دراسة إمكانية قتل بكتريا *Escherichia coli* بعد تشعيعها بليزر الدايود بقدرتين 3و7 واط .

ندى سهيل احمد * مازن كريم مصطفى** ابتهال حميد نصيف ***

*مدرس مساعد- جامعة ديالى- كلية العلوم- قسم الفيزياء .Tboo_2010@yahoo.com
**مدرس مساعد- جامعة ديالى- كلية العلوم- قسم الفيزياء . Mazen kream@yahoo.com
***مدرس مساعد- جامعة ديالى- كلية العلوم- قسم علوم الحياة . Ebtehal_3050@yahoo.com

المستخلص

تم في هذا البحث استخدام نوعين من ليزر الدايود لقتل بكتريا *Escherichia coli* الأول بطول موجي 808 نانومتر وقدرة 3 واط والثاني بطول موجي 1064نانومتر وقدرة (7 واط). شععت عينات من المحلول الفسيولوجي الحاوي على بكتريا *Escherichia coli* في ثلاثة أحجام0.3،0.2،0.1 سم^{3}في أنابيب اختبار بحجم (0.5) سم ^{3} وبفترات زمنية مختلفة . أظهرت النتائج بعد التشعيع حصول أعلى نسبة قتل 100 %للبكتريا بليزر الدايود (3 واط) لفترة تعرض 20 دقيقة . سجلت أعلى نسبة قتل 100% لليزر الدايود (7 واط) لفترة تعرض 1.5دقيقة .

الكلمات المفتاحية : قتل البكتريا بالليزر ، ليزر الدايود .

المقدمة

أن تطبيقات الليزر فاقت حدود التصور وربما لا يعقل عند غير المختصين بفيزياء الليزر أنه يستعمل كملقط بصري optical trap في تدوير الخلايا rotational cellsوأحداث شق في أحد جوانب جدار الخلية بل وأحداث تثبيط Inactivation في أحد الجينات في DNA الخلية الحية غير المرغوب فيها، ولا عجب أن يستعمل الليزر في تعقيم الماء وبعض المواد الغذائية كطريقة من طرائق التعقيم الفيزيائية مثل استعمال الحرارة والضغط والموجات فوق الصوتية والأشعة فوق البنفسجية والبلازما فضلا عن الطرائق الكيميائية الأخرى (Ben Hatit وآخرون،1996) .

قد يتبادر إلى الذهن أن هذه الطريقة تبدو مكلفة فيما إذا طبقت في معامل تصفية المياه وإنتاج المواد الغذائية ألا أنه بمجرد الاطلاع على فوائد هذا التطبيق فأنه سيبدو الأمر مستحقا للعناية وعندما يكون لليزر قابلية قتل الابواغ (Spores) البكترية والتي هي أكثر مقاومة من الخلايا الخضرية بأكثر من 40 مرة وهو فارق كبير جدا قياسا بالطرائق التقليدية التي لا تستطيع قتلها بهذا الليزر قد حقق انجازا عظيماً(Celesk وآخرون ،1997) تتكون الأنظمة البيولوجية من جزيئات مترابطة مع بعضها والجزيئات تتكون من ذرات مترابطة مع بعضها بأواصر كيميائية وتمتلك الأنظمة البيولوجية العديد من ذرات العناصر الطبيعية كالكاربون ولأوكسجين والنتروجين والفوسفات وغيرها ، وترتبط مع بعضها بأواصر مختلفة مثل الأواصر التساهمية Covalent bonds والأواصر الأيونية Ionic bonds والأواصر الهيدروجينية Hydrogen bonds . ترتبط الذرات في الجزيئات العضوية بأواصر تساهمية وهي من أهم الأواصر في أي نظام بيولوجي وهي تلك التي تكون(N-H), C-N) (,(C-O), (C-H), (C-C) (Chan و Chien ،1998) ،الآصرة الهيدروجينية فهي الأخرى ليست اقل اهمية من الاصرة التساهمية فهي المسؤولة عن تكوين الماء حيث تربط الأواصر الهيدروجينية جزيئات الماء سوية لتكوين نظام تشابكي متغير وهذا التآصر يجعل الماء سائلا ومع

تاريخ استلام البحث 25 / 3 / 2013 .
تاريخ قبول النشر 7 / 5 / 2013 .

ذلك فهو ذو درجة غليان عالية نسبيا كما أن التاصر الهيدروجيني مسؤول عن خواص العديد من الجزيئات ذات الأهمية البايولوجية مثل DNA الخلية والبروتين أن الآصرة الهيدروجينية اضعف بكثير من الآصرة التساهمية (Cobb وآخرون، 1999) .

لقد عرف عن بعض المواد بأنها تظهر ملونة بسبب احتوائها على بعض المجاميع الفعالة التي لها القابلية على امتصاص أشعة ذات أطوال موجية محددة عند إضاءتها بالضوء الأبيض فمثلاً تبدو مادة ما زرقاء في ضوء الشمس نظراً لوجود مجموعة فعالة لها القابلية على امتصاص الأشعة التي تقع في المنطقة المرئية من الطيف الكهرومغناطيسي وتعرف هذه المجاميع الفعالة التي تمنح المواد ألوانا معينة بالكروموفورات Cromophore (حامل اللون) أن معظم هذه المجاميع الحاملة للون تحتوي على أواصر غير مشبعة مثل C=C,C=O,N=N وهي جزيئات كبيرة نسبيا ولها أهمية كبيرة في عملية تخليق الطاقة للخلية (Gutknect وآخرون ،2000).

البكتيريا (Bacteria) :

كائنات واسعة الانتشار في الطبيعة توجد بآلاف الأنواع و تقع في مئات الأجناس . تصنيف البكتيريا وفق مظهرها الخارجي (مجموعة غرام سالبة وموجبة) كما يمكن تصنيفها حسب حاجتها إلى الأوكسجين (بكتيريا هوائية ولا هوائية) ويمكن تصنيفها حسب مصادر الطـــــاقة (بكتيريا تستخدم الضوء للطاقة وبكتيريا تستخدم الحديد والمنغنيز والكبريت وغيرها) وهناك البكتيريا الضوئية اللاهوائية Anacrobic Photobactria البكتيريا الضوئية الهوائية Airobic Photobacteria وهي ذات أشكال مختلفة منها ذات أنماط خيطية المتفرعة والأنماط الخيطية غير المتفرعة ، فالبكتيريا مسؤولة عن الكثير من الأمراض مثل إصابات الجروح والتسمم الغذائي والحماة والخناق والجمرة الخبيثة و الكثير من الأمراض وتعد البكتيريا أكثر الأحياء المجهرية ضرراً وأمرضية بالانسان .

أن بكتيريا (*E. Coli*)من أشهر الأمثلة المعروفة عن البكتيريا المعوية كما أنها من أكثر الكائنات المجهرية التي تمت دراستها بصورة شاملة . تسبب إلتهابات القناة البولية والاسهال وإلتهاب السحايا . (Goodis وآخرون ، 2011 ؛ Gutknecht وآخرون، 2011).

المواد وطرائق البحث

جدول 1. الأوساط الزراعية المستعملة والمواد الكيميائية .

المواد المستعملة	المنشأ	الشركة
ماكونكي أكار	إنكليزي	Oxoide
كلوريد الصوديوم	إنكليزي	Oxoide
كحول أثيلي	إنكليزي	Oxoide
أكار-أكار	إنكليزي	Oxoide
ماكونكي بروث	إنكليزي	Oxoide

تهيئة العينات للتشعيع :

نقل وحفظ البكتيريا :

أستعملت بكتيريا *Escherichi coli* المتوفرة في مختبر الأحيـــــــاء المجـــــــهرية / كلية العلوم جامعة ديالى نقلت من وسط يحتوي على البكتيريا (تم عزلها سابقا) إلى وسط ماكونكي – أكار Mackonky – Agar تحت ظروف معقمة وحضنت بدرجة 37م ومدة (48 – 24) ساعة وبعد نمو وظهور المستعمرات تم حفظها في الثلاجة لحين إستعمالها

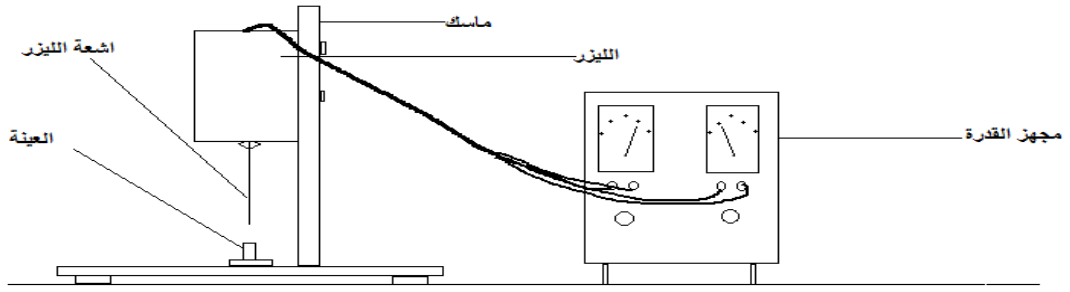
للتشعيع ، أجريت عملية النقل وذلك بأخذ مسحة من سطح المزرعة البكتيرية بواسطة الشراج (loop) بعد ذلك تم الزرع للبكتيريا بطريقة التخطيط (Streaking).

تحضير البكتيريا لغرض التشعيع :

تم سكب 9سم^3 من المحلول الفسيولوجي المعقم في كل أنبوب من أنابيب الاختبـ ـ ـ ـ ـ ـار.
أجري تلويث1سم^3 من المحلول الفسيولوجي في أنبوبة إختبار بالبكتيريا *Escherichi coli* وذلك بواسطة الشراج ورُج المحلول جيداً لضمان توزيع البكتيريا بشكل متجانس وهو جاهز للتشعيع.
أخذ 1سم^3 من المحلول الفسيولوجي في أنبوب الاختبار الذي تم نقل البكتيريا فيه ووضع في أول أنبوبة الإختبار التي تحوي على 9سم^3 من المحلول الفسيولوجي ليصبح الحجم 10 سم^3 ورُج أيضاً وتستمر العملية لكل الانابيب .
اخذ 0.2سم^3 من الأنبوب الأخير والذي قبله أحيانا ويتم زرعه في أطباق الوسط المغذي Nutrient Agar وذلك لحساب أعداد البكتيريا الحية قبل التشعيع وقد حسب عدد البكتيريا في الأنبوب الأصلي وفي كل تجربة تشعيع ليزرية ثم أجري تشعيع العينات بالليزر .
بعد التشعيع سكب 0.2سم^3 في اطباق الوسط المغذي الصلب ونشر جيداً على السطح ثم تم حساب أعداد المستعمرات بعد 24 ساعة في الحاضنة وذلك لغرض حساب أعداد البكتيريا التي بقيت حية بعد التشعيع .

التشعيع بالليزر ثنائي الوصلة (3واط) :

يصنف ليزر الدايود من ليزرات أشباه الموصلات الذي يعمل بمجهز قدرة بسيطة بفولطية لا تتجاوز 4 فولت يبعث بطول موجي 810 نانومتر .
تم تركيب الجهاز عمودياً وذلك ليسقط الشعاع مباشرة على العينة كما هو واضح في الشكل (1) .
لم يتم إستعمال عدسة لآمة لأن قطر الاشعاع كان صغيراً والعينة وضعت قريباً جداً من فتحة خروج الليزر.
أستعملت ثلاثة أحجام من المحلول الفسيولوجي الملوث 0.3، 0.2 ، 0.1 سم ثم عرضت العينات للتشعيع بالليزر للفترات 20 ، 15 ، 10 ، 5 دقيقة .
تم وضع أنابيب الاختبار داخل قطعة من الفلين تستعمل كماسك جيد وحفظ العينة من المؤثرات الخارجية كالحرارة .
بعد التشعيع بالليزر تم زرع العينات في الوسط المغذي الصلب وحضنت في الحاضنة مدة 24 ساعة تحت درجة حرارة 37م .
تم حساب المستعمرات البكتيرية في الأطباق حيث تمثل كل مستعمرة بكتيرية واحدة .



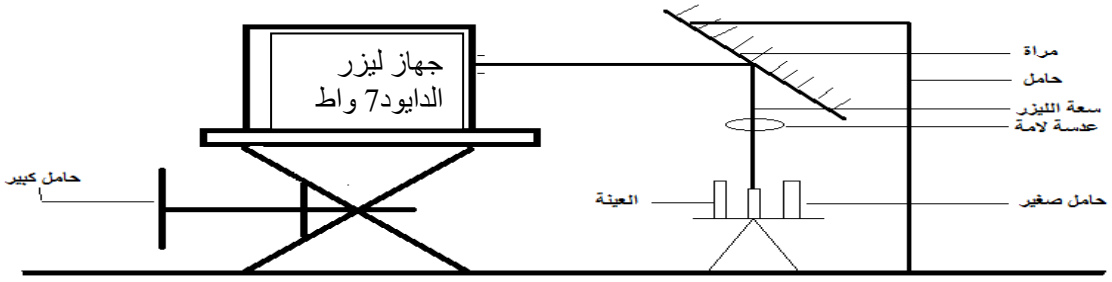
شكل 1. التشعيع بليزر الدايود ذي القدرة (3واط).

التشعيع بالليزر ثنائي الوصلة (7واط) :

وهو من ليزرات أشباه الموصلات يبعث في المنطقة تحت الحمراء من الطيف مجهز بمجهز قدرة خاص به ذي طول موجي 1065 نانومتر .

أستعملت الأحجام السابقة نفسها في ليزر ثنائي الوصلة (3واط)لكن بفترات مختلفة حيث شععت في فترات (1.5 ، 1 ، 0.5) دقيقة .

أستعملت عدسة لآمة ذات بعد بؤري 15سم ثم أستعملت عدسة بعدها البؤري 20سم لأن الأشعة كانت ذات قطر كبير كذلك تم إستعمال مرآة عاكسة بحيث يسقط الاشعاع عمودياً على العينة. كما في الشكل (2) ثم تم إكمال التشعيع كما في ليزر ثنائي الوصلة (3واط) .

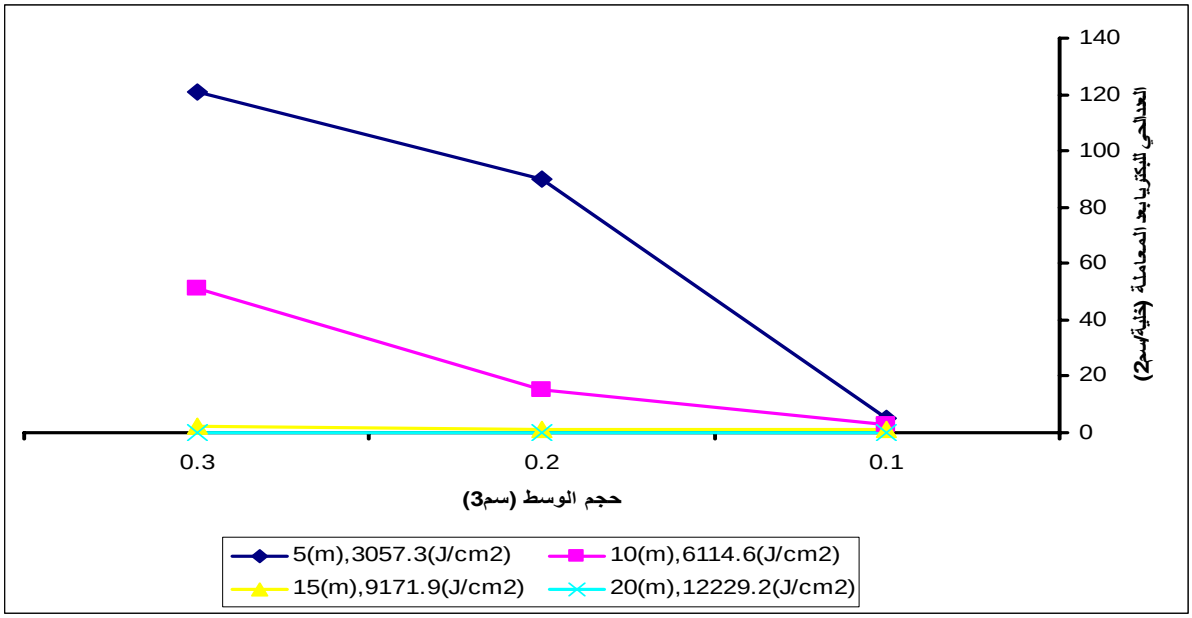


شكل 2. التشعيع بليزر الدايود ذي القدرة (7واط) .

النتائج والمناقشة

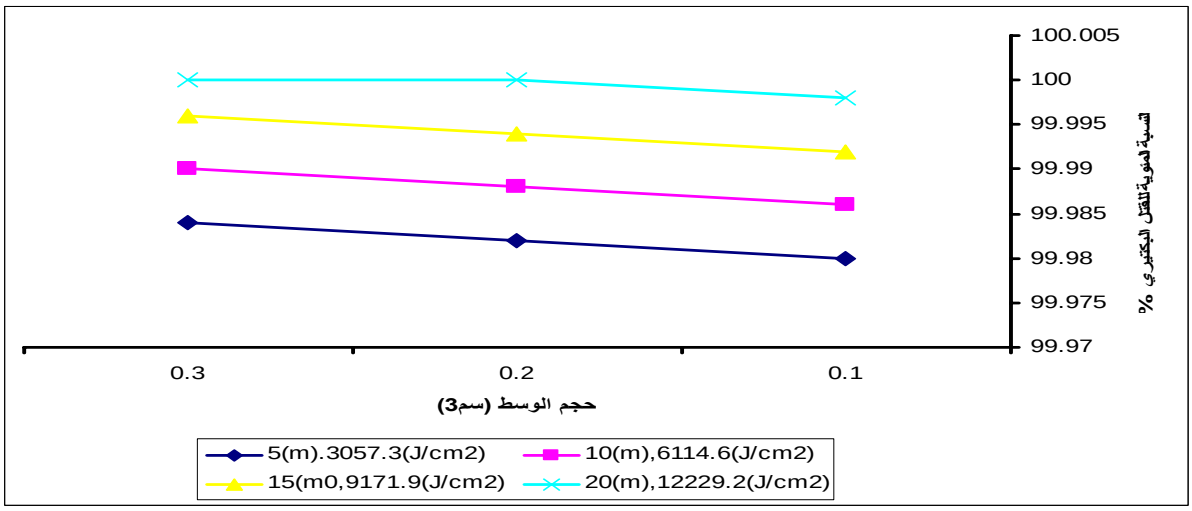
نتائج التشعيع بليزر ثنائي الوصلة (3واط):

أسفرت نتائج التشعيع بليزر ثنائي الوصلة (3واط) عن انخفاض كبير في أعداد الخلايا الحية حيث تراوحت الأعداد بعد المعاملة بليزر مابين **0-121** خلية /سم3 في حين كانت الأعداد الحية قبل المعاملة **9×10^5** خلية / سم 3 ويظهر الشكل (2) تناقص الأعداد الحية مع زيادة مدة التشعيع أو مع زيادة الجرعة وتقليص حجم الوسط الفسيولوجي والشكل (3) يبين العدد الحي المتبقي من البكتريا بعد التعرض لليزر ثنائي الوصلة (3واط).



شكل 3. يمثل العدد الحي للبكتريا E.coli بعد تعرضها الى ليزر ثنائي الوصلة (3واط).

أما في الشكل (4) فيبين نسبة القتل البكتيري بعد التعرض لليزر وقد تم الحصول على نسبة قتل تراوحت مابين **99.98 % و100 %** ألا أن أعلاها كان عند المدة الزمنية **20** دقيقة حيث قتلت البكتريا نهائياً (**100%**) .



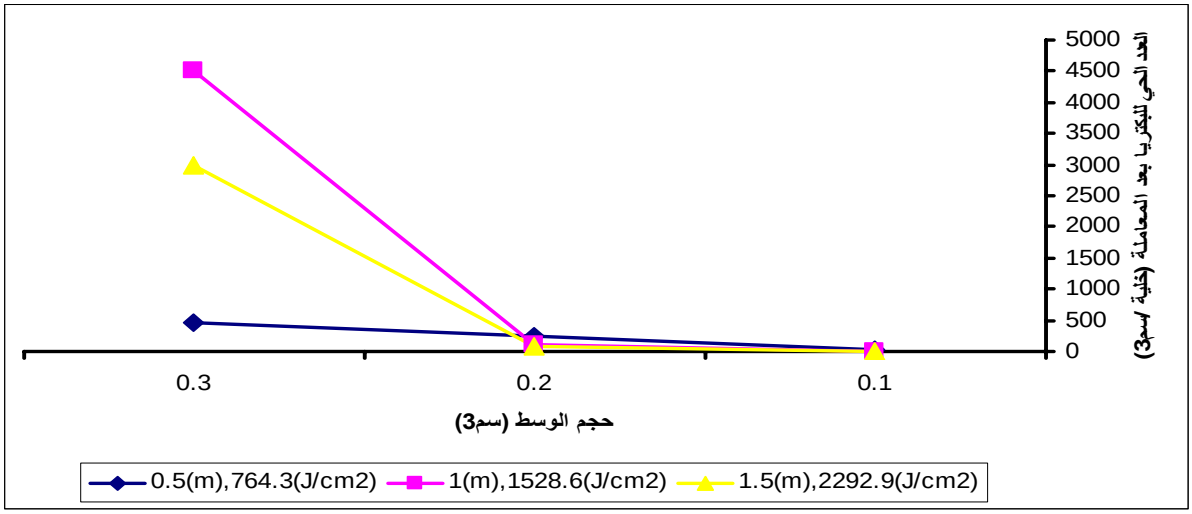
شكل 4. يمثل نسبة القتل البكتريا *E.coli* بعد تعرضها الى ليزر ثنائي الوصلة (3واط).

إن آلية القتل بليزر ثنائي الوصلة (3واط) هو قتل حراري بالدرجة الأولى حيث يبعث هذا الليزر طول موجياً 810 نانومتر وهذا الطول الموجي واقع في المنطقة تحت الحمـراء القريبـة حيـث تمـتص الكروموفورات هذا الطول الموجي ولكن بشكل قليل حيث تسبب الشدة العالية لليزر أكسـدة ضـوئية photo-oxidant بوجود الأوكسجين منتجة جذور نشطة كالأوكسجين الأحادي وهو يسـبب تحطـم جدران الخلية والإخلال بنفاذية ومهاجمة الأنزيمات وتلف البروتينات و DNA الخلية (Harris وLoomer ، 2003 ؛ Hardee وآخرون، 2002) أن العامل الممـتص الأكثـر فـي DNA الخلية هو الماء الموجود داخل وخارج DNA الخلية البكترية حيث تحتوي الخلية الخضـرية على 70 % من محتوياتها ماء (linke واخرون، 2004),حيث يمتص الأشعة تحت الحمراء بشـدة خاصة الأشعة تحت الحمراء المتوسطة والبعيدة (Linواخرون، 2008)، و تتحول الطاقة الممتصـة

الى حرارة أن ارتفاع درجة حرارة DNA الخلية يتسبب في تحطم الحـامض النـووي والأخـلال بوظيفة الغشاء البلازمي وأضرار تصيب الايض الخلوي وذلك بتثبيط الأنزيمات في درجات الحـرارة العالية واضرار تصيب DNA الخلية(Moritz واخـرون ، 2009) ، إن تحطـم DNA الخليـة البكتيرية *E.coli* بعد حضنها في درجة حرارة 52 م (Moritz وآخـرون ، 2011) . ان التـدرج الحاصل في نسبة القتل هو ان البكتريا ليس لها نفس المقاومة ضدالقتل ففي مرحلـة نموهـا تكـون متحسسة للتأثيرات الحرارية وكلما كانت مستقرة كانت اكثر مقاومـة (Ramskold وTromberg ، 2010).

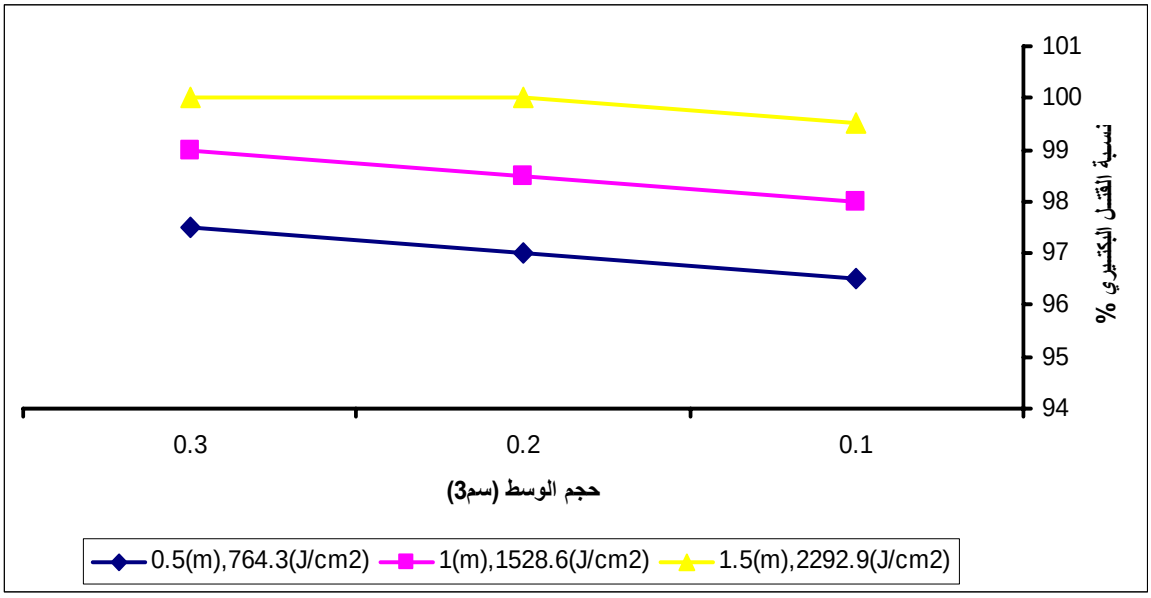
التشعيع بليزر ثنائي الوصلة (7واط):

عبرت نتائج التشعيع بليزر ثنائي الوصلة (7واط) في الشكل (5) عن انخفاض في أعداد الخلايا الحية البكتريا ***E.coli*** لأحجام مختلفة من الوسط بعد تعرضها لليزر الدايود (7واط) .



شكل 5. يمثل العدد الحي للبكتريا بعد تعرضها الى ليزر ثنائي الوصلة (7واط).

أظهرت نتائج الشكل (6)ارتفاع نسبة القتل البكتيري حيث تم الحصول على نسبة قتل **100%** عند حجم **0.1 سم**^{3} في فترتي التعرض هما 1،**1.5**دقيقة ، إن الطول الموجي لليزر ثنائي الوصلة (7واط) مقارب لليزر ثنائي الوصلة(واط) فكلاهما ينتميان الى الأشعة تحت الحمراء القريبة ولهما نفس التأثيرات الحرارية ولهذا لهما نفس آلية القتل البكتيري ان آلية القتل بليزر الثنائي الوصلة (7واط) لا تختلف عن ليزر ثنائي الوصلة (3واط)ألا ان المدة الزمنية المستغرقة للتشعيع أقصر من ليزر ثنائي الوصلة (3واط).فقد تم الحصول على نسبة قتل 100% بمدة قصيرة وهي دقيقة واحدة بالمقارنة مع ليزر ثنائي الوصلة(3واط) بمدة 20دقيقة ويعود السبب الى معدل قدرة عالية يتمتع بها ليزر ثنائي الوصلة يتسبب في تثبيطDNAالخلية (Rooney واخرون ، 2011).



شكل 6. يمثل نسبة القتل لبكتريا *E.coli* بعد تعرضها الى ليزر ثنائي الوصلة (7واط).

يعزى قتل البكتريا بليزر الدايود ذي القدرات المختلفة 3، **7** واط الى التأثير الحراري والضغط المتولد داخل الخلية البكتيرية نتيجة ارتفاع درجة الحرارة بسبب امتصاص الماء للأشعة تحت الحمراء مما يؤدي الى تمزق الخلايا الحية للبكتريا (Klinke وآخرون، 2004 ؛ Moritz وآخرون ، 2010).

الاستنتاجات :

1. أكدت نتائج عمليات التشعيع كفاءة الليزرات المستعملة من خلال التناقص البكتيري مع زيادة مدة التعرض .
2. تفوق ليـ ـ ـ ـ زر الدايود (7واط) ذي القدرة العالية على ليزر الدايود(3واط) بالقدرة الواطئة بجرعة اقل وزمن اقل خلال القتل البكتيري .
3. إمكانية حصول نسبة القتل 100 % بليزري الدايود (7، 3واط).

المصادر

Ben Hatit Y, R. Blum,C. Severin, M.Maquin and M.H Jabro .1996. The effects of a pulsed diode laser on subgingival bacterial flora and on cementum. laser. *B. Dent J*. 176:61-64**.**

Celesk R.A,R.M. McCabe and J. London. 1997. Colonization of the cementum surface of teeth by oral Gram-negative bacteria. *SPIE Proc*. 2973:221-226.

Chan Y and R. Chien .1998. Bactericidal action of diode laser radiation in periodontal pockets. Laser *Med. Surg* .17.161–164.

Cobb,C.M, T.K.McCawley and W.J. Killoy .1999. A preliminary study on the effects of the diode laser on root surfaces and microflora *In Vivo*. *Singapore*:185- 190.

Gutknect N,J. Fischer,G. Conrads and F. Lampert .2000. Bactericidal effects of the diode lasers in laser supported curettage. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62(4):1244-63.

Goodis H.E, J.M.Withe and S.J. Marshall. 2011. Evaluation of the diode laser in the root canal sterilisation. *J. Dent. Res.* 71- 77.

Gutknecht N, A.Moritz and G. Conrads,. 2011. The diode laser and its bactericidal effect in the root canal. An *in vitro* study.*Endodontics*: 3:217–222.

Hardee M.W, L.J.Miserendino,W. Kos and H.Walia .2002. Evaluation of the antibacterial effects of intracanal diode laser irradiation . *J.Endodont*. 30(8): 377-380.

Harris D.M.P and M .Loomer .2003. Ablation of *Porphyromonas gingivalis in vitro* with dental lasers**.** Laser.*Med. Surg*. 14, 77–80**.**

Hardee, M.W, L.J.Miserendino and W.Kos.2011. Evaluation of the antibacterial effects of the intracanal Nd:YAG laser irradiation.*J. Endodont*. 40:300-301.

Klinke T,W. Klimm and N. Gutknecht .2004. Antibacterial effects of diode laser irradiation within root canal dentin. J Clin Laser .*Med Surg*. 40(1):30.

Lin P,S. Rosen, F.M. Beck, M.Matsue and J.M. Horton .2008. A comparitive effect of the diode laser with root planing on subgingival anaerobes in periodontal pockets. *J. Dent Res*. 71:299.

Moritz A, N.Gutknecht, O.Doertbudak,K. Goharkhay, U.Schoop, P.Schauer and W.Sperr .2008. Bacterial reduction in periodontal pockets through irradiation with a diode laser. A pilot study. J Clin Laser. *Med. Surg*. 100(25):33-37.

Moritz A. S.Jakolitsch,K. Goharkhay, U.Schoop, W.Kluger,R. Malinger, W.Sperr and A.eorgopoulos .2009. Morphologic changes correlating todifferent sensitivities of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* to diode laser irradiation through dentin. Lasers .*Surg. Med*. 82: 250-261.

Moritz A,U. Schoop, K.Goharkhay, P.Schauer, O.Doertbudak,J. Wernisch and W.Sperr .2010. Treatment of periodontal pockets with a diode laser. *Lasers. Surg. Med*. 55:302-311.

Moritz A., U.Schoop and K.oharkhay.2011. The bactericidal effect of diode laser irradiation in the root canal: An *in vitro* comparison. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 50,161–164.

Ramskold L.O,C.Dng and T.Tromberg .2010. Thermal effects and antibacterial properties of energy levels required to sterilize stained root canals with an diode laser. *J. Endodont* 23(2):96-100.

Rooney J. M.Middaand J.Leeming.2011. A laboratory investigation of the bactericidal effect of a diode laser. *B. Dent. J*.176:61-64.

STUDY THE POSSIBILITY KILLING OF *Escherichia coli* AFTER IRRADIATION BY DIODE WITH TWO POWER (3,7)W LASER.

Nada Suheel Ahmad* MAZEN KAREAM** EBTEHAL HAMED NSAYF***

* Dept. of Physical Sciences-College of Sciences -University of Diyala.
Tboo_2010@yahoo.com.
** Dept. of Laser Science- College of Sciences -University of Diyala.
Mazen kaream@yahoo.com.
*** Dept. of Biology- College of Sciences -University of Diyala.
Ebtehal_3050@yahoo.com

ABSTRACT

In this study was used diode lasers to kill *Escherichia coli*.Two types of diode laser have been used. The first one 3-watt 810 nm wavelength and the second 7 watt wavelength 1064 nm. Irradiation of samples was taken place from the physiological saline containing the *Escherichia coli* in three sizes 0.3,0.2, 0.1 cm ³ in test tubes of size 0.5 cm³. Samples were irradiated at different periods of time for each laser. The results showed that after each irradiation a highest kill of 100% of the bacteria occurred by used laser diode (3 W) through a period of 20 minutes.

In the diode laser (7 W) a recording of the highest kill rate of 100% has been obtained in 1.5 min period.

Key words: laser diode ,kill bacteria .