

تأثير ليزر اشباه الموصلات على نمو بعض أنواع البكتريا السالبة لصبغة كرام

محمد طارش مطر صالح الحديدي
اعدادية الامجاد للبنين/ مديرية تربية نينوى/ الموصل
E-mail: Mohamedtaresh90@gmail.com

غادة عبد الرزاق محمد إبراهيم الطائي
قسم علوم الحياة / كلية العلوم/ جامعة الموصل
E-mail: Ghadaflower76@yahoo.com

الملخص

يمتاز الليزر بقدرته على قتل او تثبيط نمو الخلايا البكتيرية والابواغ، اذ تم دراسة تأثير الليزر ذي الطول الموجي 650 نانوميتر وبطاقة مقدارها 50 ملي واط / سم² بمسافة 10 سم على نمو اربعة انواع بكتيرية سالبة لصبغة كرام وهي كل من *Shigella* spp. و *Entereobacter cloacae* و *Morganella morganii* و *Enterobacter hormaechei* المعزولة من مرارة مستأصلة. بعد العزل والتشخيص حضرت المعلقات للبكتريا قيد الدراسة كل على حدة، عرضت لحزمة الليزر لمدة (5،2،0) دقيقة على التوالي، جرى نقل 0,1 مل من المعلق البكتيري وللتوقيات (5،2،0) دقيقة، ولقح على وسط اكار مولر هنتون وبواقع ثلاث مكررات. بعد التحضين أظهرت النتائج انخفاضاً في اعداد المستعمرات النامية وارتبطت شدة القتل بعلاقة طردية مع الزيادة في زمن التعريض، كما اظهرت النتائج تفاوتاً في حساسية البكتريا قيد الدراسة تجاه القتل بالليزر، حيث سجلت العزلة *E.cloacae* انخفاضاً في اعداد مستعمراتها من 144 قبل التعريض الى 80 و 28 مستعمرة بعد (2 و 5) دقائق من التعريض وبنسبة مئوية للقتل بلغت 45 % و 81 % على التوالي، كما سجلت العزلة *E.hormaechei* انخفاضاً في اعداد مستعمراتها من 109 قبل التعريض الى 62 و 25 مستعمرة وبنسبة مئوية للقتل بلغت 43% و 77% على التوالي بعد (2 و 5) من التعريض، كذلك انخفضت اعداد مستعمرات *Shigella spp* من 180 قبل التعريض الى 134 و 97 مستعمرة وبنسبة قتل بلغت 26% و 64% بعد (2 و 5) من تعريض على التوالي ، كما شهدت العزلة *M.morganii* انخفاضاً في اعداد مستعمراتها النامية بعد تعرضها لشعاع الليزر من 233 مستعمرة قبل التعريض الى 148 و 120 مستعمرة بعد (2 و 5) دقائق من التعريض وبنسبة مئوية للقتل بلغت 37 % و 48% على التوالي.

الكلمات الدالة: ليزر اشباه الموصلات، *Shigella* spp.، *Morganella morganii*، *Enterobacter* species.

المقدمة

الليزر هو مصدر يستخدم لتوليد الضوء المرئي وغير المرئي، يتميز بمواصفات لا تتواجد في الضوء الذي تصدره المصادر الطبيعية والصناعية، ان كلمة ليزر (Laser) هي اختصار للكلمات (Light Amplification by stimulated Emission of Radiation) اي تضخيم الضوء بواسطة الانبعاث المحفز بالإشعاع، حيث يعمل الليزر على توليد نوع من الضوء يختلف في مواصفاته عن الضوء الطبيعي والضوء الاصطناعي، يتميز الضوء الليزري بخصائص منها: تتركز الطاقة الضوئية في شعاع ذي مقطع عرضي صغير جداً لا يتجاوز عدة مايكرومترات مربعة لذا يسير مسافات طويلة محافظاً على طاقته ضمن هذا الشعاع، الميزة الأخرى: يتميز الليزر بكونه حزمة ضيقة من الترددات تختلف عن انواع الضوء الأخرى التي لها طيف واسع من الترددات لذا تبدو للعين كضوء ابيض يحتوي جميع الوان الطيف المرئي بينما يظهر الليزر بلون واحد كاللون الاحمر او الازرق او الاخضر (Moore, 1999).

لليزر القابلية على قتل ابواغ البكتريا التي تكون أكثر مقاومة من الخلايا الخضرية، كما له القدرة على تسريع شفاء التقرحات المتسببة عن البكتريا المقاومة للمضادات الحيوية، فمن المعروف ان لليزر ميزة الصفة الضوئية البايولوجية وهي تفاعل الاشعة الكهرومغناطيسية مع الخلايا البايولوجية حيث ان لليزر تأثيرات مباشرة يظهر تأثيرها خلال ثواني او دقائق بعد التعرض لليزر أو تأثير غير مباشر يظهر تأثيره بعد ساعات من التعرض لليزر (Reid and Strance, 1991).

ان انخفاض عدد الخلايا البكتيرية النامية مع زيادة فترة التعرض لحزمة اليزر الحمراء قد يكون ناتجاً من الانقسام الخلوي العشوائي بعد تنشيطها لمكونات السلسلة التنفسية التي تؤدي الى تغيير في اطلاق ايونات الهيدروجين وتزايد الـ ATP في الخلية وهذا بدوره سوف يحفز انتاج خلايا جديدة (Tiphlouva and Karu, 1995) ان التغييرات الحاصلة في محتوى الغشاء الخارجي للبكتريا تشمل استنطالة في سلسلة متعدد السكريات الدهني المتكون وبالتالي سوف تؤدي الى موت الخلية الجديدة ، كما قد يعزى قتل البكتريا بالليزر الى التأثير الحراري والضغط المتولد داخل الخلية نتيجة ارتفاع درجة الحرارة المتولدة نتيجة امتصاص الماء لطاقة حزمة الليزر مما يؤدي الى تمزق الخلايا البكتيرية (Janeway and Medzhitor, 2002).

لليزر استخدامات واسعة حيث استخدمه الاطباء كمشرط عالي الدقة لا يترك نزفاً ويصل الى اماكن في جسم الانسان قد لاتصل اليها مشارطهم الا بعد حدوث ضرر كبير كما استخدم في ازالة الاورام وتصحيح البصر وحفر الاسنان وتفتيت الحصى وعلاج الدمامل و التجاعيد، وقد اظهرت نتائج دراسة Word و Waston انخفاض اعداد المستعمرات بكتريا *Escherichia coli* النامية بعد تعريضها لليزر من نوع نيديميوم -ياك ذي القدرة (100 واط) وبطاقة نبضية مقدارها (10 جول) (Word and Waston, 2008)، كما أشار Hawkins و Abahomse الى استخدام الليزر ذي الطاقة الواطئة Low Level Laser Therapy ساعد في تسريع شفاء الجروح بسبب قتل البكتريا (Hawkins and Abrahomse, 2007).

تستخدم في المجالات الطبية عدة انواع من الليزر منها ليزر الياقوت المطعم بالكروم و ليزر هيليوم - نيون و ليزر الارجون المتأين و ليزر الكريبتون المتأين (Kr) و ليزر ثاني اوكسيد الكربون Co2 و ليزر النيوديميوم-ياك Nd: YAG و ليزر الصبغة و ليزر الاكسيمير Excimer (Legre et al., 2014).

اظهر الليزر من النوع هيليوم - نيون He-Ne تأثيراً واضح على نمو البكتريا *E.coli* اذ لوحظ تناقص في اعداد البكتريا النامية في الوسط السائل مع الزيادة في الفترة الزمنية للتعرض لحزمة الليزر وأعزي سبب القتل الى استنترات تفاعلات كيميائية داخل الخلية (Bin Sheba, 2000)، وأشار Bergans الى قدرة حزمة ليزر (Nd : YAG) على قتل او الحد من نمو 99% من البكتريا الموجودة في قناة جذر السن (Bergans et al., 2006).

الهدف من الدراسة الحالية تقييم قدرة ليزر اشباه الموصلات ذو الطوال الموجي 650 نانومتر على تثبيط وقتل البكتريا السالبة لصبغة كرام.

المواد وطرائق العمل

اجري البحث في مختبرات قسم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل للفترة من 2020/1/2 لغاية 2020/2/20.

أولاً: العزلات البكتيرية

نفذت الدراسة على اربعة انواع بكتيرية معزولة من مرارة مستأصلة جراحياً تم الحصول عليها من مستشفيات مدينة الموصل والتي تضمنت مستشفى السلام التعليمي ومستشفى الموصل العام والمستشفى الجمهوري والمستشفيات الاهلية مثل مستشفى الزهراوي الاهلي ومستشفى الربيع الاهلي وهذه الانواع البكتيرية هي *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Shigella spp* *Enterobacter hormaechei* , مشخصة مسبقاً بالطرق التقليدية اعتماداً على (Cappuccino and Welsh, 2017) و جزيئياً اعتماداً على (Winand et al., 2020).

ثانياً: تجربة تأثير الليزر على النمو البكتيري

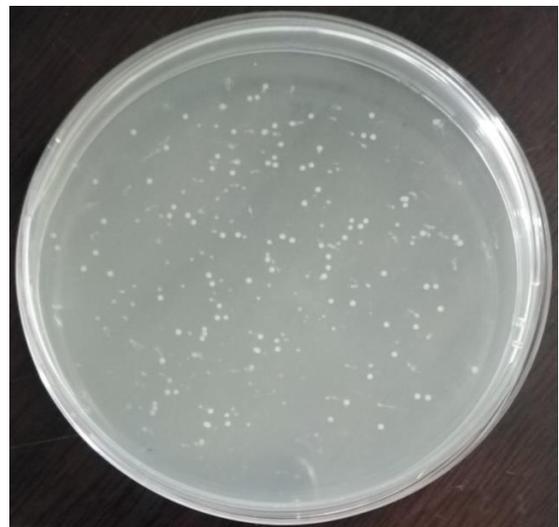
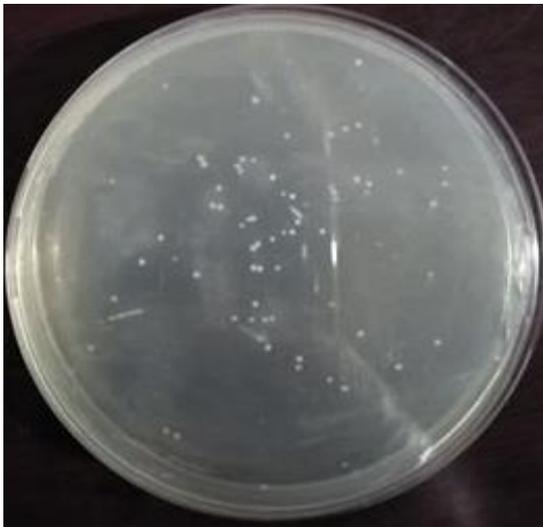
- نشطت العزلات البكتيرية بتميتها في وسط مرق نقيع القلب والدماغ وحضن بدرجة حرارة 37م ولمدة 18 ساعة.
- حضر المعلق البكتيري بأخذ 1 مل من وسط نقيع القلب والدماغ الحاوي على البكتريا (كل عزلة على حدة) ومزج مع 9 مل من المحلول الملحي الفسلجي المعقم للحصول على التخفيف 10^{-1} .
- حضرت سلسلة من التخافيف العشرية وذلك بنقل 1مل من التخفيف الأول الى 9 مل من المحلول الملحي الفسلجي المعقم وهكذا وصولاً الى التخفيف الرابع (10^{-4}).
- باستخدام ماصة دقيقة نقل 0.1 مل من اخر تخفيف (10^{-4}) لكل عزلة ونشر على وسط مولر هنتون باستخدام ناشر زجاجي باعتباره عينة سيطرة بزمن تعريض (0) دقيقة، ومن نفس التخفيف الرابع (10^{-4}) نقل 1.5مل من المعلق البكتيري الى انبوبة اختبار بلاستيكية معقمة وتم تعريضه الى حزمة الليزر الحمراء ذات الطول الموجي 650 نانوميتر وبطاقة 50 ملي واط /سم² وبمسافة مقدارها 10 سم وبفترات زمنية مقدارها (5,2) دقيقة مع رج الانبوبة كل دقيقة باستخدام جهاز ليزر اشباه الموصلات Diode laser المجهد من الشركة البريطانية UK. Scientific Ltd. كما موضح في الصورة (1)، ويعددها نقل 0.1 مل من المعلق البكتيري المعرض لحزمة الليزر الى وسط مولر هنتون ونشرت باستخدام ناشر زجاجي معقم وحضنت جميع الاطباق قبل وبعد التعريض لليزر بدرجة حرارة 37 م ولمدة 24 ساعة وتم حساب عدد المستعمرات البكتيرية النامية في الاطباق المعرضة وغير المعرضة لليزر وسجلت النتائج وجرى احتساب النسبة المئوية للقتل. اجريت التجربة بواقع ثلاث مكررات لكل عزلة بكتيرية. اجريت عملية التعريض اعتماداً على طريقة كل من (Mohammed, 2010 و Mohammed and Maki, 2017) مع اجراء بعض التعديلات بما يتلأم مع العزلات المدروسة ونوع الليزر المستخدم.



الصورة 1: جهاز الليزر المستخدم في الدراسة

النتائج و المناقشة

اظهرت نتائج الدراسة الحالية قدرة الليزر الاحمر (ذو الطوال الموجي 650 نانوميتر و بطاقة 50 ملي واط/ سم²) على تثبيط نمو البكتريا قيد الدراسة، وقد ظهر هذا التأثير على شكل انخفاض في اعداد المستعمرات البكتيرية النامية بعد تعريضها لشعاع الليزر مدة (5,2) دقائق، مقارنة بأعداد مستعمراتها النامية على الوسط الزرعي في عينة السيطرة. الصورة (2).

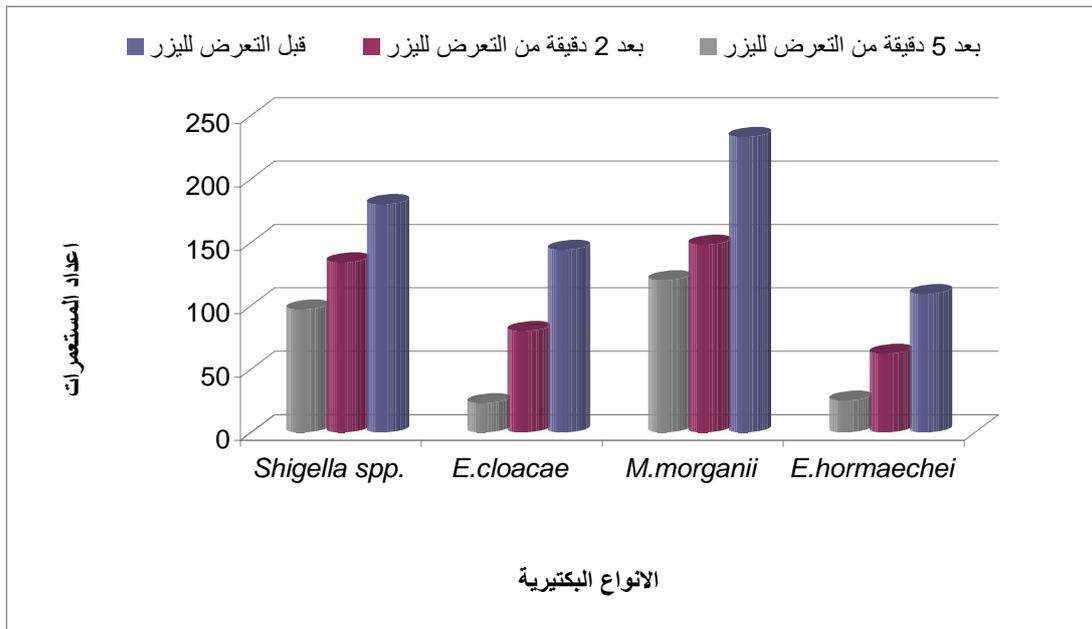


بعد التعريض لليزر

قبل التعريض لليزر

الصورة 2: تأثير الليزر على نمو بكتريا *E.cloacae* قبل وبعد التعريض له

تشير النتائج الموضحة في الشكل (1) و(الجدول 1) قدرة الليزر الاحمر (ذو الطول الموجي 650 نانوميتر وبطاقة 50 ملي واط /سم²) على تثبيط نمو البكتريا قيد الدراسة وقد تناسبت شدة القتل تناسباً طردياً مع الزيادة في زمن التعريض مقارنة مع عينة السيطرة، وقد تباينت النسبة المئوية للقتل للبكتريا المدروسة، فقد أظهرت عزلة البكتريا *E.cloacae* انخفاضاً في اعداد مستعمراتها من 144 قبل التعريض الى 80 و28 مستعمرة بعد (2 و 5) دقائق من التعريض وبنسبة مئوية للقتل بلغت 45 % و81% على التوالي كما سجلت *E.hormaechei* انخفاضاً في اعداد مستعمراتها النامية من 109 قبل التعريض الى 62 و25 مستعمرة بنسبة مئوية للقتل بلغت 43 % و77% على التوالي خلال فترة تعريض 2 و5 دقائق، كذلك اظهرت البكتريا *Shigella spp* انخفاضاً في اعداد مستعمراتها من مستعمرة 180 قبل التعريض الى 134 و97 مستعمرة بنسبة قتل بلغت 26 % و64 % بعد فترة تعريض (2 و5) دقائق على التوالي، كما شهدت بكتريا *M.morganii* هي الاخرى انخفاضاً في اعداد مستعمرات النامية بعد تعرضها لشعاع الليزر فقد انخفضت من 233 مستعمرة قبل الى 148 و120 مستعمرة بعد (2 و5) دقائق من التعريض وبنسبة مئوية للقتل بلغت 37% و48% على التوالي.



الشكل 1: تأثير الليزر على اعداد مستعمرات البكتيرية قيد الدراسة بعد 2 و 5 دقائق من تعريضها لليزر

الجدول 1: النسبة المئوية لانخفاض عدد مستعمرات البكتيرية قيد الدراسة بعد (2-5) دقائق من التعريض لليزر

العزلات البكتيرية	% لانخفاض عدد المستعمرات بعد (2) دقيقة من التعرض لليزر	% لانخفاض عدد المستعمرات بعد (5) دقيقة من التعرض لليزر
<i>Shigella spp.</i>	26	64
<i>E.cloacae</i>	45	81
<i>M.morganii</i>	37	48
<i>E.hormaechei</i>	43	77

بالرغم من وجود العديد من الدراسات التي تناولت تأثير الليزر على الانواع المختلفة من البكتريا الا اننا لم نجد في تلك البحوث تشابهاً مع الانواع البكتيرية المستخدمة في دراستنا الحالية وقد تكون هذه الدراسة هي الاولى على مستوى الانواع البكتيرية. وعلى الرغم من ان الية القتل بالليزر قد لا تختلف من بكتريا الى اخرى الا اننا لم نتمكن من اجراء المقارنة على مستوى النوع بسبب عدم وجود بحوث مقارنة في هذا المجال.

نتج تأثير الليزر على البكتيريا من التداخل الحاصل بين شعاع الليزر ومكونات الجدار الخلوي للبكتيريا والتي تعتمد بالأساس على مقدار الطول الموجي وطاقة الليزر، فعند ارتطام شعاع الليزر بالجدار الخلوي البكتيري فان طاقته سوف تمتص من قبل الخلية مما يؤدي الى زيادة في الطاقة الحركية للجزيئات الخلوية والتي تعمل بدورها على توليد طاقة حرارية ناتجة من الطاقة الضوئية وهذه الأخيرة سوف تتسبب بتحطم الجدار الخلوي وخروج مكونات الخلية (Ali,1999).

أظهرت نتائج دراستنا الحالية تقاربا مع ما توصل اليه Mohammed اذ وجد بان استخدام ليزر أشباه الموصلات ذي طول موجي 650 نانوميتر وبطاقة 120 واط كان ذي تأثير مثبت لنمو بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* بعد تعريضها لليزر لمدة (5,10,15,20,25) دقيقة وان هذه القدرة على القتل تتناسب طرديا مع الفترة الزمنية للتعرض. (Mohammed, 2010).

كما توافقت نتائجنا مع ما توصل اليه الباحثان Mohammed و Maki اذ بينا ان تعريض البكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* إلى شعاع ليزر أشباه الموصلات بطول موجي 410 نانوميتر وبطاقة مقدارها 100ملي واط/ سم³ و لفترة (13,19) دقيقة تسبب بانخفاض أعداد المستعمرات البكتيرية النامية مقارنة مع عينة السيطرة (Mohammed and Maki, 2017).

تعتمد التطبيقات الطبية لليزر على طبيعة تفاعله مع المادة الحية فعند سقوط حزمة الليزر على نظام حيوي فانه يعاني من عدة حالات كالاستطارة Scattering والانعكاس Reflection والنفاذية Transmission والامتصاص Absorption و هذا يعود الى نوع الليزر المستخدم و الخصائص الفيزيائية للخلايا الحية، يعد العلاج بالليزر نوع من التنظيم الضوئي الذي يستعمل من اجل تغيير الفعاليات الحيوية للأنسجة او الخلايا، لليزر تأثير كيميائي حراري وليس حراري فقط، ومن اجل الحصول على افضل النتائج وتجنب إحداث الأضرار بالأنسجة الحية عند المعالجة يتوجب اختيار الطول الموجي والطاقة المناسبة.

الاستنتاجات

نستنتج من هذه الدراسة بان لليزر أشباه الموصلات (ذو الطول الموجي 650 نانوميتر وبطاقة مقدارها 50 ملي واط /سم² و بمسافة 10سم) تأثيرا قاتلا للبكتيريا قيد الدراسة وان النسبة المئوية للقتل ارتبطت بعلاقة طردية مع الزيادة في زمن التعرض وقد تجلت هذه النتيجة من خلال انخفاض اعداد المستعمرات البكتيرية النامية على الوسط الزرع مع الزيادة زمن التعرض.

المصادر

- Ali, C.I. (1999). The effect of laser photochemical agents and thermal stress on some virulence factor of *Staphylococcus aureus* isolated from wounds. University of Tikrit (thesis).
- Bergans, L.; Moisiadis, D.; Teughels, W.; von Meerbrck, B.; Quivyaen, M.; Lambrachts, P. (2006). Bactericide effect of Nd-YAG laser irradiation on endodontic pathogens ex vivo. *Int. Edu. J.*, **39**, 547.
- Bin Sheba, O. (2000). The effect of helium neum and nitrogen lasers on cells *Escherichia coli* and studying their genetic content. University of Baghdad, Department of Biotechnology and Genetic Engineering, MA.
- Cappuccino, J.G.; Welsh, C. (2020). "Microbiology a Laboratory Manual". 12th ed. Pearson Education Inc. pp.151-223.
- Hawkins, O.; Abrohomse, H. (2007). Phototherapy a treatment modality for wound healing and pain relief. *Af. Bio.*, **10**, 99-109.
- Janeway, C.A.; Medzhitor, R. (2002). Innate immune recognition. *Anna Rev. J.*, **20**(25),97-216.
- Legre, L.G.; Chamot, C.; Varna, M.; Janin, M. (2014). The laser technology: New Trends in Biology and Medicine. *J. Mod. Physics.*, **5**, 267-279.
- Mohammed, M.G.; Maki, A.M. (2017). Effect of 410nm diode laser irradiation on the growth of brun wounds associated bacteria. *Pseudomona aeruginosa* and *Staphylococcus. Iraqi J. laser B.*, **16**, 11-19.
- Mohammed, Y.K. (2010). The effect of diode laser on the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wounds. *J. Madenat Alelem College*, **2** (2).

- Moore, C.B. (1999). "Chemical and Biochemical of Laser Application". Printed in N.X academic 2nd, Vol.1, pp. 339-390.
- Reid, A.B.; Strance, M.F. (1991). Healing of infected wound following iodine scribe or CO₂ laser treatment. *Laser Surge. Med. J.*, **11**, 475-480.
- Tiphlouva, O.; Karu, T. (1995). Action of low intensity laser radiation of *Escherichia coli*. Ph.D. thesis Laser Technology Center of the USSR Academic of Science. Mos Cow: pp.1-25.
- Winand, R.; Bogaorts, B.; Hoffnon, S.; Lefevre, L.; Vanneste, K. (2020). Targeting the 16s RNA gene for bacterial identification in complex mixed samples. *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (1), 298.
- Word, G.D.; Waston, I.A. (2008). Bactericidal action of high-power Nd-YAG laser light on *Escherichia coli* suspension. *J. Appl. Microbiol.*, **1**(89), 517.

The Effect of Diode Laser on Growth of some Gram-Negative Bacteria

Mohammad T. Selah

*Al-Amjad Preparatory School for Boys /
Nineveh Education Directorate / Mosul*

E-mail: Mohamedtaresh90@gmail.com

Ghada A. Mohammad

*Department of Biology / College of Science /
University of Mosul*

E-mail: Ghadaflower76@yahoo.com

ABSTRACT

The Laser is distinguished of it's the ability to kill or inhibit the growth of bacterial cells and spores, the effect of laser with (650 nm wavelength and a capacity of 50 mw/cm² and a distance of 10 cm) were studied on the growth of four species of gram-negative bacteria: *Shigella spp.*, *Entereobacter cloacae*, *Morganella morganii*, and *Entereobacter hormaechei*, All of them isolated from an eradicated gallbladder were diagnosed with conventional methods. After isolation and identification, the bacterial suspensions were prepared separately for each bacterium understudy, then were exposure to the laser beam for a period of (0,2,5) minutes, respectively, after that 0.1 ml of bacterial suspension for timings (0,2,5) min. were transported to the Muller-Hinton agar with triplicate.

After incubation, the results showed a clear decrease in the number of developing colonies, and the intensity of the killing was associated with direct relationship with increasing the time of exposure. The results also showed a variation in the bacterial sensitivity under study to killing by laser, Where the isolate *E.cloacae* recorded decreasing in the number of its colonies from 144 before exposure to 80 and 28 colonies after (2 and 5) minutes of exposure with a killing percentage of 45% and 81% respectively, *E.hormaechei* isolates also recorded decreasing in the number of its colonies from 109 before exposure to 62 and 25 colonies, with a killing percentage reaching 43% and 77% respectively after (2 and 5) of exposure, as well as the number of *Shigella spp* colonies decreased from 180 before exposure to 134 and 97 colonies with a killing percentage of 26% and 64% after (2 and 5) exposure respectively, in addition, *M.morganii* isolates witnessed decreasing in the number of its developing colonies after exposure to the laser beam from 233 colonies before exposure to 148 and 120 colonies after (2 and 5) minutes of exposure with percentage of killing reaching 37% and 48% respectively.

Keywords: Diode laser, *Morganella morganii*, *Shigella spp.*, and *Entereobacter* species.