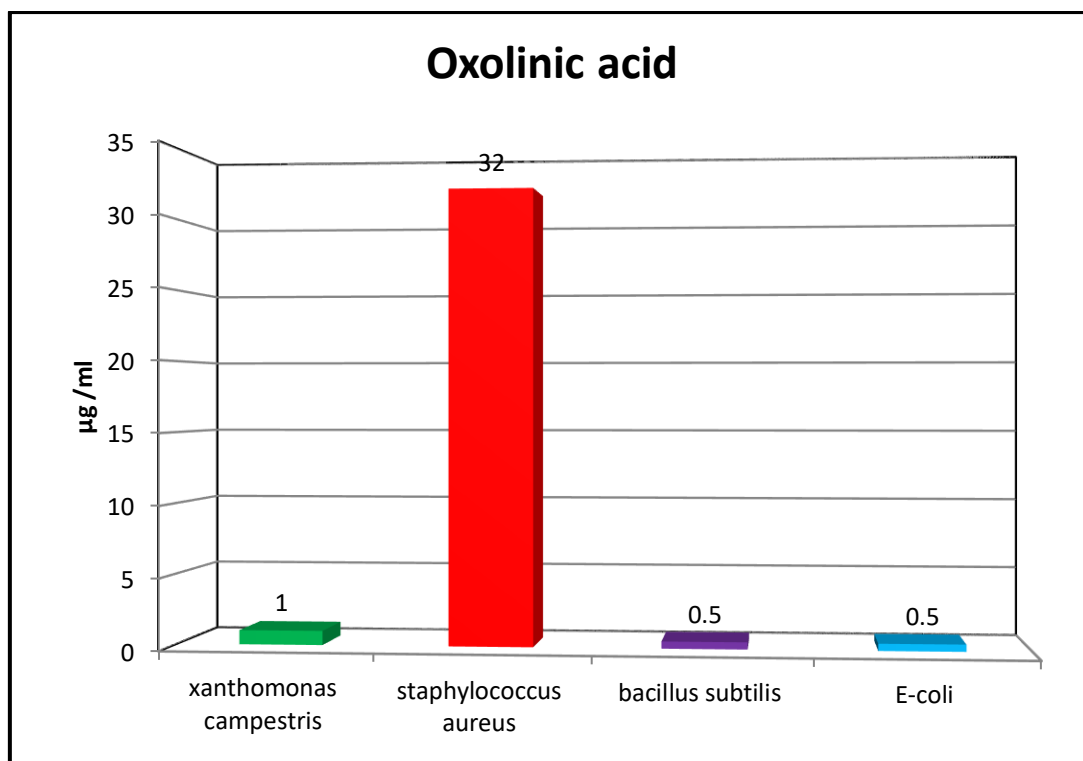
Οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MICs) που σημειώθηκαν στην παρούσα πειραματική μελέτη, για τις κινολόνες μόνο, αλλά και για τα ligand τους με σύμπλοκα μετάλλων, στα εξεταζόμενα βακτηριακά στελέχη, παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1: MIC κινολονών-Σύμπλοκα μετάλλων

ΤΥΠΟΣ	<i>Xanthomonas campestris</i> μg/ml	<i>Staphylococcus aureus</i> μg/ml	<i>Bacillus subtilis</i> μg/ml	<i>E-coli</i> μg/ml
Oxolinic acid	1	32	0,5	0,5
[Co(oxo) ₂ (MeOH) ₂]	1	32	0,5	0,5
[Co(oxo) ₂ (bipy)]	1	32	0,5	1
[Co(oxo) ₂ (bipyam)]	1	32	0,5	1
[Co(oxo) ₂ (phen)]	1	32	0,5	1
[Co(oxo) ₂ (py) ₂]	1	32	0,5	1
[Co(oxo) ₂ (4bzpy) ₂]	1	32	0,5	1
Flumequine	4	8	1	0,5
[Co(flmq) ₂ (MeOH) ₂]	8	32	2	2
[Co(flmq) ₂ (bipy)]	4	16	2	1
[Co(flmq) ₂ (bipyam)]	8	16	1	1
[Co(flmq) ₂ (phen)]	4	32	2	1
[Cu(flmq) ₂ (H ₂ O) ₂]	4	32	1	1
[Cu(flmq)(phen)Cl]	4	16	1	1
[Cu(flmq)(bipy)Cl]	4	16	2	1
[Cu(flmq) ₂ (py) ₂]	4	8	4	2
[Cu(flmq)(bipyam)Cl]	4	16	2	1

Η αντιμικροβιακή δράση και οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MICs) των κινολονών και των συμπλόκων τους, που αναφέρθηκαν και παραπάνω απεικονίζονται αναλυτικά στα διαγράμματα που ακολουθούν.

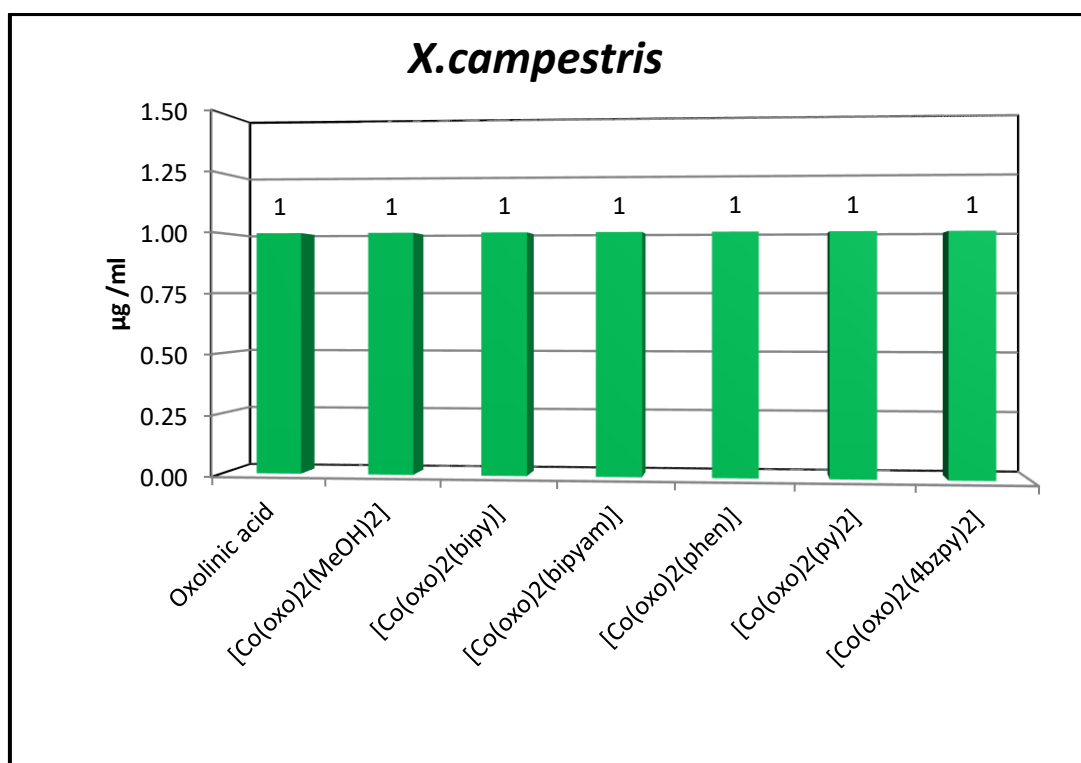
3.1. MIC *Oxolinic acid*



Διάγραμμα 1: MIC Oxolinic acid

Το οξολινικό οξύ ανήκει στις κινολόνες, που αποτελούν συνθετικά καρβοξυλικά οξέα και είναι δραστικό ενάντια σε Gram – αρνητικά βακτήρια. Στο διάγραμμα 1, διακρίνουμε ότι το Oxolinic acid είναι πολύ δραστικό (MIC:0,500 μg/ml) στα στελέχη της *E.coli*, που είναι Gram – αρνητικό βακτήριο, καθώς επίσης και στο στέλεχος του βακτηρίου *B.subtilis* (Gram θετικό). Στο στέλεχος της *X.campestris* το Oxolinic acid είναι λιγότερο δραστικό με MIC:1,00μg/ml. Το στέλεχος το *S.aureus* έδειξε την λιγότερη δραστικότητα με MIC: 32,00μg/ml

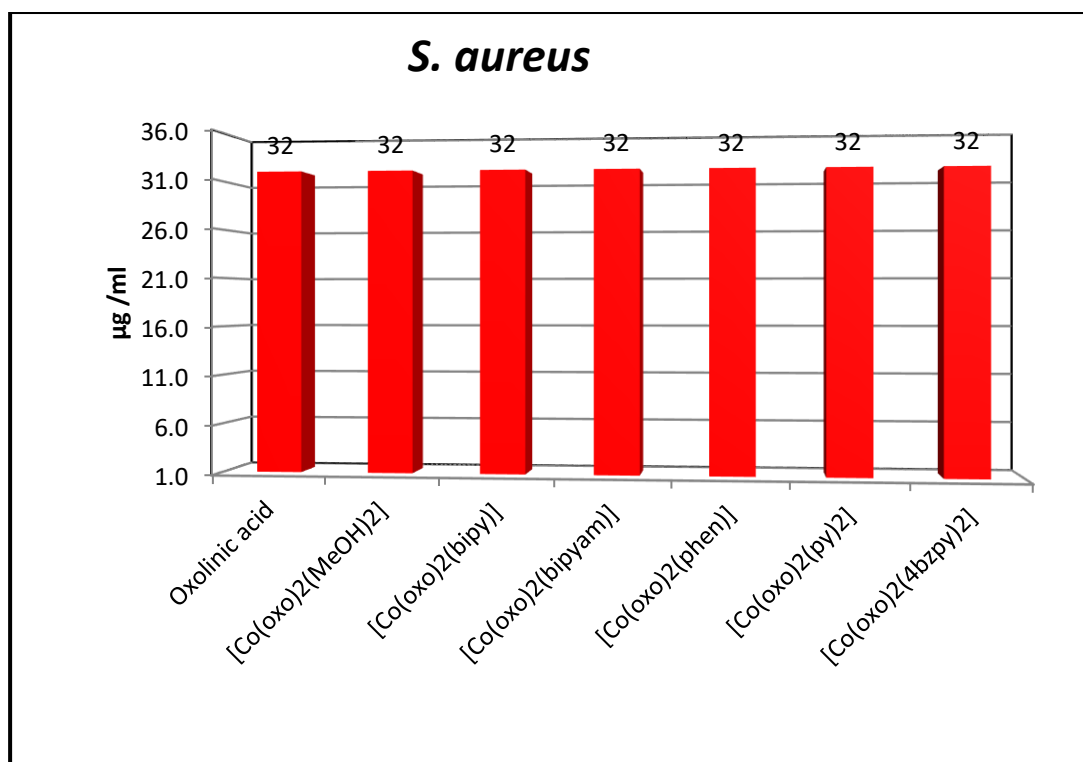
3.1.1. MIC *X. campestris*



Διάγραμμα 2: MIC *X. campestris*

Στο διάγραμμα 2 παρατηρούμε τις MICs των συμπλόκων με το Oxolinic acid. Όλα τα σύμπλοκα παρουσιάζουν την ίδια αντιμικροβιακή δράση (MIC 1,000 µg/ml) απέναντι στην αρνητική κατά Gram *X. campestris*.

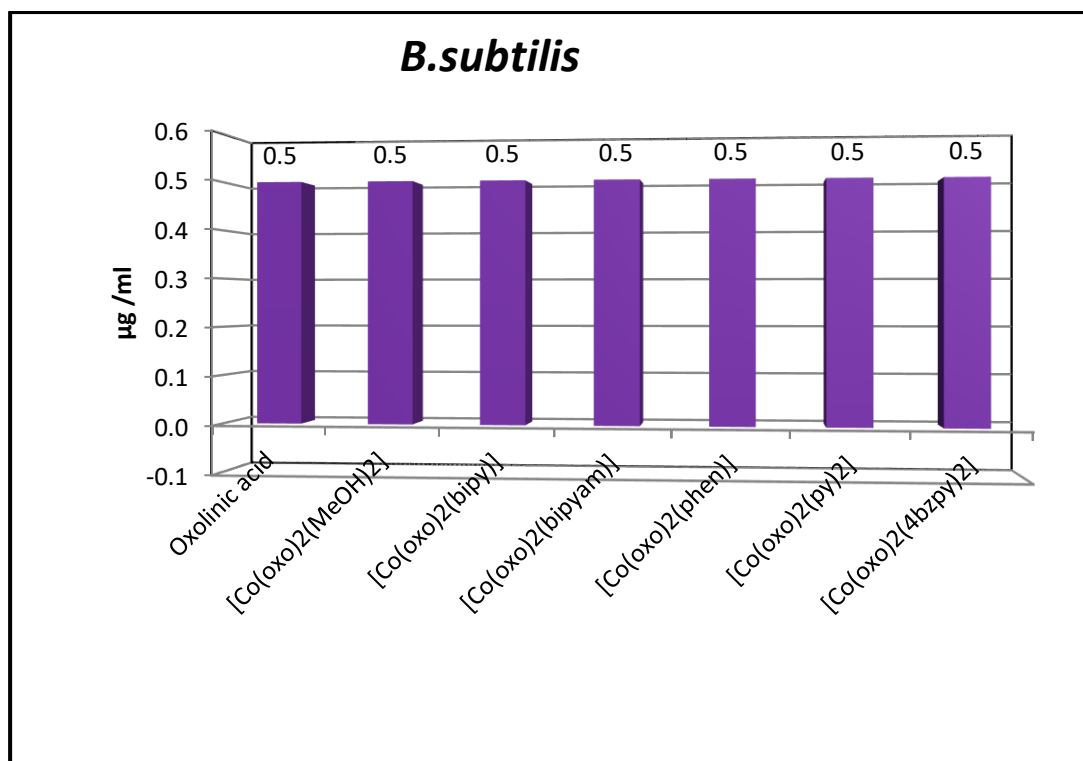
3.1.2. MIC *S.aureus*



Διάγραμμα 3: MIC *S.aureus*

Στο διάγραμμα 3 παρατηρούμε τις MICs των συμπλόκων του Oxolinic acid. Συγκεκριμένα τα σύμπλοκα παρουσιάζουν την ίδια αντιμικροβιακή δράση, απέναντι στον θετικό κατά Gram *S.aureus*. Παρα ταύτα ο συνδυασμός των συμπλόκων με το Oxolinic acid δεν επέφερε βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση.

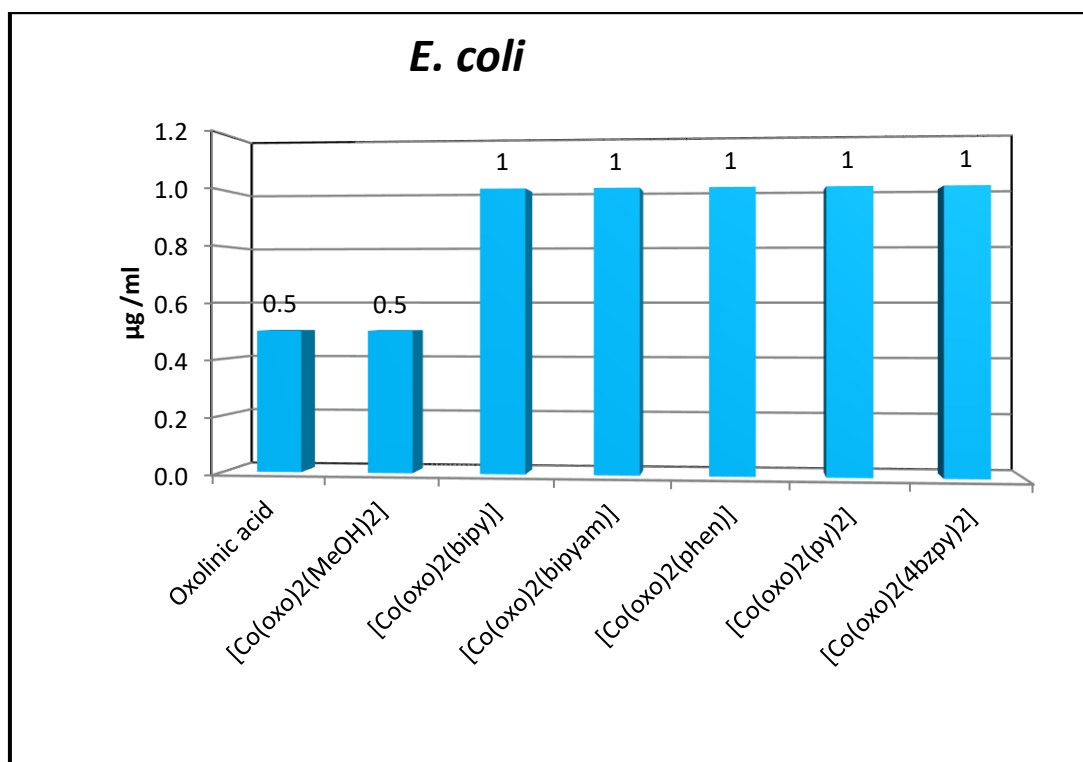
3.1.3. MIC *B.subtilis*



Διάγραμμα 4: MIC *B.subtilis*

Στο διάγραμμα 4 παρατηρούμε τις MICs των συμπλόκων του Oxolinic acid. Σε αυτό το διάγραμμα τα σύμπλοκα παρουσιάζουν την ίδια αντιμικροβιακή δράση, απέναντι στον θετικό κατά Gram *B.subtilis*. Ο συνδυασμός των συμπλόκων με το Oxolinic acid δεν επέφερε βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση.

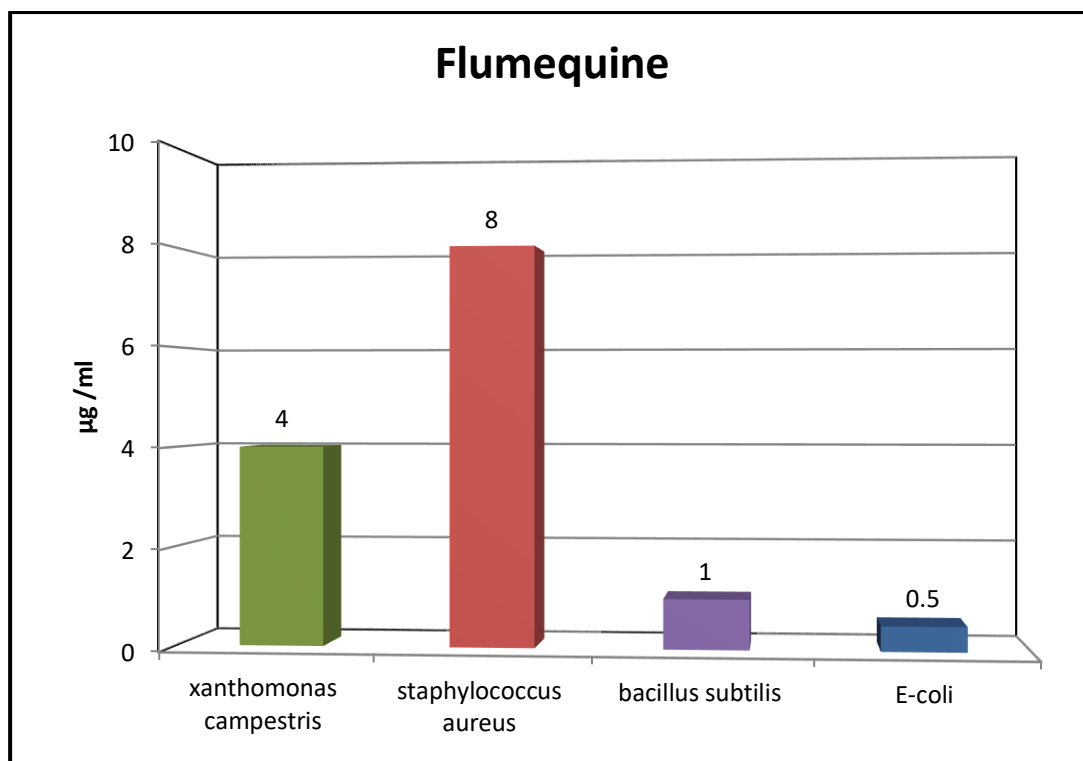
3.1.4. MIC *E.coli*



Διάγραμμα 5: MIC *E.coli*

Στο διάγραμμα 5 παρατηρούμε τις MICs με το Oxolinic acid. Συγκεκριμένα το σύμπλοκο [Co(oxo)₂(MeOH)₂] παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση (Mic 0,500 mg/ml) σε σχέση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα, απέναντι στην αρνητική κατά Gram *E.coli*. Ωστόσο ο συνδυασμός των συμπλόκων με την κινολόνη δεν παρουσιάζει βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση.

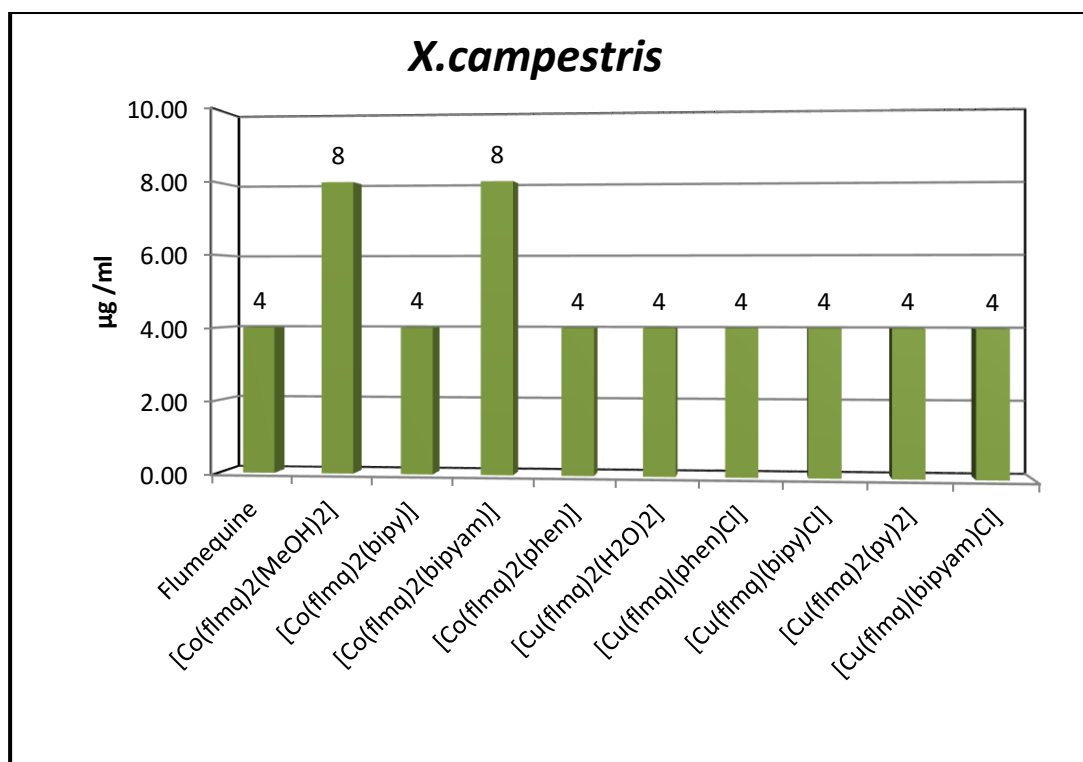
3.2. MIC *Flumequine*



Διάγραμμα 6: MIC *Flumequine*

Η Flumequine είναι ένα συνθετικό χημειοθεραπευτικού τύπου αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων. Στο διάγραμμα 6 διακρίνουμε ότι η Flumequine είναι πολύ δραστική προς το στέλεχος της E.coli, που είναι η Gram αρνητικό βακτήριο. Ενώ λιγότερο δραστική εμφάνιση παρουσιάζει στο στέλεχος B.subtilis (gram θετικό) και της X. campestris (gram αρνητικό) και ελάχιστη δράση έχει στο στέλεχος του S.aureus (gram θετικό βακτήριο).

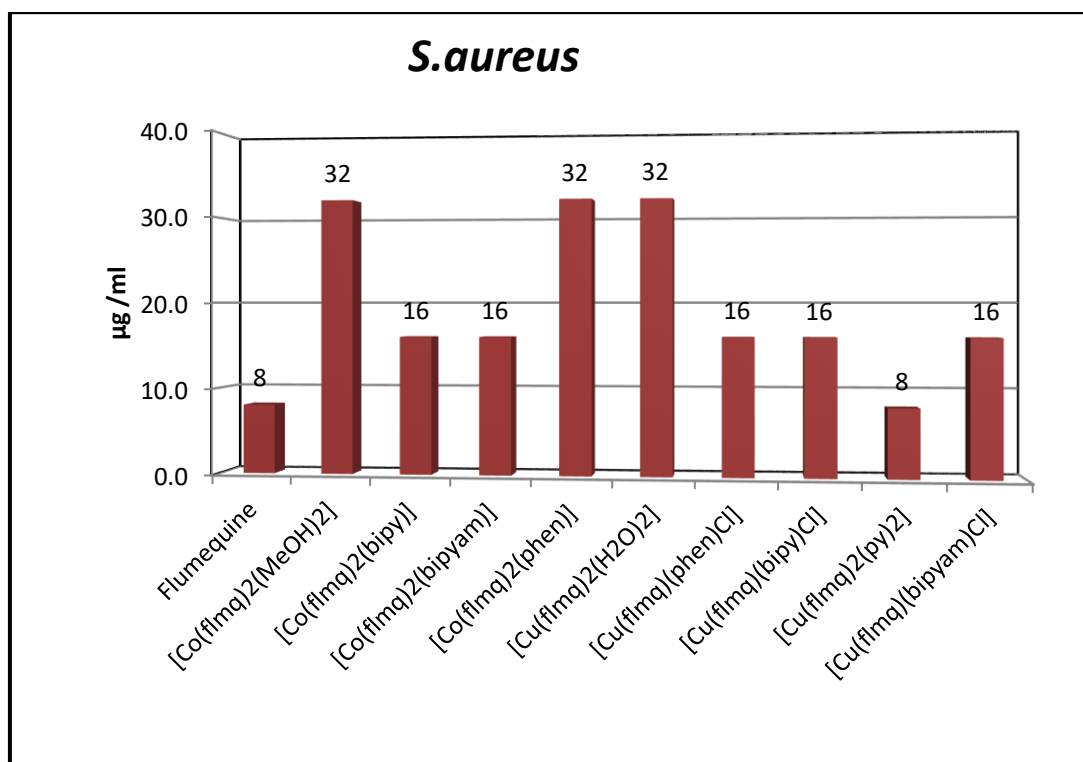
3.2.1. MIC *X. campestris*



Διάγραμμα 7: MIC *X. campestris*

Παρατηρούμε τις MICs των συμπλόκων με την Flumequine και συγκεκριμένα το [Co(flmaq)₂(MeOH)₂] και το [Co(flmaq)₂(bipyam)] παρουσιάζουν τη μικρότερη αντιμικροβιακή δράση με MIC 8µg/ml σε σχέση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα. Ωστόσο δεν παρατηρείται αύξηση της αντιμικροβιακής δράσης σε συνδυασμό της Flumequine με το σύμπλοκο μετάλλων

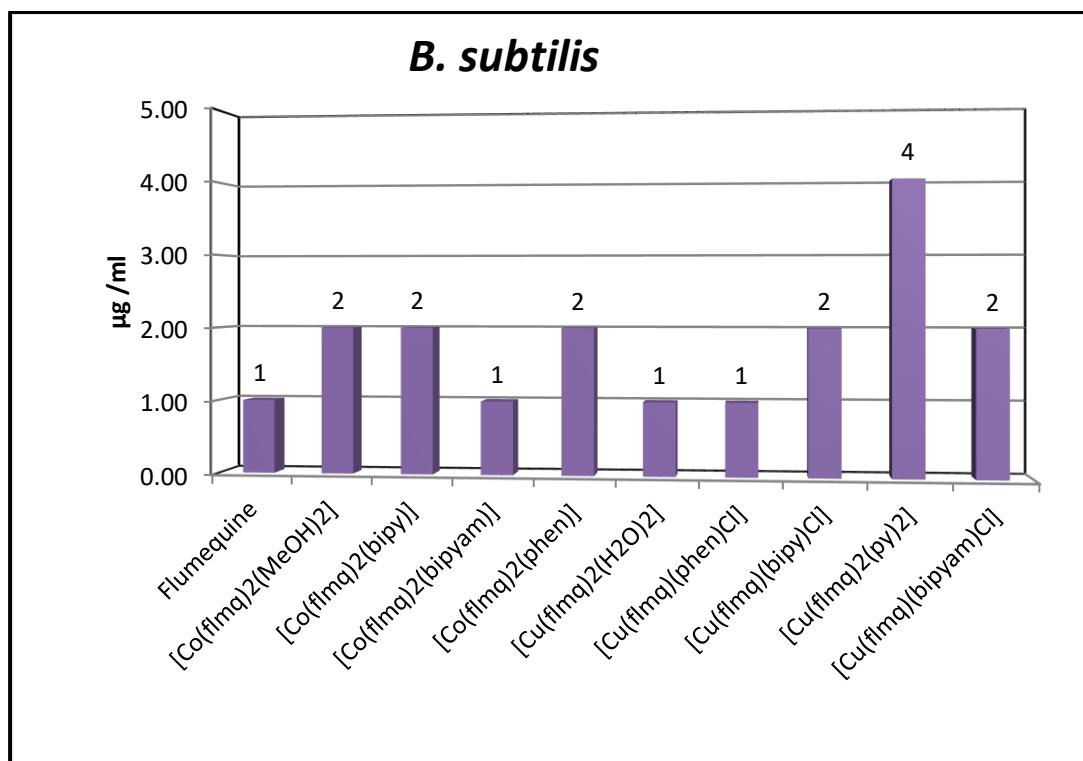
3.2.2. MIC *S.aureus*



Διάγραμμα 8: MIC *X. campestris*

Παρατηρούμε ότι το σύμπλοκο [Cu(flmaq)₂(py)₂] έχει μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση με MIC 8µg/ml σε σχέση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα απέναντι στον θετικό κατά Gram- *S.Aureus*. Παρά ταύτα ο συνδυασμός των συμπλόκων με τη Flumequine δεν επέφερε βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση.

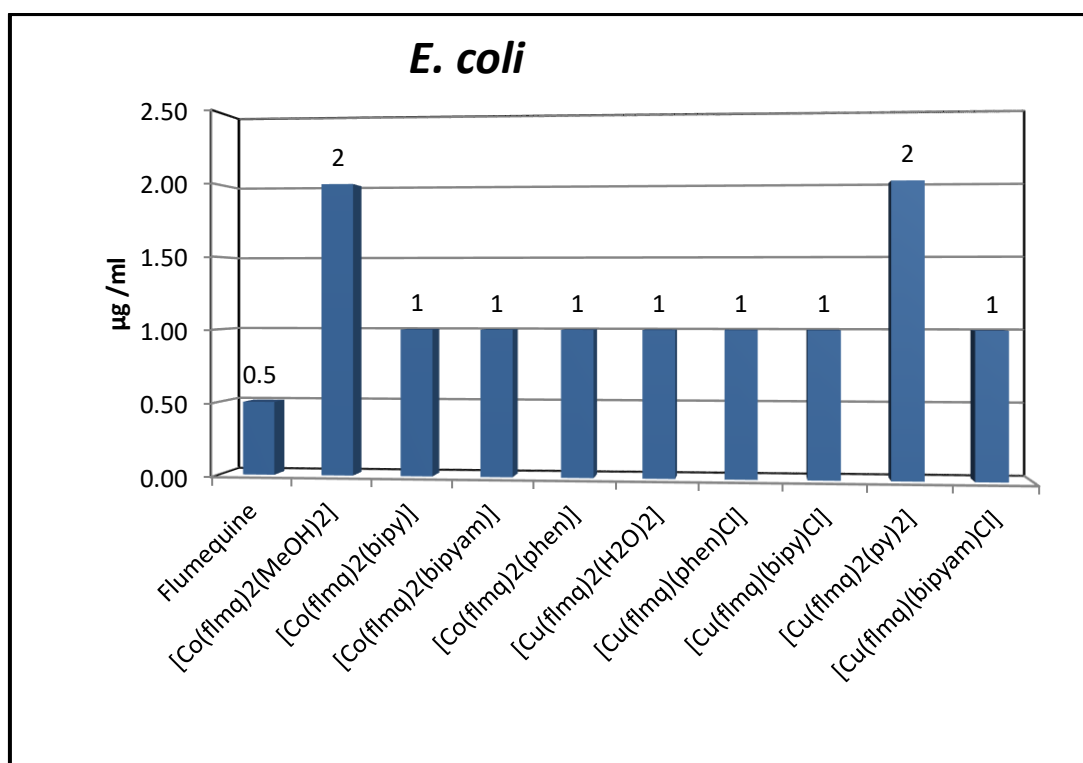
3.2.3. MIC *B.subtilis*



Διάγραμμα 9: MIC *B.subtilis*

Παρατηρούμε τις MICs των συμπλόκων με τη Flumequine. Τα σύμπλοκα [Cu(flmq)(phen)Cl], [Co(flmq)₂(bipyam)] και [Cu(flmq)₂(H₂O)₂] παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση με MIC 1µg/ml απέναντι στο θετικό κατά Gram- *B.subtilis*. Επιπλέον ο συνδυασμός των συμπλόκων δεν παρουσιάζει βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση σε συνδυασμό με την κινολόνη.

3.2.4. MIC *E.coli*



Διάγραμμα 10: MIC *E.coli*

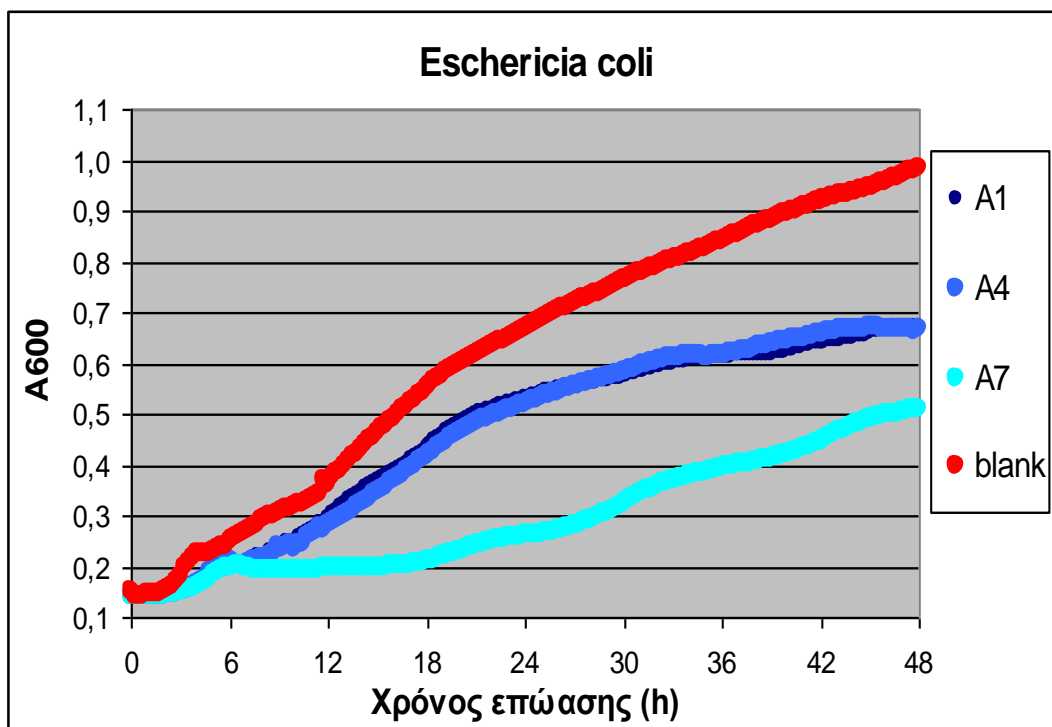
Παρατηρούμε τις MICs των συμπλόκων με τη Flumequine. Τα σύμπλοκα [Co(flmq)₂(MeOH)₂] και [Cu(flmq)₂(py)₂] παρουσιάζει μικρότερη αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα. Παρόλαυτα ο συνδυασμός συμπλόκων και κινολόνης δεν εμφανίζει βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση απ' ότι η κινολόνη μόνη της.

3.3.Αραιώσεις αντιμικροβιακού και συμπλόκων μετάλλων για τον μικροοργανισμό *E.coli*

	1,2,3	4,5,6	7,8,9	10,11,12	
A Flumequine	6,25µg/ml 1	12,5µg/ml 1	25µg/ml 1	12,5µg/ml 9	[Co(flmq)2(bipyam)Cl]
B [Co(flmq)2(H2O)2]	12,5µg/ml 2	25µg/ml 2	50µg/ml 2	25µg/ml 9	
C [Co(flmq)2(bipy)Cl]	12,5µg/ml 3	25µg/ml 3	50µg/ml 3	50µg/ml 9	
D [Co(flmq)2(phen)Cl]	12,5µg/ml 4	25µg/ml 4	50µg/ml 4	25µg/ml 10	[Co(flmq)2(py)2]
E [Co(flmq)2(bipyam)]	12,5µg/ml 5	25µg/ml 5	50µg/ml 5	50µg/ml 10	
F [Co(flmq)2(phen)]	12,5µg/ml 6	25µg/ml 6	50µg/ml 6	100µg/ml 10	
G [Co(flmq)2(bipy)]	12,5µg/ml 7	25µg/ml 7	50µg/ml 7	DMSO	
H [Co(flmq)2(MeOH)2]	25µg/ml 8	50µg/ml 8	100µg/ml 8	H2O	

3.3.1.Επίδραση αντιμικροβιακού στην καμπύλη ανάπτυξης

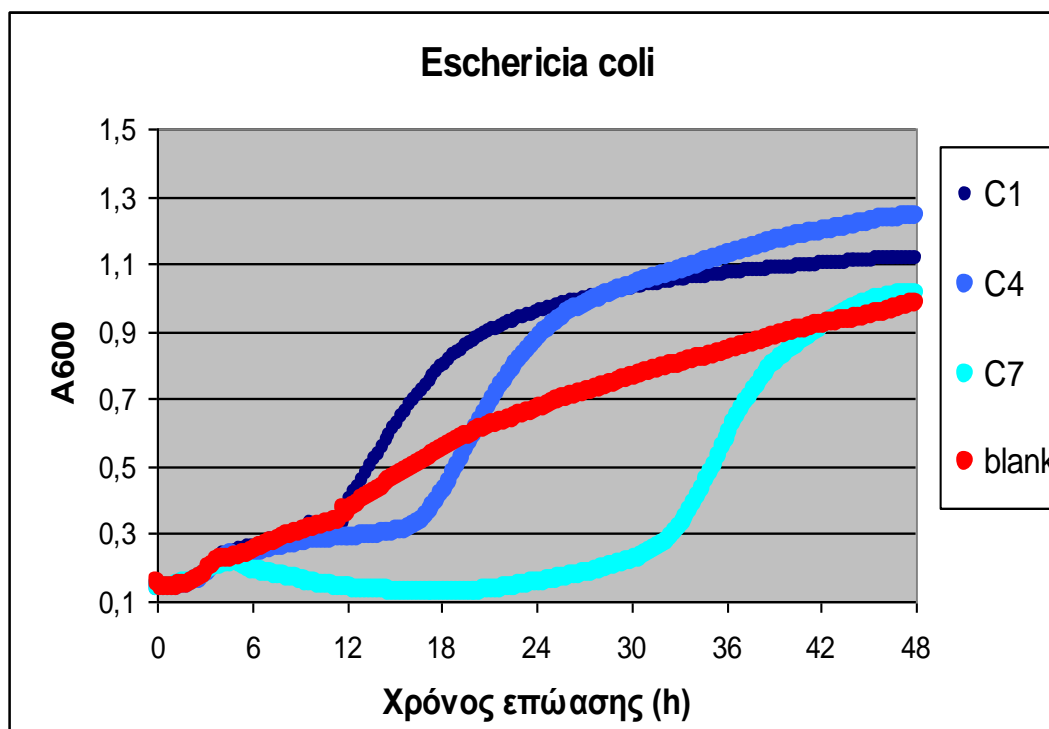
Επίδραση στην ανάπτυξη της *E.coli*, με την αντιμικροβιακή ένωση Flumequine σε συγκεντρώσεις 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml και 25µg/ml. Ως blank σημαίνεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού χωρίς παρουσία αντιμικροβιακού παράγοντα. A1 παρουσία Flumequine σε συγκέντρωση 6,25 µg/ml, A4 σε συγκέντρωση 12,5µg/ml και A7 σε συγκέντρωση 25µg/ml.



Διάγραμμα 11: Επίδραση στην ανάπτυξη της *E.coli*

Και στις τρεις συγκεντρώσεις παρατηρείται αύξηση της lag phase και μικρότερος ρυθμός ανάπτυξης κατά τη log phase. Η παρατηρούμενη αντιμικροβιακή δράση είναι μεγαλύτερη σε συγκέντρωση 25µg/ml όπου η έναρξη της φάσης ανάπτυξης καθυστέρησε κατά περίπου 13 ώρες σε σχέση με την καλλιέργεια χωρίς αντιμικροβιακό παράγοντα και ο ρυθμός ανάπτυξης μειώθηκε σημαντικά.

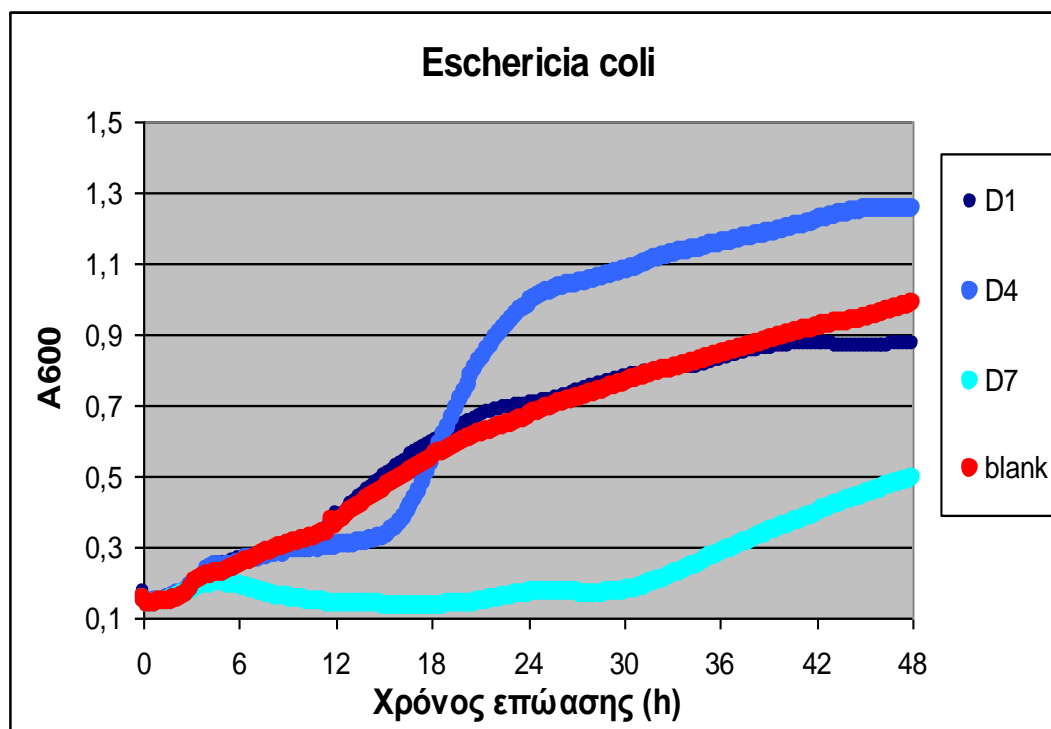
Επίδραση στην ανάπτυξη της *E.coli*, της αντιμικροβιακής ένωσης Flumequine του συμπλόκου [Co(flmq)₂(bipy)Cl] σε συγκεντρώσεις 12,5μg/ml, 25μg/ml και 50μg/ml. Ως blank σημαίνεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού χωρίς παρουσία αντιμικροβιακού παράγοντα. C1 παρουσία συμπλόκου σε συγκέντρωση 12,5μg/ml, C4 σε συγκέντρωση 25μg/ml και C7 σε συγκέντρωση 50μg/ml.



Διάγραμμα 12: Επίδραση στην ανάπτυξη της *E.coli*

Παρατηρείται πως σε συγκέντρωση 50μg/ml & 25μg/ml η έναρξη της ταχείας ανάπτυξης του μικροοργανισμού καθυστερεί σημαντικά σε σχέση με την καλλιέργεια χωρίς αντιβιοτικό (32, 17 και 11 ώρες, αντίστοιχα) ενώ σε συγκέντρωση 12,5μg/ml η έναρξη της ταχείας ανάπτυξης ταυτίζεται με την αντίστοιχη παρατηρούμενη χωρίς αντιβιοτικό. Ωστόσο και στις 3 συγκεντρώσεις η μέγιστη παρατηρούμενη ταχύτητα ανάπτυξης είναι συγκρίσιμη και υψηλότερη σε σχέση με την καλλιέργεια χωρίς αντιβιοτικό. Μάλιστα η μέγιστη παρατηρούμενη συγκέντρωση ύστερα από 48 ώρες επώασης είναι μεγαλύτερη σε όλες τις συγκεντρώσεις του συμπλόκου αντιβιοτικού από ότι χωρίς αντιβιοτικό.

Επίδραση στην ανάπτυξη της *E.coli*, της αντιμικροβιακής ένωσης Flumequine του συμπλόκου [Co(flmaq)2(phen)Cl] σε συγκεντρώσεις 12,5μg/ml, 25μg/ml και 50μg/ml. Ως blank σημαίνεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού χωρίς παρουσία αντιμικροβιακού παράγοντα. D1 παρουσία συμπλόκου σε συγκέντρωση 12,5μg/ml, D4 σε συγκέντρωση 25μg/ml και D7 σε συγκέντρωση 50μg/ml.



Διάγραμμα 13: Επίδραση στην ανάπτυξη της *E.coli*

Παρατηρείται ότι σε συγκέντρωση 12,5μg/ml δεν υπάρχει σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού καθώς η καμπύλη ανάπτυξης ταυτίζεται με αυτήν χωρίς αντιβιοτικό. Σε συγκέντρωση 25μg/ml παρατηρείται καθυστέρηση της έναρξης ταχείας ανάπτυξης κατά περίπου 5 ώρες, ακολουθούμενη ωστόσο από ταχύτερη ανάπτυξη. Σε συγκέντρωση 50μg/ml μετά από 6 ώρες επώασης παρατηρείται μείωση της απορρόφησης της καλλιέργειας η οποία όμως αρχίζει πάλι να αναπτύσσεται σε 30 ώρες επώασης.

Και στις τρεις μετρήσεις παρατηρήθηκε μικρή απόκλιση από την παρατηρούμενη απορρόφηση στις 20 ώρες επώασης ανάμεσα στις καλλιέργειες για τον προσδιορισμό της MIC και σε αυτές για την καταγραφή

της καμπύλης ανάπτυξης. Επισημαίνεται πως για τον προσδιορισμό της MIC οι καλλιέργειες ήταν όγκου 2 mL σε δοκιμαστικούς σωλήνες, με ανάδευση και σε διαλύματα DMSO 2% v/v ενώ για την καταγραφή της καμπύλης ανάπτυξης ήταν όγκου 250 μ L, στατικές και σε διαλύματα 8% DMSO v/v. Ωστόσο, και στις τρεις περιπτώσεις η οπτική απορρόφηση σε 48 ώρες επώασης φανερώνει μικροβιακή ανάπτυξη παρά την παρατηρούμενη παρεμπόδιση στις 20 ώρες.

Συγκρίνοντας την επίδραση του κάθε αντιμικροβιακού παράγοντα στην ανάπτυξη παρατηρείται πως η κάθε σύμπλοκη ένωση εμφανίζει διαφορετική αντιμικροβιακή δράση. Το ligand καθυστερεί την έναρξη της ταχείας ανάπτυξης και επιβραδύνει το μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης. Το σύμπλοκο $[\text{Co}(\text{flmq})_2(\text{bipy})\text{Cl}]$ επιμηκύνει τη lag phase αλλά στη συνέχεια η ανάπτυξη είναι ταχύτερη. Αντίθετα το σύμπλοκο $[\text{Co}(\text{flmq})_2(\text{phen})\text{Cl}]$ δεν έχει καμία επίδραση στη συγκέντρωση 12,5 μ g/ml, όπου οι άλλες μικροβιακές ενώσεις είχαν κάποια παρεμποδιστική δράση, σε συγκέντρωση 25 μ g/ml η επίδραση είναι αντίστοιχη με του συμπλόκου $[\text{Co}(\text{flmq})_2(\text{bipy})\text{Cl}]$ ενώ σε συγκέντρωση 50 μ g/ml παρατηρείται μεγαλύτερη παρεμποδιστική δράση από το ligand και το σύμπλοκο $[\text{Co}(\text{flmq})_2(\text{bipy})\text{Cl}]$.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Είναι γνωστό ότι οι κινολόνες 1^{ης} γενιάς (Flumequine, Oxolinic acid) παρουσιάζουν αυξημένη αντιμικροβιακή δράση τόσο σε Gram αρνητικά όσο και σε Gram θετικά, κάτι σύμφωνο με τα ευρήματα 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 με μέταλλα των κινολονών που μελετήθηκαν ο δεν παρουσίασε βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση. Συγκεκριμένα, στο στέλεχος *X.campestris* το Oxolinic acid είχε τιμή MIC 1μg/ml καθώς επίσης και όλων των συμπλόκων η τιμή ήταν η ίδια, αυτό σημαίνει, πως η αντιμικροβιακή δράση του Oxolinic acid παρέμεινε σταθερή. Το ίδιο συνέβη και στα στελέχη του *S.aureus* και του *B.subtilis*. Στο στέλεχος *E.coli* το Oxolinic acid είχε τιμή MIC 0,5 μg/ml, ενώ η τιμή MIC των συμπλόκων ήταν 1μg/ml. Αυτό σημαίνει πως η αντιμικροβιακή δράση του Oxolinic acid σε συνδυασμό με τα σύμπλοκα δεν επέφερε καμία βελτίωση.

Στο στέλεχος *X. campestris* η Flumequine είχε MIC 4μg/ml και η τιμή MIC των περισσότερων συμπλόκων ήταν 4μg/ml, εκτός από τα σύμπλοκα [Co(flmaq)₂(bipyam)] και [Co(flmaq)₂(MeOH)₂] όπου η τιμή MIC ήταν 8μg/ml. Αυτό σημαίνει πως η αντιμικροβιακή δράση της Flumequine σε συνδυασμό με τα σύμπλοκα δε βελτιώθηκε.

Στο στέλεχος *S. aureus* παρατηρήθηκε πως η τιμή MIC (16μg/ml) των συμπλόκων είναι μεγαλύτερη από την τιμή MIC (8μg/ml) του αντιμικροβιακού, εκτός από το σύμπλοκο [Cu(flmaq)₂(py)₂] το οποίο είχε την ίδια τιμή MIC με το αντιμικροβιακό. Αυτό σημαίνει πως η αντιμικροβιακή δράση της Flumequine δεν είχε καμία βελτίωση. Το ίδιο συμβαίνει και στα στελέχη *B. subtilis* και *E. coli*, η τιμή του αντιμικροβιακού είναι μικρότερη από την τιμή των συμπλόκων με αποτέλεσμα, να μην υπάρχει βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση.

Παρότι η MIC αποτελεί την ευρέως αποδεκτή μέθοδο προσδιορισμού της αντιμικροβιακής δράσης, η on line καταγραφή της ανάπτυξης ανέδειξε στοιχεία σχετικά με την αντιμικροβιακή δράση του ligand και των συμπλόκων του με Flumequine που δεν μπορούν να αποκαλυφθούν με τον προσδιορισμό

της MIC. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πως ο σχηματισμός συμπλόκων ενώσεων τροποποιεί τον τρόπο με τον οποίο επιβραδύνεται η μικροβιακή ανάπτυξη, υποδεικνύοντας πιθανώς πως κάποιες από τις σύμπλοκες ενώσεις που συντέθηκαν έχουν διαφορετικό μηχανισμό δράσης από το ligand. Ωστόσο περισσότερα στοιχεία απαιτούνται προκειμένου να μπορεί να γίνει πλήρης αξιολόγηση και αξιοποίηση του μεγάλου όγκου δεδομένων που προκύπτουν.

Χαρακτηριστικό της μεθόδου είναι πως δεν συνιστάται για τη μελέτη αερόβιων μικροοργανισμών όπως *X. campestris* επειδή δεν είναι δυνατή η ανάδευση της καλλιέργειας. Επίσης, στο μέλλον πρέπει να γίνεται ξεχωριστός προσδιορισμός της MIC και σε πλάκες ELISA.

5. Βιβλιογραφία

- **Andrews M. Jennifer**, Determination of minimum inhibitory concentration, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2001) 48, Suppl. S1, 5-16, p.5.
- **Barrere, G.C., C.E. Barber, and M.J Daniels**, *Intl. J. Biological Macromolecules*, 8(6):372-374,1986.
- **Dolores Cid., Segundo P., Jose A., Ruiz-Santa-Quiteria, Jorge V.,**
- **Federico Katzen, Diego U. Ferreiro, Cristian G. Oddo, M. Veronica Ielmini, Anke Becker, Alfred Pühler 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.
- **Garcia S., Vaddilo S., De La Fuentei R.**, In Vitro Activities of Enoxacin, Enrofloxacin, Sparfloxacin, and Ciprofloxacin against *Escherichia coli* Strains Isolated from Diarrheic Lambs and Kids, *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, Oct. 1994, p. 2469-2470
- **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>
- **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*, 2nd ed. (the “Gold Book”) (1997)
- **King, D.E., Malone R., Lilley S.H.**, New classification and update on the quinolone 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 quinolone 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., Koksai, 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
- **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.