



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



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

**Πτυχιακή Εργασία Των: Μπαλαλά Σοφία & Κολιονίκα Ανδρέα**

**Εισηγητής: Καλογιάννης Σταύρος**

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2014**



## **Ευχαριστίες**

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

Ευχαριστούμε την κα Βίνου Μαργαρίτα για την άριστη συνεργασία αλλά και για την βοήθεια που μας πρόσφερε, κατά την διεξαγωγή του πειράματος, έτσι ώστε να ολοκληρωθεί με επιτυχία.

Ευχαριστούμε την κ Γρούνα Χρυσάνθη για το χρήσιμο υλικό με το οποίο μας εφοδίασε.

Ευχαριστίες θα θέλαμε να αποδώσουμε στον καθηγητή κο Παπαδόπουλο Αθανάσιο ως μέλος της εξεταστικής επιτροπής για την δίκαιη και ακέραιη αξιολόγηση αυτής της εργασίας.

## Περίληψη

**Εισαγωγή** Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) έχει πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων αλλά και στη καθημερινή ζωή. Ως εργαλείο έρευνας η MIC μπορεί να δώσει μια τελική απάντηση σε σχέση με άλλες αντίστοιχες μεθόδους δοκιμών, όταν αυτές δεν είναι ικανές να δώσουν μία οριστική απάντηση.

**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.

**Συμπεράσματα – Αποτελέσματα** Στο σύνολο της δοκιμής MIC τα σύμπλοκα των κινολών gatifloxacin, norfloxacin, rufloxacin δεν παρουσίασαν αυξημένη αντιμικροβιακή δράση. Εξαιρέση όλων αποτελούν τα σύμπλοκα της sarafloxacin. Ως απόρροια των αποτελεσμάτων, η πλειοψηφία των συμπλόκων μετάλλων, που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες της έρευνας έδειξαν ότι δεν βελτιώθηκε η αντιμικροβιακή δράση των κινολονών. Αξιοσημείωτη εξαίρεση αποτελεί η sarafloxacin και ιδιαίτερα το σύμπλοκο [Co(sf)<sub>2</sub>(phen)], το οποίο μας έδωσε τη μεγαλύτερη βελτίωση για όλα τα βακτηριακά στελέχη πλην ενός, του S.aureus.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

#### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (MIC).....	5
1.1.1. Ορισμός Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC).....	5
1.2. Σύμπλοκα Μετάλλων ( <i>Metal Complexes</i> ) - Κινολόνες ( <i>Quinolones</i> ) και Προσδέτες ( <i>Ligands</i> ).....	6
1.2.1. Σύμπλοκα Μετάλλων ( <i>Metal Complexes</i> ).....	6
1.2.2. Κινολόνες ( <i>Quinolones</i> ) .....	7
1.2.3. Προσδέτες ( <i>Ligands</i> ) .....	9
1.2.4. Αντιμικροβιακή δράση του συμπλόκου μετάλλου-κινολόνης.....	10
1.3. Βακτηριακά Στελέχη.....	11
1.3.1. <i>Staphilococcus Aureus</i> .....	11
1.3.2. <i>Escherichia Coli</i> .....	12
1.3.3. <i>Bacillus Subtilis</i> .....	13
1.3.4. <i>Xanthomonas Campestris</i> .....	14

1.4. ΣΚΟΠΟΣ.....	15
------------------	----

#### 2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....

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

#### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....

#### 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....

# 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 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 μεθόδους 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 ζωμού 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 η *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. Αναλυτικές 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 ιοντικά 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 ό, τι η πρώτη γενιά.
- Μέτριου 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).

Τέλος, οι κινολόνες που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες της πειραματικής διαδικασίας είναι, η *refloxacin* και η *norfloxacin* οι οποίες ανήκουν στις κινολόνες δεύτερης γενιάς, και η *sparfloxacin* και η *gatifloxacin* οι οποίες ανήκουν στις κινολόνες τρίτης γενιάς.

##### 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 (Chemicool.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. Οι 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-προπτυλο-νορφλοξακίνη) και τρίτης γενιάς (σπαρφλοξακίνη), όχι μόνο ως ελεύθερες κινολόνες αλλά και στα σύμπλοκά τους. Η καλύτερη ανασταλτικότητα έναντι των τριών μικροοργανισμών που έχουν δοκιμαστεί, παρέχονται από το σύμπλοκο [Cu (ERX) 2 (H<sub>2</sub>O)], το οποίο είναι ένα *ligand* κινολόνης 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 *Enterobacteriaceae*
- Ο *Bacillus subtilis* της οικογένειας *Bacillaceae* και
- Η *Xantomonas Campestris* της οικογένειας *Xanthomonadaceae*

#### 1.3.1. *Staphilococcus 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  $\mu\text{m}$ , είναι ακίνητοι και μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικά υλικά με υψηλή συγκέντρωση αλάτων και σε θερμοκρασίες 18-40 °C.

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

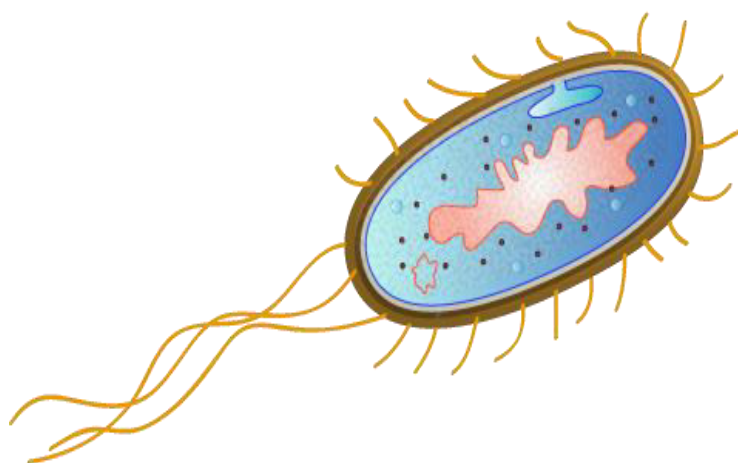
λοιμώξεις. Οι σταφυλόκοκκοι, εκτός του Σταφυλόκοκκου *aureus*, δεν παράγουν το ένζυμο πηκτάση και χαρακτηρίζονται ως πηκτάση - αρνητικοί.

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 επωάζονται 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 K<sub>2</sub> και εμποδίζοντας την εγκατάσταση άλλων παθογόνων βακτηρίων μέσα στο έντερο.

**Εικόνα 1:** Στέλεχος *E-coli*



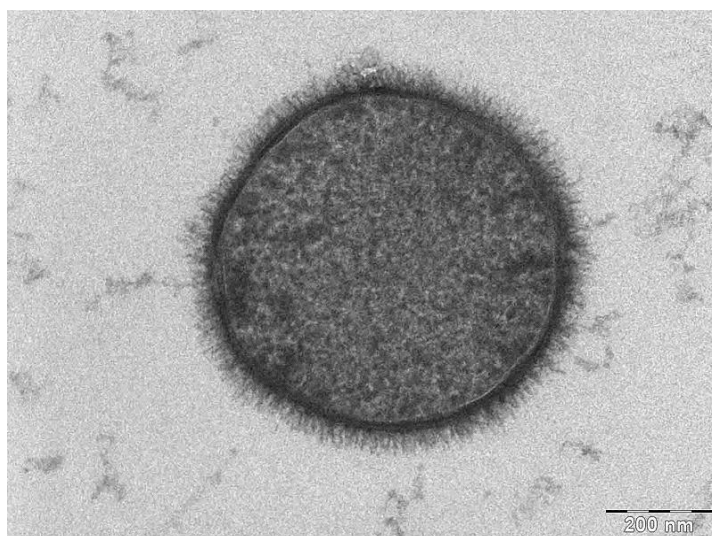
Απαντώνται συχνά στα κόπρανα των ζώων και των ανθρώπων. Επίσης, όταν βρεθεί σε διπλανά όργανα όπως την ουροδόχο κύστη μπορεί να

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 2:** 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 σουμπιλισίνη. Τα σπόρια του *B. subtilis* μπορούν να επιβιώσουν την υπερβολική ζέστη στο οποίο εκτίθεται κατά το μαγείρεμα.

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

άνθρωπο. Ο αριθμός των σπορίων που βρίσκονται στο ανθρώπινο έντερο είναι πολύ υψηλός, για να αποδοθεί αποκλειστικά στην κατανάλωση μέσω μόλυνσης των τροφίμων. Το έδαφος απλώς χρησιμεύει ως μια δεξαμενή, γεγονός που υποδηλώνει ότι, ο *B. subtilis* κατοικεί το έντερο και θα πρέπει να θεωρείται ως κανονικό συμβιωτικό 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 πολυσακχαρίτη υψηλού μοριακού βάρους που ονομάζεται κόμμι ξανθάνης (Katzen Federico et al., 1998) .

Πιο συγκεκριμένα, η κόμμι ξανθάνης είναι ένας πολυσακχαρίτης, που εκκρίνεται από το βακτήριο *Xanthomonas campestris* και χρησιμοποιείται ως πρόσθετο τροφίμων, τροποποιητής ρεολογίας, ως πυκνωτικό μέσο τροφίμων (σε σάλτσες για σαλάτες, για παράδειγμα) αλλά και ως σταθεροποιητής (σε καλλυντικά προϊόντα, για παράδειγμα, για την 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 (Barrère, 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 σύμπλοκο 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 των *MIC* κινολονών με αντιμικροβιακή δράση, εφόσον αυτές σχηματίσουν σύμπλοκες ενώσεις με μέταλλα. Οι *MIC* θα προσδιοριστούν στους παρακάτω μικροοργανισμούς:

- *S. aureus* (θετικό κατά *Gram*)
- *E. coli* (αρνητικό κατά *Gram*)
- *B. subtilis* (θετικό κατά *Gram*) και
- *X. Campestris* (αρνητικό κατά *Gram*)

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

- Η Sparfloxacin με σύμπλοκα Co και Mn
- Η Norfloxacin με σύμπλοκα Ni
- Η Pefloxacin με σύμπλοκα Cu και
- Η Gatifloxacin επίσης με σύμπλοκα Cu.



Ο πίνακας 1 περιλαμβάνει αποτελέσματα παλαιότερων πειραματικών μελετών, σε κινολόνες, οι οποίες έλαβαν μέρος και στην παρούσα μελέτη (Tumer, M., et al., 1999), (Imran, M., et al., 2007), (Patel N.H., et al., 2007), (Dolores Cid., et al.,1994).

**Πίνακας 1.4.1:** MIC σε κινολόνες παλαιότερων μελετών

ΤΥΠΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ	xanthomona s campestris	staphylococcc us aureus	bacillus subtilis	E-coli
		μg / ml	μg / ml	μg / ml	μg / ml
<b>Sparfloxacin</b>	Hsf	-	0,03	5 - 0,16	0,0625
<b>Norfloxacin</b>	Hnf	-	0,25	-	0,06
<b>Pefloxacin</b>	Hpf	-	1	-	0,06
<b>Gatifloxacin</b>	Hgtx	-	0,03	-	0,015

## 2. Μεθοδολογία

### 2.1. Μικροβιακά στελέχη

Προσδιορίστηκαν οι MIC στα εξής μικροβιακά στελέχη:

- *Xanthomonas campestris*, ATCC 1395
- *Escherichia coli*, NCTC 29212
- *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 κάθε θρεπτικού μέσου, μετά τη ζύγιση όλων των ποσοτήτων προστέθηκε νερό σύμφωνα με τις οδηγίες και το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού με συνεχή ανάδευση. Αμέσως με την έναρξη του βρασμού το διάλυμα απομακρύνθηκε από τη θέρμανση, ψύχθηκε και εφόσον χρειαζόταν, 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:** Η σύσταση ανά 100ml του θρεπτικού μέσου Nutrient Broth – Agar

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

**Πίνακας 2.2.2:** Η σύσταση ανά 100ml του θρεπτικού μέσου Luria Broth – Agar

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

**Πίνακας 2.2.3:** Η σύσταση ανά 100ml του θρεπτικού μέσου YM (Yeast and Mold) Broth- agar

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

### **2.2.1. Άλλα θρεπτικά μέσα**

Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστικού οίκου, για τη παρασκευή του Mueller Hinton αρκεί να διαλυθούν 21g σκόνης, σε ένα λίτρο απεσταγμένου νερού. Στην συνέχεια ακολουθεί, ο βρασμός του θρεπτικού 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 αποστειρώθηκε 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)

<i>Xanthomonas capestris</i>	28 °C
<i>Escherichia coli</i>	38 °C
<i>Bacillus subtilis</i>	38 °C
<i>Staphylococcus aureus</i>	38 °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 στο παρακάτω πίνακα:

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

<b>Nutrient Broth – Agar</b>	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>YM- agar</b>	<i>Xanthomonas capestris</i>
<b>Luria Broth – Agar</b>	<i>Escherichia coli</i>

## 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 κινολονες με τα σύμπλοκα τους ήταν ευγενική χορηγία του κ. Γεωργίου Ψωμά, Τμήμα Χημείας Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Πίνακας 2.6.1: Δείγματα για αντιμικροβιακή δράση

<b>ΚΩΔΙΚΟΣ</b>	<b>ΤΥΠΟΣ</b>
<b>Sparfloxacin</b>	Hsf
<b>KL05B</b>	[Co(sf) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]
<b>KL06</b>	[Co(sf) <sub>2</sub> (bipy)]
<b>KL11</b>	[Co(sf) <sub>2</sub> (phen)]
<b>KL04A</b>	[Co(sf) <sub>2</sub> (bipyam)]
<b>AX01</b>	[Mn(sf) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]
<b>AX03</b>	[Mn(sf) <sub>2</sub> (bipy)]
<b>AX17</b>	[Mn(sf) <sub>2</sub> (phen)]
<b>AX13</b>	[Mn(sf) <sub>2</sub> (bipy)]
<b>AX05</b>	[Mn(sf) <sub>2</sub> (py) <sub>2</sub> ]
<b>Norfloxacin</b>	Hnf
<b>BP09</b>	[Ni(nf) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]
<b>BP14A</b>	[Ni(nf) <sub>2</sub> (bipy)]
<b>BP11A</b>	[Ni(nf) <sub>2</sub> (phen)]
<b>BP08A</b>	[Ni(nf) <sub>2</sub> (bipyam)]
<b>Perfoxacin</b>	Hpf
<b>PX01</b>	[Cu(pf) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]
<b>PX11</b>	[Cu(pf) <sub>2</sub> (bipy)Cl]
<b>PX04A</b>	[Cu(pf) <sub>2</sub> (phen)Cl]
<b>PX06B</b>	[Cu(pf) <sub>2</sub> (bipyam)Cl]
<b>Gatifloxacin</b>	Hgtx
<b>AK05</b>	[Cu(gtx) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]
<b>AK06A</b>	[Cu(gtx) <sub>2</sub> (bipy)Cl]
<b>AK03</b>	[Cu(gtx) <sub>2</sub> (phen)Cl]
<b>AK04</b>	[Cu(gtx) <sub>2</sub> (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:

- Φασφατοφωτόμετρο στα 600nm
- Κλίβανος αποστείρωσης
- biosafety cabinet (BSC)
- Επωαστικός κλίβανος

## 2.8. Προσδιορισμός MIC

Η διαδικασία που ακλουθήσαμε για το προσδιορισμό MIC ήταν όμοια για τα ligand , τα σύμπλοκα αλλά και τους μικροοργανισμούς. Αναλυτικότερα εφαρμόστηκαν τα παρακάτω

### 1<sup>η</sup> μέρα

Αρχικά γίνεται ενοφθαλμισμός του μικροοργανισμού από στερεή σε υγρή καλλιέργεια των 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 αραιό 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 έως 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

<b>Αρίθμηση δειγμάτων</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
<b>μg/ml στο Errendorf</b>	1600	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,563
<b>μg/ml στο δοκ. σωλήνα</b>	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<sup>η</sup> 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 δύο φορές η επίδραση τους στην ανάπτυξη του βακτηριακού πληθυσμού. Πιο συγκεκριμένα σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 20 μL από κάθε

σωληνάκι αραίωσης. Κατόπιν προστέθηκε 1 mL της εμβολιασμένης βακτηριακής καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο Mueller Hinton. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε υπό στείρες συνθήκες. Ακολούθησε ανάδευση και επώαση για περίπου 24 ώρες.

### **3<sup>η</sup> 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.



### 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 1.

**Πίνακας 3.1:** MIC κινολονών-Σύμπλοκα μετάλλων

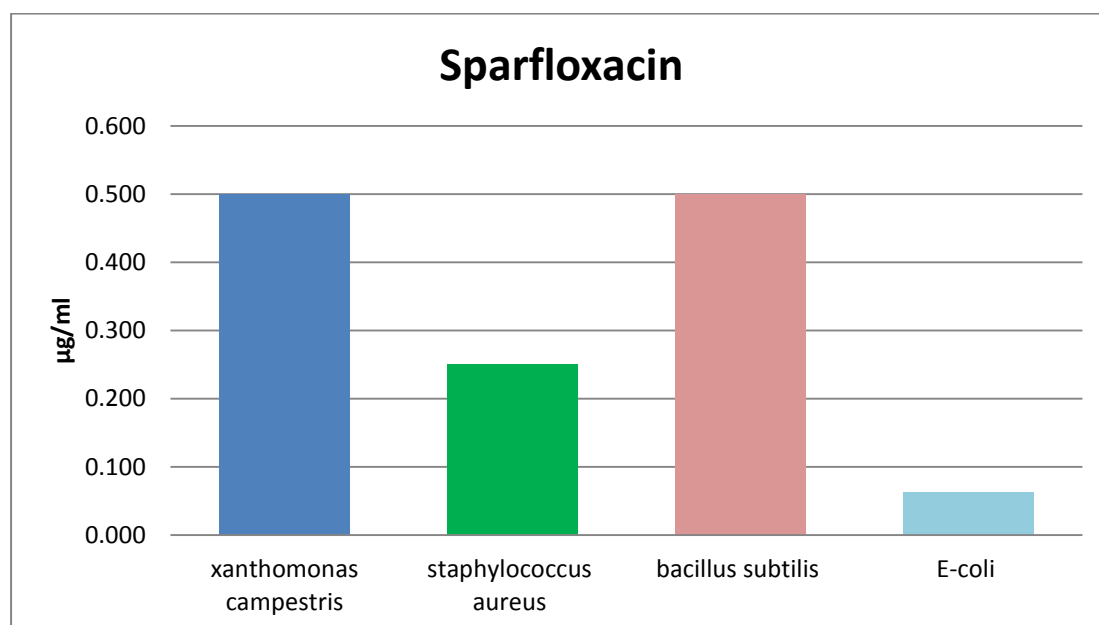
ΤΥΠΟΣ	xanthomonas campestris µg/ml	staphylococcus aureus µg/ml	bacillus subtilis µg/ml	E-coli µg/ml
<b>Sparfloxacin</b>	0,500	0,250	0,500	0,0625
[Co(sf) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	0,250	0,250	0,500	0,0625
[Co(sf) <sub>2</sub> (bipy)]	0,250	0,500	0,500	0,0625
[Co(sf) <sub>2</sub> (phen)]	0,125	0,250	0,250	0,0312
[Co(sf) <sub>2</sub> (bipyam)]	0,250	0,250	0,500	0,0625
[Mn(sf) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	0,500	0,500	0,250	0,092
[Mn(sf) <sub>2</sub> (bipy)]	0,500	0,500	0,25-0,5	0,063
[Mn(sf) <sub>2</sub> (phen)]	0,250	0,500	0,500	0,063
[Mn(sf) <sub>2</sub> (bipy)]	1,000	2,000	1,000	0,125
[Mn(sf) <sub>2</sub> (py) <sub>2</sub> ]	0,500	0,500	0,250	0,063
<b>Norfloxacin</b>	8	1	1	0,250
[Ni(nf) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	4	1	1	0,500
[Ni(nf) <sub>2</sub> (bipy)]	8	1	1	0,500
[Ni(nf) <sub>2</sub> (phen)]	4	2	1	0,500
[Ni(nf) <sub>2</sub> (bipyam)]	2	2	1	0,500
<b>Pefloxacin</b>	0,5	0,5	0,5	0,25
[Cu(pf) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	1	0,5	0,5	0,25
[Cu(pf) <sub>2</sub> (bipy)Cl]	2	1	1	0,5
[Cu(pf) <sub>2</sub> (phen)Cl]	1	1	1	0,5
[Cu(pf) <sub>2</sub> (bipyam)Cl]	1	1	1	0,5
<b>Gatifloxacin</b>	0,250	0,125	0,125	0,063
[Cu(gtx) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	0,500	0,500	0,500	0,250
[Cu(gtx) <sub>2</sub> (bipy)Cl]	0,250	0,250	0,250	0,250
[Cu(gtx) <sub>2</sub> (phen)Cl]	1,000	0,250	0,250	0,125
[Cu(gtx) <sub>2</sub> (bipyam)Cl]	0,500	0,125	0,250	0,125

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. Sparfloxacin

Η *sparfloxacin* είναι κινολόνη τρίτης γενιάς και είναι δραστική ενάντια σε *Gram* - θετικά και σε *Gram* - αρνητικά βακτήρια. Στο διάγραμμα 1, διακρίνουμε ότι η *sparfloxacin* είναι πολύ δραστική (MIC:0,0625 µg/ml) προς το στέλεχος της *E.coli*, που είναι *Gram* – αρνητικό βακτήριο, λιγότερο δραστική στο στέλεχος του *S.aureus* (MIC:0,25 µg/ml) που είναι *Gram* – θετικό βακτήριο και ακόμα λιγότερο στα στελέχη *X.campestris* (*Gram* αρνητικό) και *B.subtilis* (*Gram* θετικό), στα οποία έδειξε την λιγότερη δραστικότητα (MIC 0,5 µg/ml)

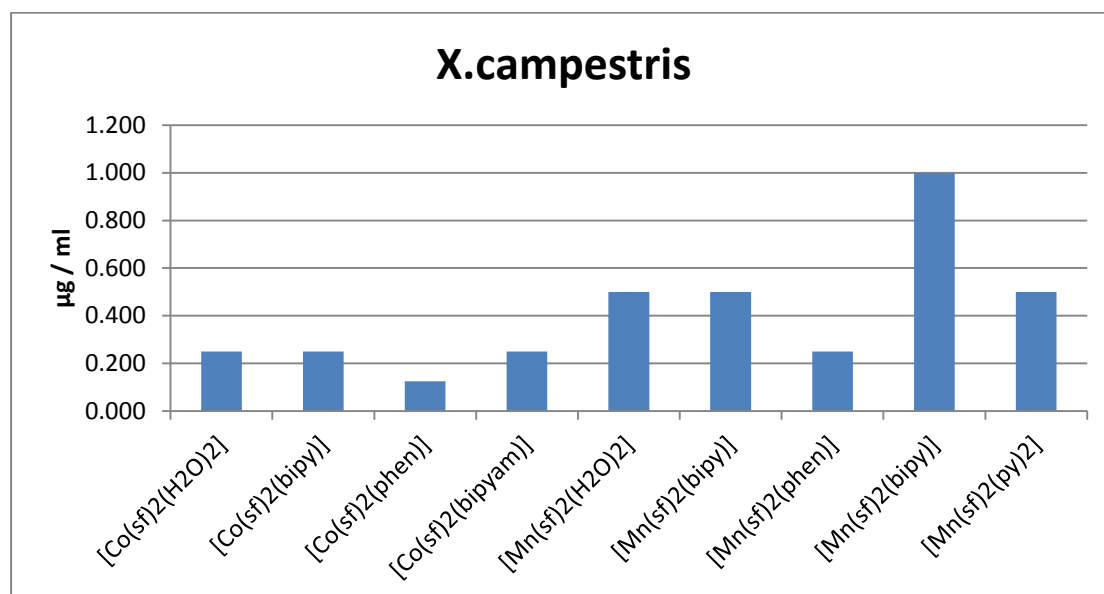
**Διάγραμμα 1:** MIC Sparfloxacin



### 3.1.1. *X.Campestris*

Στο διάγραμμα 2 παρατηρούμε τις MICs των συμπλόκων με την *sparfloxacin* και συγκεκριμένα το  $[\text{Co}(\text{sf})_2(\text{phen})]$  παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση (MIC: 0,125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) σε σχέση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα, απέναντι στην αρνητική κατά *Gram X.campestris*, καθώς και βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση, με το συνδυασμό κινολόνης και συμπλόκου μετάλλου.

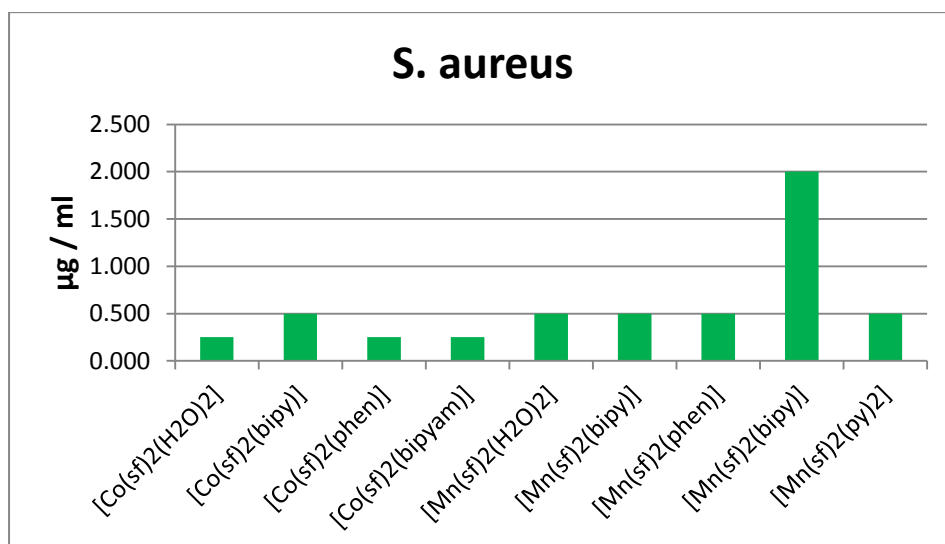
**Διάγραμμα 2:** MIC *X.campestris*



### 3.1.2. *S.Aureus*

Στο διάγραμμα 3 παρατηρούμε τις MICs των συμπλόκων της *sparfloxacin* και συγκεκριμένα τα σύμπλοκα  $[\text{Co}(\text{sf})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ ,  $[\text{Co}(\text{sf})_2(\text{phen})]$  και  $[\text{Co}(\text{sf})_2(\text{bipyam})]$  παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση (MIC: 0,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) σε σχέση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα, απέναντι στον θετικό κατά *Gram S.aureus*. Παρά ταύτα, ο συνδυασμός των ανωτέρω συμπλόκων δεν επέφεραν βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση σε συνδυασμό με την *sparfloxacin*.

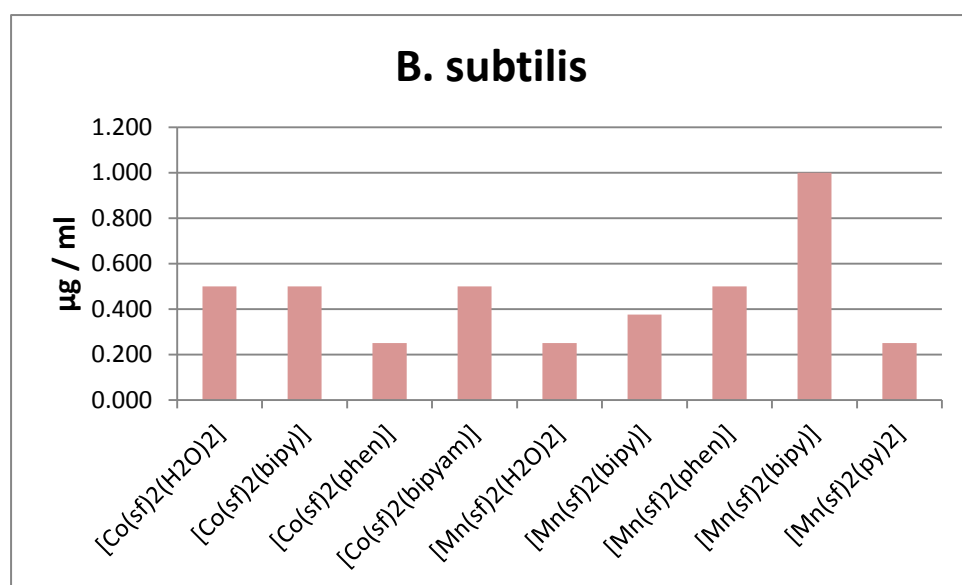
**Διάγραμμα 3:** MIC *S.aureus*



### 3.1.3. *B. Subtilis*

Στο διάγραμμα 4 παρατηρούμε τις MICs των συμπλόκων της *sparfloxacin* και συγκεκριμένα τα σύμπλοκα  $[\text{Co}(\text{sf})_2(\text{phen})]$ ,  $[\text{Mn}(\text{sf})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  και  $[\text{Mn}(\text{sf})_2(\text{py})_2]$  παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση (MIC: 0,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) σε σχέση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα, απέναντι στον θετικό κατά *Gram B.subtilis*. Επιπλέον, ο συνδυασμός των ανωτέρω συμπλόκων παρουσιάζει βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση σε συνδυασμό με την *sparfloxacin* (MIC: 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), απ' ότι η τελευταία από μόνη της .

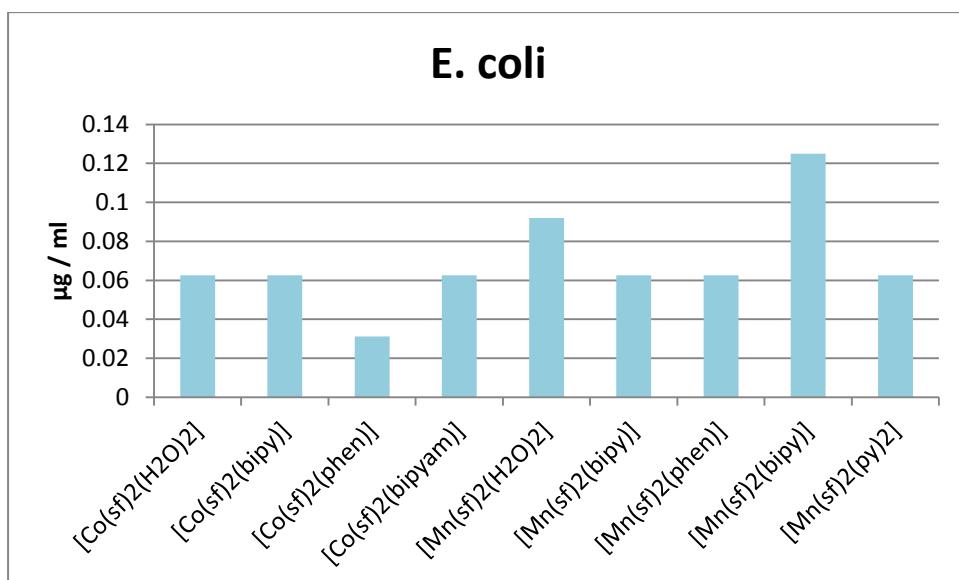
**Διάγραμμα 4:** MIC *B.subtilis*



### 3.1.4. *E. coli*

Στο διάγραμμα 5 παρατηρούμε τις MIC των συμπλόκων με την *sparfloxacin* και συγκεκριμένα το σύμπλοκο  $[\text{Co}(\text{sf})_2(\text{phen})]$ , παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση (MIC: 0,0312  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) σε σχέση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα, απέναντι στην αρνητική κατά *Gram E.coli*. Επιπλέον, ο συνδυασμός των ανωτέρω συμπλόκων παρουσιάζει βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση σε συνδυασμό με την *sparfloxacin*, σε σύγκριση με τη δραστηριότητα μόνο της κινολόνης (MIC: 0,062  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

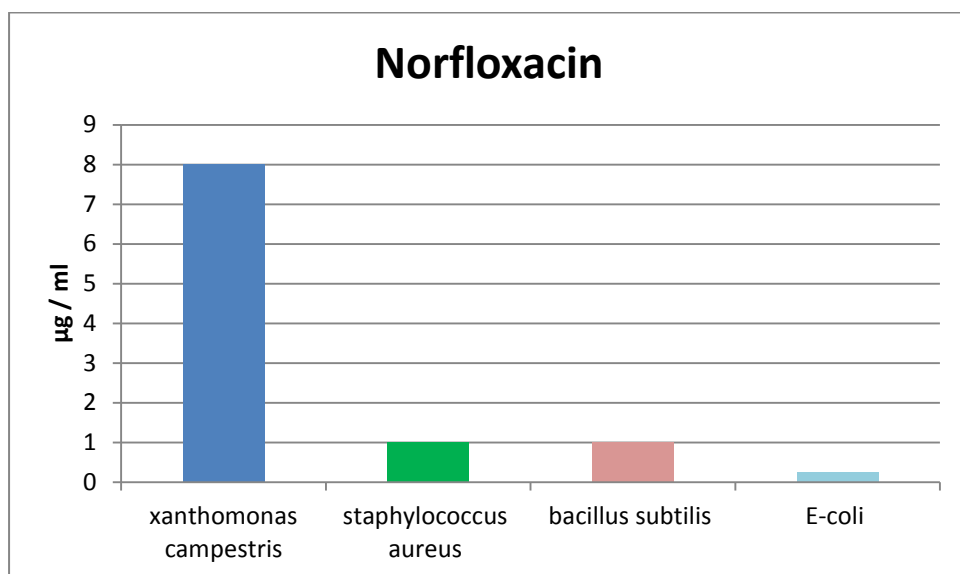
**Διάγραμμα 5:** MIC *E.coli*



### 3.2. Norfloxacin

Η *norfloxacin* είναι κινολόνη δεύτερης γενιάς και παρουσιάζει αυξημένη δράση ενάντια σε *Gram* - αρνητικά βακτήρια. Στο διάγραμμα 6, διακρίνουμε ότι η *norfloxacin* είναι πολύ δραστική (MIC:0,25 µg/ml) προς το στέλεχος της *E.coli*, που είναι *Gram* – αρνητικό βακτήριο, ενώ λιγότερο δραστική εμφανίζεται στο στέλεχος του *S.aureus* και του *B.subtilis* (*Gram* - θετικά βακτήρια) καθώς λάβαμε τιμή MIC: 1 µg/ml και ελάχιστη δράση στο στέλεχος της *X.campestris* (*Gram* - αρνητικό) καθώς μας έδωσε τιμή MIC 8 µg/ml) σε σύγκριση με τα υπόλοιπα βακτηριακά στελέχη.

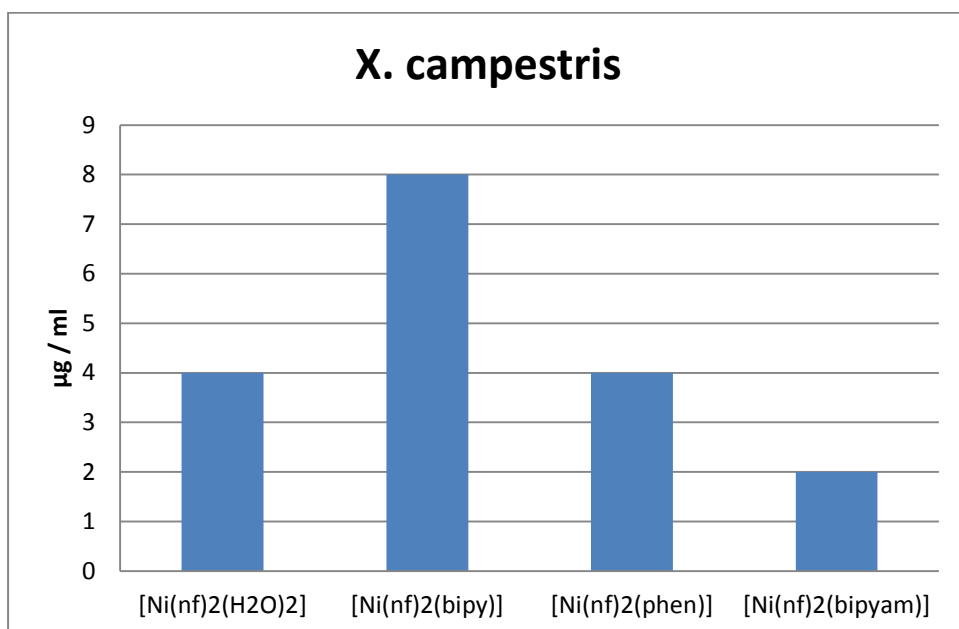
**Διάγραμμα 6:** MIC Norfloxacin



### 3.2.1. *X. Campestris*

Στο διάγραμμα 7 παρατηρούμε τις MICs των συμπλόκων με την *norfloxacin* και συγκεκριμένα το  $[\text{Ni}(\text{nf})_2(\text{phen})]$  παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση (MIC: 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) σε σχέση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα απέναντι στην αρνητική κατά *Gram X.campestris*. Ακόμα, παρατηρούμε ότι ο συνδυασμός της *norfloxacin* με σύμπλοκο μετάλλου αυξάνει την αντιμικροβιακή της δράση.

**Διάγραμμα 7:** MIC *X.campestris*

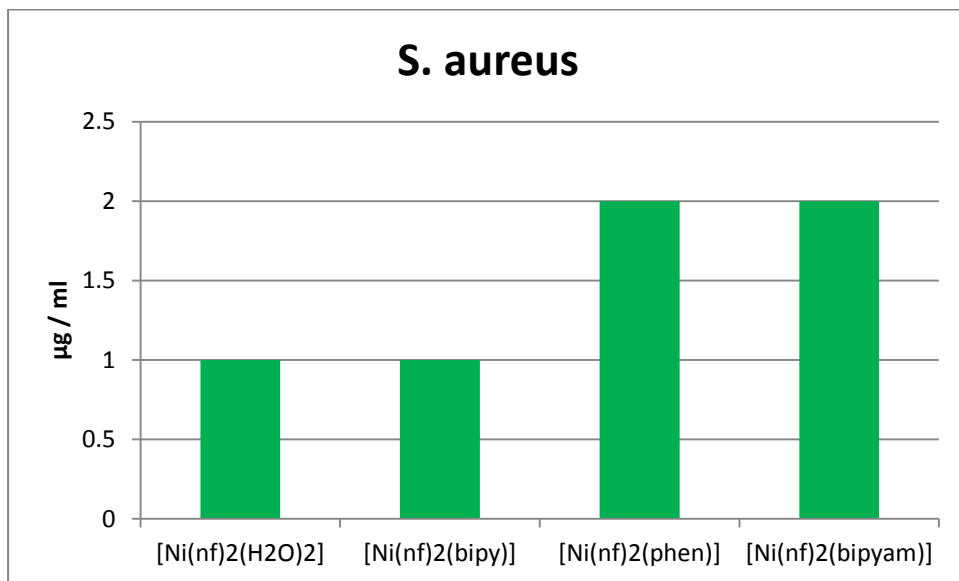




### 3.2.2. *S.Aureus*

Στο διάγραμμα 8 παρατηρούμε ότι τα πρώτα δυο σύμπλοκα εμφανίζουν μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση (MIC: 1 μg/ml) σε σχέση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα, απέναντι στον θετικό κατά *Gram S.aureus*. Παρά ταύτα, ο συνδυασμός των ανωτέρω συμπλόκων δεν επέφεραν βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση σε συνδυασμό με την norfloxacin.

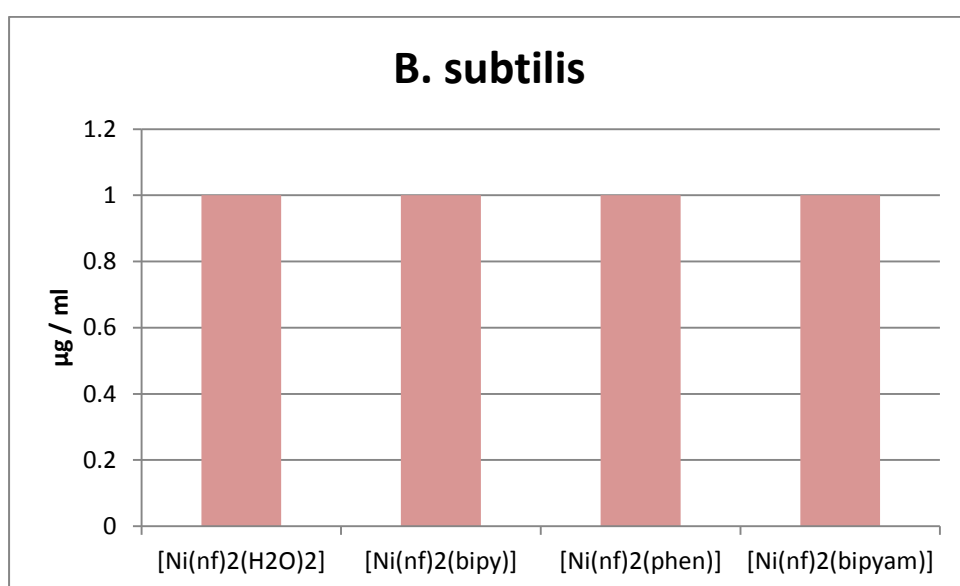
**Διάγραμμα 9:** MIC *S.aureus*



### 3.2.3 *B. Subtilis*

Στο διάγραμμα 10 παρατηρούμε τις MICs των συμπλόκων με την *norfloxacin* και παρατηρούμε ότι όλα παρουσιάζουν όμοια αντιμικροβιακή δράση (MIC: 1  $\mu\text{g/ml}$ ) απέναντι στον θετικό κατά *Gram B.subtilis*. Επιπλέον, ο συνδυασμός των ανωτέρω συμπλόκων, δεν παρουσιάζει βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση σε συνδυασμό με την *norfloxacin* (MIC: 1  $\mu\text{g/ml}$ ), απ' ότι η κινολόνη από μόνη της.

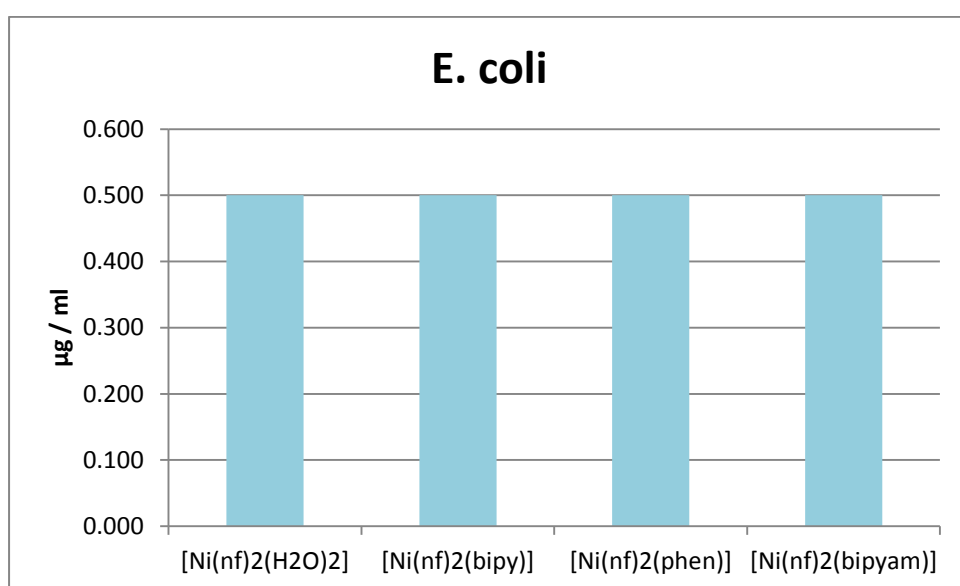
**Διάγραμμα 10:** MIC *B.subtilis*



### 3.2.4. *E. coli*

Στο διάγραμμα 11 παρατηρώντας τις MICs των συμπλόκων με την *norfloxacin* συμπεραίνουμε ότι όλα τα σύμπλοκα παρουσιάζουν όμοια αντιμικροβιακή δράση (MIC: 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) απέναντι στην αρνητική κατά *Gram E.coli*. Παρ' όλα αυτά, ο συνδυασμός των ανωτέρω συμπλόκων με την *norfloxacin*, δεν παρουσιάζει βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση σε συνδυασμό με την *norfloxacin*.

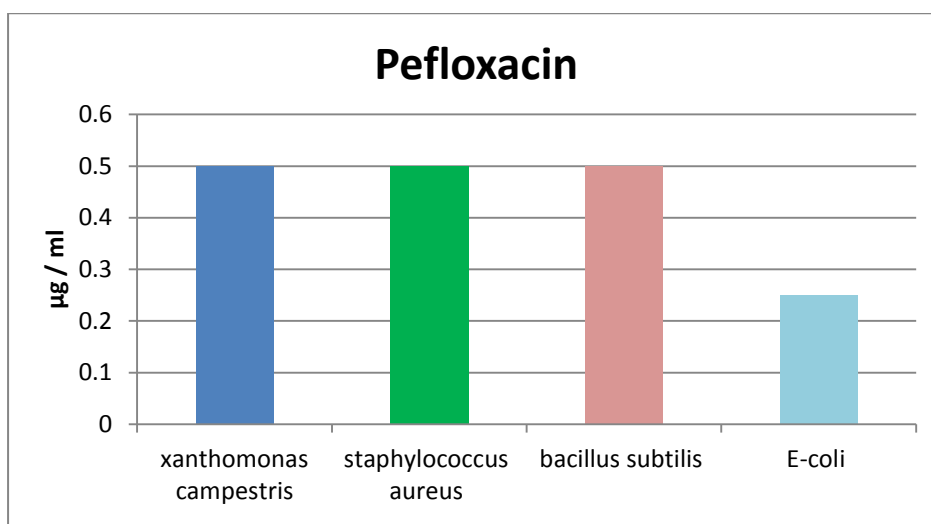
**Διάγραμμα 11:** MIC *E.coli*



### 3.3. Pefloxacin

Η *pefloxacin* είναι κινολόνη δεύτερης γενιάς και παρουσιάζει αυξημένη δράση ενάντια σε *Gram* - αρνητικά βακτήρια. Στο διάγραμμα 12, διακρίνουμε ότι η *pefloxacin* είναι πολύ δραστική (MIC:0,25 µg/ml) προς το στέλεχος της *E.coli*, που είναι *Gram* – αρνητικό βακτήριο, ενώ λιγότερο δραστική εμφανίζεται στα στελέχη του *S.aureus* και του *B.subtilis* (*Gram* - θετικά βακτήρια) καθώς και στο στέλεχος της *X.campestris* (*Gram* - αρνητικό), αφού λάβαμε τιμή MIC: 0,5 µg/ml

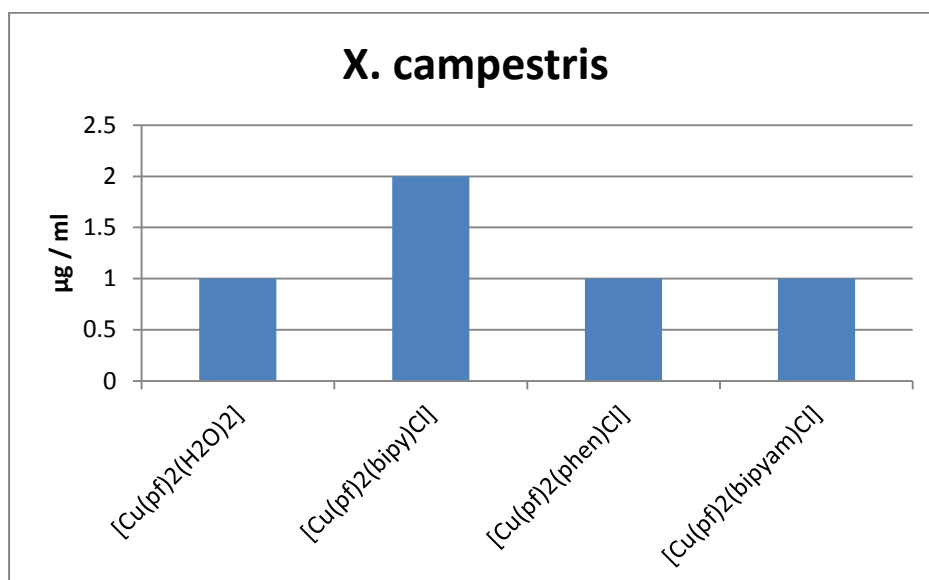
**Διάγραμμα 12:** MIC Pefloxacin



### 3.3.1. *X.campestris*

Στο διάγραμμα 13 εξετάζουμε τις MICs των συμπλόκων με την *refloxacin* και παρατηρούμε ότι όλα τα σύμπλοκα, πλην του  $[\text{Cu}(\text{pf})_2(\text{bi}py)\text{Cl}]$  παρουσιάζουν όμοια αντιμικροβιακή δράση (MIC: 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), σε σχέση με το δεύτερο (MIC: 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) κατά σειρά σύμπλοκο, απέναντι στην αρνητική κατά Gram *X.campestris*. Ακόμα, παρατηρούμε ότι ο συνδυασμός της *refloxacin* με τα εν λόγω σύμπλοκα μετάλλων, δεν αυξάνουν την αντιμικροβιακή της δράση.

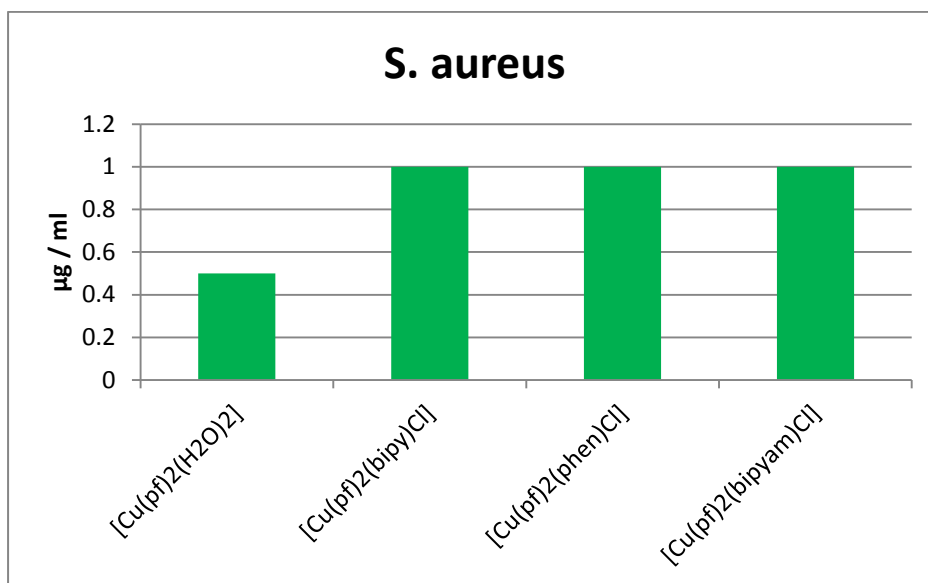
**Διάγραμμα 13:** MIC *X.campestris*



### 3.3.2. *S.Aureus*

Στο διάγραμμα 14 παρατηρούμε ότι το σύμπλοκο  $[\text{Cu}(\text{pf})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  εμφανίζει μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση (MIC: 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) σε σχέση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα, απέναντι στον θετικό κατά *Gram S.aureus*. Παρά ταύτα, ο συνδυασμός των ανωτέρω συμπλόκων και συγκεκριμένα του  $[\text{Cu}(\text{pf})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  δεν επέφερε βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση σε σύγκριση με τη δράση της *refloxacin* και μόνο.

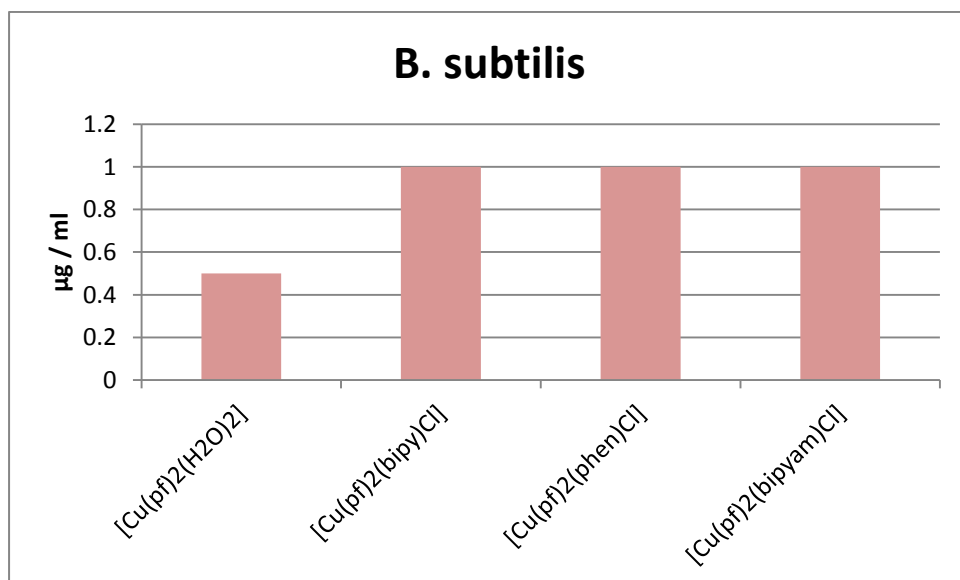
**Διάγραμμα 14:** MIC *S.aureus*



### 3.3.3. *B.Subtilis*

Στο διάγραμμα 15 παρατηρούμε τις MICs των συμπλόκων με την *refloxacin* και παρατηρούμε ότι όλα παρουσιάζουν όμοια αντιμικροβιακή δράση (MIC: 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) απέναντι στον θετικό κατά Gram *B.subtilis*, πλην του  $[\text{Cu}(\text{pf})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  το οποίο εμφανίζει μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα. Επιπλέον, ο συνδυασμός των ανωτέρω συμπλόκων, δεν παρουσιάζει βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση σε συνδυασμό με την *refloxacin*, απ' ότι η κινολόνη από μόνη της.

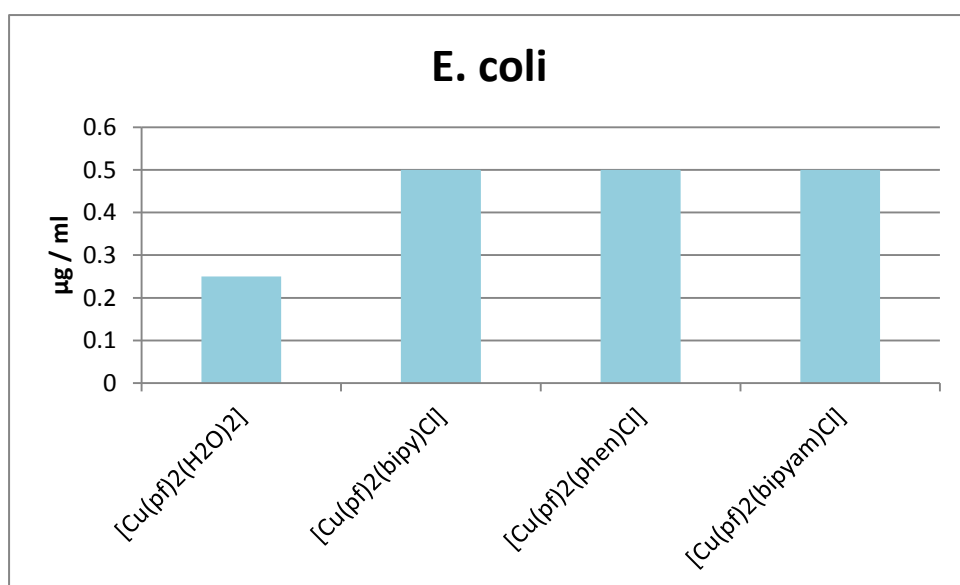
**Διάγραμμα 15:** MIC *B.subtilis*



### 3.3.4. *E. coli*

Στο διάγραμμα 16 παρατηρώντας τις MICs των συμπλόκων με την *refloxacin* συμπεραίνουμε ότι όλα τα σύμπλοκα παρουσιάζουν όμοια αντιμικροβιακή δράση (MIC: 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) απέναντι στην αρνητική κατά *Gram E.coli.*, εκτός όμως του συμπλόκου  $[\text{Cu}(\text{pf})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ , το οποίο εμφανίζει μεγαλύτερη δραστηριότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα. Παρ' όλα αυτά, ο συνδυασμός των ανωτέρω συμπλόκων με την *refloxacin*, δεν παρουσιάζει βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση.

**Διάγραμμα 16:** MIC *E.coli*

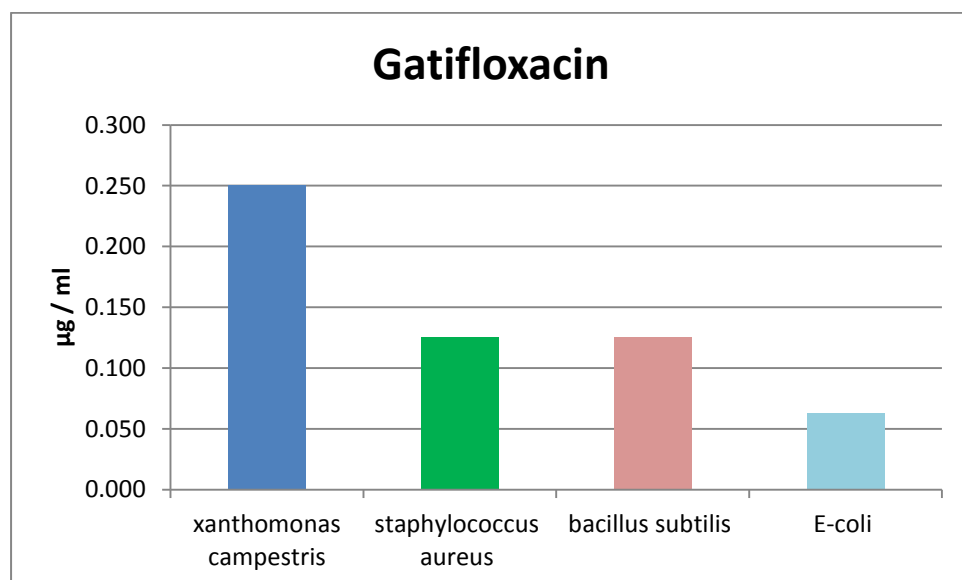




### 3.4. Gatifloxacin

Η *gatifloxacin* είναι κινολόνη τρίτης γενιάς και είναι δραστική ενάντια σε *Gram* - θετικά και σε *Gram* - αρνητικά βακτήρια όπως και η *sparfloxacin*. Στο διάγραμμα 17, διακρίνουμε ότι η *gatifloxacin* είναι πολύ δραστική (MIC:0,063 μg/ml) προς το στέλεχος της *E.coli*, που είναι *Gram* – αρνητικό βακτήριο, λιγότερο δραστική στα στελέχη του *S.aureus* και του *B.subtilis* (MIC:0,125 μg/ml) που είναι *Gram* – θετικά βακτήρια και ακόμα λιγότερο στο στέλεχος της *X.campestris* (*Gram* αρνητικό), στο οποίο έδειξε την μικρότερη σχετικά δραστικότητα (MIC 0,250 μg/ml).

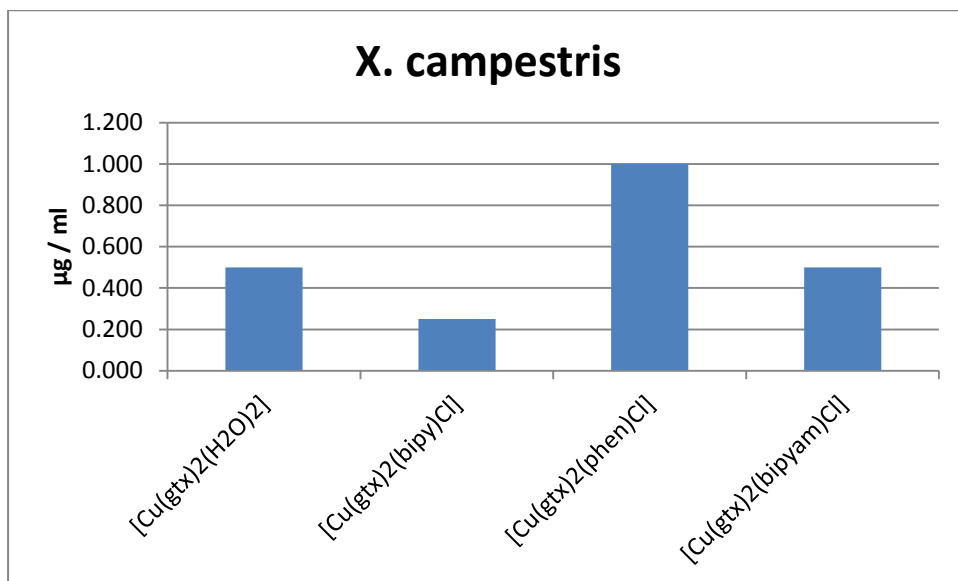
**Διάγραμμα 17:** MIC Gatifloxacin



### 3.4.1. *X. Campestris*

Στο διάγραμμα 18 εξετάζουμε τις MICs των συμπλόκων με την *gatifloxacin* και παρατηρούμε ότι το  $[Cu(gt\chi)_2(bipy)Cl]$  παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση (MIC: 0,25  $\mu\text{g/ml}$ ) σε σχέση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα, απέναντι στην αρνητική κατά *Gram X.campestris*. Παρ' όλα αυτά, δεν διακρίνουμε βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση, με το συνδυασμό κινολόνης και συμπλόκου μετάλλου σε σχέση με τη δράση μόνο της *gatifloxacin*.

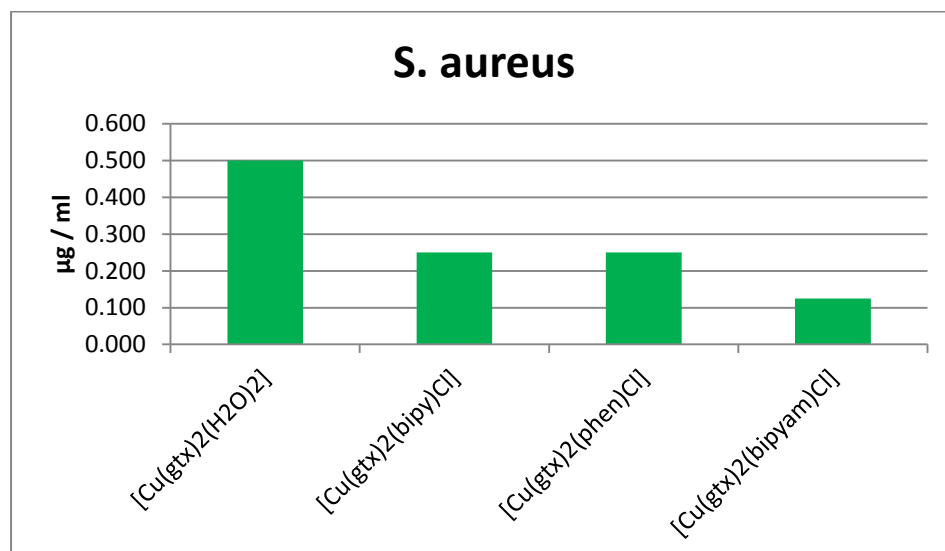
**Διάγραμμα 18:** MIC *X.campestris*



### 3.4.2. S.Aureus

Στο διάγραμμα 19 παρατηρούμε τις MICs των συμπλόκων της *gatifloxacin* και συγκεκριμένα το σύμπλοκο  $[Cu(gtx)_2(bipyam)Cl]$  εμφανίζει τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση (MIC: 0,125  $\mu g/ml$ ), αμφότερα, στα σύμπλοκα  $[Cu(gtx)_2(bipy)Cl]$  και  $[Cu(gtx)_2(phen)Cl]$  παρατηρούμε μικρότερη δραστηριότητα και στο  $[Cu(gtx)_2(H_2O)_2]$  παρατηρούμε τη μικρότερη αντιμικροβιακή δράση, σε σχέση με τα προηγούμενα απέναντι στον θετικό κατά *Gram* *S.aureus*. Παρά ταύτα, ο συνδυασμός των ανωτέρω συμπλόκων δεν επέφεραν βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση απ' ότι η *gatifloxacin* μόνη της.

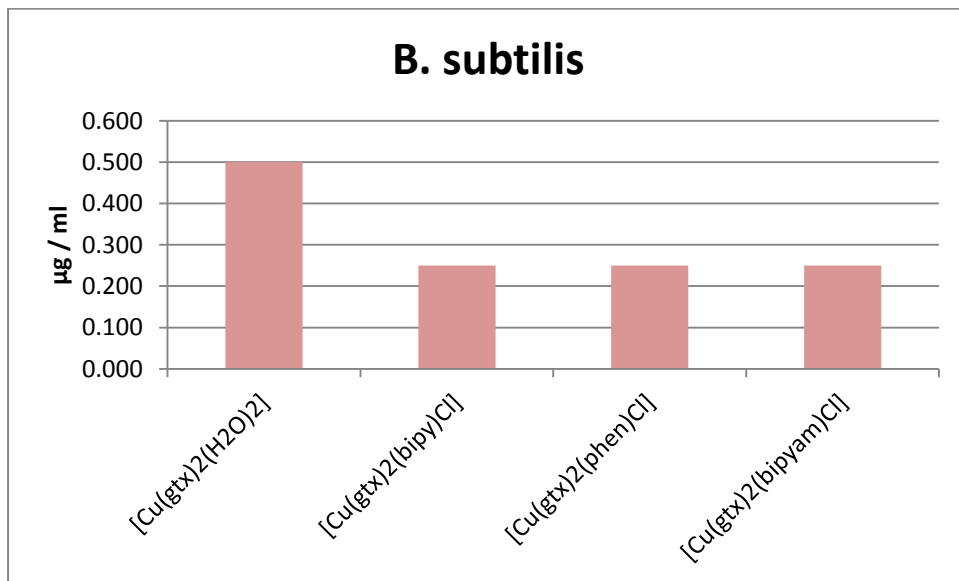
**Διάγραμμα 19:** MIC *S.aureus*



### 3.4.3. *B.Subtilis*

Στο διάγραμμα 20 παρατηρούμε ότι το πρώτο κατά σειρά σύμπλοκο εμφανίζει τη μικρότερη αντιμικροβιακή δράση, εν συγκρίσει με τα υπόλοιπα σύμπλοκα, τα οποία φέρουν την ίδια τιμή MIC (0,25 µg/ml). Καταλήγοντας, ο συνδυασμός των ανωτέρω συμπλόκων με την *gatifloxacin* δεν βελτίωσαν την αντιμικροβιακή της δράση έναντι του στελέχους του *B. subtilis*.

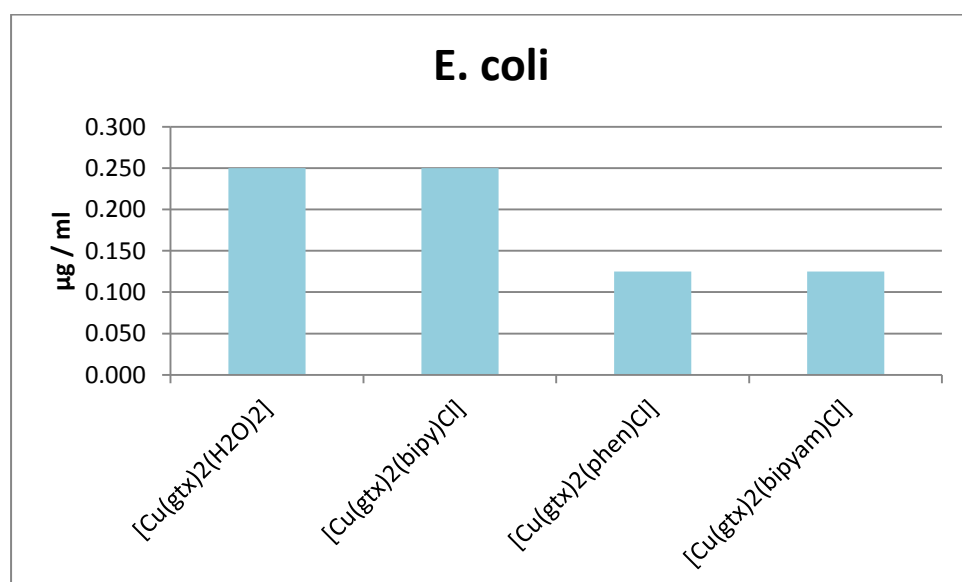
**Διάγραμμα 20:** MIC *B.subtilis*



### 3.4.4. *E. coli*

Στο διάγραμμα 21 παρατηρώντας τις MICs των συμπλόκων με την *gatifloxacin* συμπεραίνουμε ότι τα σύμπλοκα  $[\text{Cu}(\text{gtx})_2(\text{bipyam})\text{Cl}]$  και  $[\text{Cu}(\text{gtx})_2(\text{phen})\text{Cl}]$  παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση (MIC: 0,125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) απέναντι στην αρνητική κατά *Gram E.coli*. Τα υπόλοιπα σύμπλοκα εμφανίζουν μικρότερη αντιμικροβιακή δράση, σε σχέση με τα πρώτα, των οποίων οι τιμές MIC(0,025  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) είναι σχετικά ίδιες μεταξύ τους. Συνοψίζοντας, ο συνδυασμός των παραπάνω δεν βελτίωσε την αντιμικροβιακή δράση της *gatifloxacin*

**Διάγραμμα 21:** MIC *E.coli*



## 4. Συμπεράσματα - Συζήτηση

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε ήταν τόσο η θεωρητική, όσο και η εργαστηριακή προσέγγιση του θέματος. Από την έρευνα βγήκαν κάποια βασικά συμπεράσματα.

Από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση συμπεραίνουμε ότι οι κινολόνες 2<sup>ης</sup> γενιάς (refloxacin, norfloxacin) παρουσιάζουν αυξημένη αντιμικροβιακή δράση στα Gram αρνητικά βακτήρια. Αυτό διαπιστώθηκε και από τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας όπου διακρίνουμε αυξημένη αντιμικροβιακή δράση απέναντι στην Gram αρνητική *Escherichia coli*. Οι κινολόνες 3<sup>ης</sup> γενιάς (sparfloxacin, gatifloxacin) παρουσιάζουν αυξημένη αντιμικροβιακή δράση τόσο σε Gram αρνητικά όσο και σε Gram θετικά. Από τα αποτελέσματα της έρευνας διαπιστώνουμε ότι κάτι τέτοιο είναι πιθανόν να ισχύει καθώς παρατηρείτε αυξημένη αντιμικροβιακή δράση τόσο σε Gram αρνητικό βακτήριο (*E.coli*) όσο και σε Gram θετικό (*S.Aureus*).

Σε ένα γενικό σύνολο, ο συνδυασμός των συμπλόκων μετάλλων με τις κινολόνες τους δεν παρουσίασαν βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση. Παρ' όλα αυτά όμως, σε μια κινολόνη και συγκεκριμένα στην sparfloxacin, ο συνδυασμός της με σύμπλοκα μετάλλων έφερε σημαντικά βελτιωμένη αντιμικροβιακή δράση απέναντι στα βακτηριακά στελέχη.

Πιο αναλυτικά, στο στέλεχος *X.campestris*, η sparfloxacin είχε τιμή MIC 0,5 μg/ml, ενώ των συμπλόκων [Co(sf)2(phen)], [Co(sf)2(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>], [Co(sf)2(bipy)], [Co(sf)2(bipyam)] και [Mn(sf)2(phen)] οι τιμές MIC ήταν 0,125, 0,25, 0,25, 0,25, και 0,25 μg/ml αντίστοιχα. Όπως φαίνεται το πρώτο από τα σύμπλοκα ([Co(sf)2(phen)]) βελτίωσε κατά πολύ την αντιμικροβιακή δράση της sparfloxacin.

Στο στέλεχος *B.subtilis* η sparfloxacin είχε τιμή MIC επίσης 0,5 μg/ml, ενώ των συμπλόκων [Co(sf)2(phen)], [Mn(sf)2(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] και [Mn(sf)2(py)<sub>2</sub>] οι τιμές MIC ήταν 0,25, 0,25, και 0,25 μg/ml αντίστοιχα. Καταλήγοντας διακρίνουμε ότι και τα τρία σύμπλοκα βελτίωσαν σημαντικά την αντιμικροβιακή δράση της sparfloxacin.

Μεγάλο ενδιαφέρον έδειξε ο προσδιορισμός της MIC με την sparfloxacin για το στέλεχος της E.coli, της οποίας η αναστολή της ανάπτυξης σημειώθηκε στην ελάχιστη συγκέντρωση των 0,0625 µg/ml. Παρ' όλα αυτά, το σύμπλοκο μετάλλου [Co(sf)<sub>2</sub>(phen)] σημείωσε την μοναδική και συνάμα τη μεγαλύτερη βελτίωση στην αντιμικροβιακή δράση του συμπλοκού της sparfloxacin η οποία παρουσίασε τιμή MIC 0,0312 µg/ml.

Συνοψίζοντας, η πλειοψηφία των συμπλόκων μετάλλων, που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες της έρευνας, δεν βελτίωσαν την αντιμικροβιακή δράση των κινολονών, με εξαίρεση την sparfloxacin και ιδιαίτερα το σύμπλοκο [Co(sf)<sub>2</sub>(phen)], το οποίο μας έδωσε τη μεγαλύτερη βελτίωση για όλα τα βακτηριακά στελέχη πλην ενός, του S.aureus.

## 5. Βιβλιογραφία

- **Andrews M. Jennifer**, Determination of minimum inhibitory concentrations, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2001) 48, *Suppl. S1*, 5–16, p. 5.
- **Barrère, 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. Ferreira, Cristian G. Oddo, M. Verónica 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), *Turk. 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 Belkum 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., Koksal, 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\_1 Issue\_5\_1 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.

