Effect of Antibiotics with Laser Radiation on Growth of Two Pathogenic Bacteria Species

Dr.Saria D. Mohamed
Applied Sciences Department, University of Technology /Baghdad
Dr.Nehia N. Hussi
Applied Sciences Department, University of Technology /Baghdad
Buthynia abd-alhamza
Applied Sciences Department, University of Technology /Baghdad
Email:Saria_algawi @ Yahoo.com

Received on: 5/6 /2011 & Accepted on: 2/2/2012

ABSTRACT

The effect of laser on growth of 2 Type from Bacteria G ─ ve (Escherichia coli) and G+ve (Staphylococcus aureus) was studied, by radiated the samples in a different periods (5,10) min. S. aureus was more effected from E.coli , also the sensitivity to Antibiotics was studied befor and after radiated to laser diode power(5mw) and some different s was observed to the sensitivity of antibiotics from this bacteria .

تأثير المضادات الحيوية مع أشعة الليزر في نمو نوعين من البكتريا المرضية

الخلاصة

درس تأثير أشعة الليزر ثنائي الوصله (5mw) في نمو نوعين من البكتريا المرضية السالبة لصبغة كرام وهي البكتريا المعوية *E.coli* والموجبة لصبغة كرام وهي بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus* حيث تم تعريض العزلات البكتيرية الى أشعة الليزر لفترات زمنية مختلفة تضمنت (10,5) دقيقة ، وجد بأن بكتريا المكورات العنقودية هي الأكثر تأثراً بأشعة الليزر من البكتريا المعوية ، كما تضمن البحث أيضاً دراسة صفة الحساسية للمضادات الحيوية المستخدمة قبل وبعد التشعيع وقد ظهرت بعض الأختلافات في هذه الصفة .

المقدمة

منذ أكتشاف الليزر في عام 1960 وحتى يومنا هذا ظل الليزر يشغل حيزاً واسعاً في جميع ميادين العلوم التكنولوجيا. وقد فاقت تطبيقاته حدود التصور فقد أستعمل كملقط بصريoptical trap في تدوير الخلايا وأحداث شق في أحد جوانب جدار الخلية وكذلك أحداث تثبيط في جينات الخلية الحية غير المرغوب فيها (Neuman and chad , 1999) أن لاشعة الليزر القابلية على قتل السبورات (spores) البكتيرية والتي هي أكثر مقاومة من الخلايا الخضرية بأكثر من 40 مره (vladimir ,2001) كما ويمكن لأشعة الليزر القدرة على تسريع علاج التهاب جروح الحروق سبب الجراثيم التي لها مقاومة عالية ضد المضادات الحيوية كما هو الحال في أستعمال ليزر ثنائي أوكسيد الكربون وتقنية التحسس الضوئي (شفيق ، 1996). تمتاز أشعة الليزر بصفة البايولوجية

https://doi.org/10.30684/etj.30.7.13
2412-0758/University of Technology-Iraq, Baghdad, Iraq
This is an open access article under the CC BY 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by/4.0

الضوئية وهي دراسة تفاعل الأشعة الكهرومغناطسية غير المؤينة مع الخلايا البايولوجية وأستجابتها البايولوجية وتنحصر هذه الفعالية بين الأطوال الموجبة 200-800 ملم .وتقسم هذه التأثيرات عادة على تأثيرات مباشرة (أنية الحدوث) (Short time) حيث يظهر التأثر لثوان أو دقائق قليلة بعد التشعيع وأخرى غير مباشرة (متأخرة الحدوث Long time)وهنا يظهر التأثير بعد ساعات وربما أيام بعد نهاية التشعيع (محي الدين ، 2006) أجريت الكثير من الدراسات حول تأثير أنواع مختلفة من الليزرات على نمو الخلايا البكتيرية وخصوصاً بكتريا *E.coli* مثل ليزر نيديوم –ياك ذي قدرة (100 واط) وطاقة نبضة قدرها (10 جول) (Ward &Watson, 2000) وكذلك أستخدام ليزري الهيليوم – نيون والنتروجين بطاقة نبضة ليزر النتروجين (.5 1 ملي جول) وتكرار نبضات من (1-50) نبضة / الثانية (بن عمر ،2000) كما أستخدم ليزري النتروجين وثاني أوكسيد الكاربون في قتل وتطفير عزلات محلية من البكتريا المرضية ,قد تعددت أستعمالات الليزر في هذا المجال فقد أستخدم ليزر الاكسايمرفي بسترة الحليب باردآمن قبل (Waynex& Manuel, 2002) وأيضاً في بستره المشروبات الكحولية باستعمال الاشعة تحت الحمراء القريبة المنبعثة من ليزر ثنائي الوصلة من قبل (Vladimir, 2003) كما أستخدم الليزر في تعقيم جذور قنوات الأسنان (Silvara,2004) . تعتمد كافة التطبيقات الحياتية والطبية للليزر على طبيعة ونوع تفاعله مع المادة الحية لانه عند سقوط شعاع ليزري على نظام حيوي معين (جزيئات حيوية وخلايا ونسيج) يعاني من عدة حالات بصرية كالانعكاس Reflection والأستطارة scattering والنفوذية Transmission والامتصاص Absorption وهذا يعزى لبعض الخصائص الفيزياوية للمادة الحية ونوع الليزر.

تعد علاجات ليزرات القدرة الواطئة نوعاً من التظمين الضوئي (Photo-modulation) و الذي يستخدم لتغير الفعاليات الحيوية للخلايا والانسجة (Oron*etal*;2006) .تكون التأثيرات (كيميائية -حرارية) وليست حرارية فقط ،ولذلك لا يمكن أن تسبب ضرراً للأنسجة الحية على المستويات الخلوية. للحصول على أفضل نتائج عند المعالجة يجب الاخذ بنظر الاعتبار اختيار الطول الموجي الصحيح وكثافة القدرة التي لابد أن تكون مناسبة للتطبيق . الفوتونات الناتجة عن أشعة الليزر بإمكانها أن تحفز شفاء الجروح الحادة والمزمنة التي يكون شفاؤها بطيئا إذا كان السطح المعرض لليزر المرئي خشناً (Aimbire and Albertini ، 2006).

يتميز ضوء الليزر بكونه متشاكهاً وأحادي الطول الموجي ، وبالتالي يؤدي إلى التغير في التوزيعات الالكترونية للخلية الأصل .على الرغم من امتصاص الفوتونات يكون مفتاح ميكانيكية التظمين الحيوي الضوئي (Photo-bio-modulation) عادة يمكن أن تعبر الفوتونات خلال الخلية بدون أن يبدأ الامتصاص وتبقى التغيرات أولية.تختلف المواد في امتصاصية الضوء مع اختلاف الطول الموجي، على سبيل المثال، الخلايا المتاذية في البشرة تكون أكثر حساسية مقارنة مع الخلايا الطبيعية . تمتص الخلايا الهدف أشعة الليزر لمرة واحدة لتبدأ سلسلة أحداث من التفاعلات (الكيميائية -الحيوية) التي تعمل على شفاء الجروح(Abraham *etal*;2006) .

تعد بكتريا *E.coli* من المسببات الرئيسية لأمراض الجهاز الهضمي (gastro intestinal) في الأنسان والحيوان على حد سواء تصاب الحيوانات أولآ بهذه البكتريا ثم تنتقل الى الانسان من خلال الأغذية غير المبستره ، اللحوم غير المطبوخة وعن طريق الماء الملوث ، وطرق المعالجة لهذه البكتريا تعتبر غير فعاله بسبب مقاومتها للمضادات الحياتية (Hui., 2007) .

تمتازبكتريا *S.aureus* بمقاومتها للجفاف والحرارة وبقابلتها على النمو بوجود تراكيز عالية نسبياً من ملح الطعام (7.5 – 10) % وأن مثل هذا التركيز يكفي لتثبيط نمو أنواع

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

أخرى عديدة من البكتريا . كما ان لها القابلية على تخمير بعض السكريات مثل اللاكتوز الفركتوز والسكروز والمالتوز وغيرها في ظروف لا هوائية وهي غير مكونه للأبواغ . تكون هذه البكتريا واسعة الانتشار في الطبيعة وهناك حوالي بليونين شخص يحملون بعض السلالات ، كما أن هناك 53 مليون شخص يحملون سلالات الـــ MRSA Methcillin resistance strain في تجويف الأنف (Moellering , 2006) .

هدف الدراسة

دراسة تاثير الليزر على الية عمل بعض المضادات الحيوية المستخدمة ضد البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام ،من حيث هوتاثيرتازري ام تثبيطي لعمل المضاد الحيوي لاسيما مع وجود الاختلاف في تركيب الجدار الخلوي للبكتريا قيد الدراسة .

طرق العمل

1- العزلات البكتيرية :- تم الحصول على العزلات البكتيرية المشخصة من دائرة المختبرات التعليمة / مدينة الطب – بغداد نشطت العزلات البكتيرية بأستخدام وسط القلب والدماغ السائل وذلك بتلقيح قنان صغيرة تحتوي على الوسط المذكور بالعزلات البكتيرية المشخصة على وسط غراء الدم وحضنت بدرجة 37 م^0 مدة 24 ساعة ثم حضنت في الثلاجة لحين الأستخدام .

2- عمل فحص حساسية البكتريا للمضادات الحيوية قبل التشعيع بالليزرثنائي الوصلة:- تم عمل فحص الحساسية للمضادات الحياتية قبل تعريض العزلات البكتيرية الى أشعة الليزر بأتباع طريقة . Kirby-Bauer Disk method (Atlas *etal.*, 1995) وكالأتي:-

زرعت العزلات على وسط غراء الدم المغذي وحضنت تحت ظروف هوائية بدرجة 37 م مدة 24 ساعة ،لقح المحلول المحلي الفسيولوجي بعدد من المستعمرات البكتيرية النقية وتمت مقارنة الانبوب بأنبوبة مكفر لاند رقم (0.5) ، نشرت خلايا العالق البكتيري بواسطة مسحة قطنية على وسط مولر هنتون الصلب.

تركت الأطباق لتجف بدرجة حرارة المختبر ثم وضعت أقراص المضادات الحيوية المستخدمة (الجدول 1) على سطح الوسط الزرعي الصلب بالنسبة للعزلات البكترية المستخدمة قيد الدراسة . حضنت الأطباق هوائياً بدرجة حرارة 37 م^o مدة 24 ساعة ، سجلت النتائج بقياس منطقة التثبيط حول الأقراص ،وقورنت االنتائج مع جداول قياسية خاصة لهذا الغرض .

3- فحص حساسية البكتريا للمضادات الحيوية بعد التشعيع بالليزرثنائي الوصلة :-

تم عمل فحص الحساسية للمضادات الحيوية المذكورة في (جدول رقم 1) كما في الخطوة(2)ولكن بعد عملية التشعيع بالليزر قيد الدراسة وكالاتي:-

تم تهيئة جهاز الليزر ثنائي الوصلة عمودياً وذلك ليسقط الشعاع مباشرة على العينة وكما موضح في (الشكل 1) يحتوي جهاز الليزر على عدسات تعمل على تكبير بقعة الليزر . شععت العينات بالليزر ولفترتين زمنية مختلفة (5 ,10) دقيقة .

تم نشر 0.1 مل من محلول الملح الفسيولوجي الملقح بالبكتريا قيد الدراسة على الوسط الصلب .حضنت الأطباق بدرجة 37 م ومدة 24 ساعة ،قراءة النتائج والمناقشة .

النتائج والمناقشة :-

- المحور الأول :- تضمن زراعة البكتريا قيد الدراسة على الوسط الزرعي الصلب المعد لهذا الغرض قبل التعريض الى أشعة الليزر ومن ثم أجراء التشعيع بليزر ثنائي الوصلة (5mw) ولفترات زمنية مختلفة تضمنت (5 ,10) دقيقة ثم زرع البكتريا بعد عملية التشعيع ، وقد لوحظ بأن البكتريا الموجبة لصبغة كرام وهي بكتريا المكورات العنقودية

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

S.aureus كانت الأكثر تأثراً من البكتريا المعوية *E.coli* على الرغم من أمتلاك الأولى لجدار خلوي سميك بالمقارنه مع البكتريا المعوية *E.coli* وقد أتفقت هذه النتيجة مع ما وجده (Gad *etal.*2004) ، وقد يعزى سبب ذلك الى امتلاك البكتريا السالبة لصبغة كرام صفة المقاومة الداخلية المتمثلة بالطبقة الخارجية outer layer, والتي يدخل في تركيبها عديد السكرايدالشحمي LPS الذي تفتقر اليه البكتريا الموجبة لصبغة كرام (Gillbert and brown,1995)اذ وجد بان هذه الطبقة تعمل كحاجز نفاذية Permeability barrier يحد من دخول العديد من الموادالكيميائية من ضمنها المواد المضادة للميكروبات في حين ان الجدارالخلوي للبكتريا الموجبة لصبغة كرام يتكون من البتيدوكلايكان وحامض التيكويك (Paulsen etal.,1997) وهذه المكونات لاتمنع دخول المواد المضادة للميكروبات الى داخل الخلية البكتيرية .

- المحور الثاني :- تضمن أجراء فحص الحساسية قبل وبعد التشعيع بليزر ثنائي الوصلة (5mw) لدراسة التداخل الحاصل بينهما في نمو البكتريا قيد الدراسة وكالآتي :-

أجراء فحص الحساسية للمضاد الحياتي قبل التشعيع بليزر ثنائي الوصله (5mw)

بعد فترة الحضن بدرجة 37 م^{o} لوحظ بأن البكتريا المعوية *E. coli* قد أظهرت أعلى حساسية للمضاد الحيوي (G) وبمنطقة تثبيط بلغت (32 ملمتر) ، يلية المضاد الحياتي **(Ce)** بقطر منطقة تثبيط بلغ (30ملمتر)، ولم تظهر البكتريا أي حساسية تذكرللمضادات الحيوية (TMP,NA,A)كما موضح في الأشكال (2,3).أما بكتريا المكورات العنقودية *S. aureus* فقد أظهرت أعلى حساسية للمضادات (AMC,TMP) بقطر منطقة تثبيط بلغ (32 ملمتر) ، تليها المضادات الحيوية (VA,G,Ce) بأقطار مناطق تثبيط بلغت (30 ، 29، 21 على التوالي) الاشكال (4 ، 5) .

أجراء فحص الحساسية للمضادات الحياتية بعد التشعيع بليزر ثنائي الوصله (5mw)

وهنا تم تعريض البكتريا قيد الدراسة الى أشعة الليزر ولفترات زمنية مختلفة تضمنت (10, 5) دقيقة ثم زراعة البكتريا على الوسط الزراعي الصلب وعمل فحص الحساسية للمضادات الحيويةلغرض المقارنة بين الحالتين قبل وبعد التشعيع من خلال ملاحظة تأثير أشعة الليزرعلى صفة الحساسية للمضادات الحيوية وأستجابة البكتريا لها بالنسبة الى البكتريا المعوية *E.coli* نجد أنه عند التعريض لمدة 5 دقائق أظهرت البكتريا حساسية تجاه المضاد الحياتي (G) بقطر منطقة تثبيط بلغ (30 ملمتر) بعد أن كانت (32 ملمتر) قبل التعريض لأشعة الليزر والمضاد الحيوي (Ce) بقطر منطقة تثبيط بلغ (29ملمتر)كما موضح في (الشكل 6) وعند زيادة مدة التعريض الى (10 دقيقة) بقيت النتائج كما هي ولم تظهر أختلافات تذكر كما موضح في الشكل (7) ، ويوضح ذلك الرسم البياني في الشكل (8). اما بالنسبة الى بكتريا المكورات العنقودية *S.aureus* فقد سجلت ملاحظات حول صفة الحساسية والمقاومة للمضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة ،ففي فترة (5 دقائق) ، لوحظ زيادة في حساسية هذه البكتريا حيث أعطت أعلى منطقة تثبيط للمضادالحيوي (G) بلغت (41 ملمتر)في حين أنها كانت تبلغ (29 ملمتر) قبل التعريض لأشعة الليزر ، يليه في ذلك المضادالحيوي (AMC) بقطر منطقة تثبيط بلغ (39 ملمتر) في حين أنها كانت تبلغ (32 ملمتر) قبل التعريض ثم المضاد الحياتي (TMP) بقطر منطقة تثبيط بلغ (33 ملمتر) وهنا لم يختلف عن الحاله الاولى (قبل التعريض). أما بالنسبة للمضاد الحيوي (Ce) فقد بلغ قطر منطقة التثبيط (17 ملمتر) بعد أن كان يبلغ (30 ملمتر) قبل التعريض الشكل (9) . ينتمي المضاد الحيوي الجنتامايسين الى مجموعةالامينوكلايكوسايد وهي مضادات تمتلك فعالية واسعة المدى حيث تؤثر في البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام ويأتي فعلها هذا الى اتحادها كليا مع الوحدات

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

الفرعية للرايبوسومات والتي تلعب دورا مهما في عملية تخليق البروتينات في الخلايا الحية وتعد عملية تخليق البروتينات في الخلايا البكتيرية هدفا حيويا اخر للعديد من المضادات الحيوية التي تقوم بقتل البكتريا او تثبيط نموها عن طريق عرقلة اي مفصل من مفاصل هذه العملية او منعه ،ولان الية القتل بالليزر ثنائي الوصلة هو قتل حراري بالدرجة الاولى حيث تسبب الشدة العالية لليزر اكسدة ضوئية Photo-oxidant بوجود الاوكسجين منتجة بذلك جذور نشطة كالاوكسجين الاحادي والذي يسبب تحطم الجدران والاغلال بنفاذية ومهاجمة الانزيمات وتلف البروتينات وDNA الخلية . (قندلا،1991) ادى ذلك الى الزيادة في منطقة التثبيط للمضاد الحيوي الجنتامايسين بعد عملية التشعيع بالليزر المذكور بالمقارنة مع تاثيره على البكتريا قبل عملية التشعيع. وفي حالة زيادة فترة التعريض الى (10 دقائق) لوحظ عدم وجود نمو للبكتريا على الوسط الزرعي الصلب والمعد لهذا الغرض (الشكل 10)وكماموضح في الشكل البياني (11) ، وقد تعزى الزيادة في الحساسية الى حصول تغيير في انظمة الضخ الدفقي mix systems المسؤولة بصورة رئيسية عن المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية في البكتريا او الى حدوث تبدل في ال O-antigen والتي هي احدى مكونات ال LPS.اما بالنسبة الى المضاد الحياتي (AMC) فقد تعزى زيادة الحساسية تجاهه الى حدوث تثبيط غير رجعي لفعالية الدنا البلازميدي لتحطمه وفقدانه مما ادى الى عدم انتاج انزيمات البيتا لاكتميز المشفر لها بلازميديا. ان لاشعة الليزر تاثير مباشر على البكتريا وذلك من خلال تناقص الاعداد البكتيرية بزيادة فترةالتعريض.فضلا عن ان لكل نوع من انواع الليزرات المتعددة طريقة خاصة في عملية القتل الميكروبي .

المصادر العربية

[1] الرجب ،وفاء جاسم و القزاز ، حسن محمد علي ، علم الأحياء المجهرية . الجزء الاول مطبعة جامعة الموصل الطبعة الأولى ص 203 – 177 – 1982 .

[2] سهام عفيف قندلا. (1991) فيزياء الليزر في الطب . كلية النهرين الطبية 3 – 98) . (21 – 34) .

[3] شفيق – ابتسام تأثير أشعاع ليزر النتروجين على العين : رسالة ماجستير – قسم العلوم التطبيقية – الجامعة التكنولوجية . ص 81 – 83 ،5 – 3 .

[4] محي الدين. زينب حمزة باقي (2006) . دراسة أستعمال الليزر في طب الامراض الجلدية (تقرحات الجلد – تايل – الوشم – الوهم) . رسالة ماجستير . كلية العلوم - الجامعة المستنصرية . ص 36 – 39 .

المصادر الأجنبية

[1]Atlas, R. M., Brown,A.E. and paks,t.s. (1995) Laboratory Manual Experimental Microbiology(1st ed) Mosby.yer Book . Inc.Louis Baltimore.

[2]Gad,F;Zahra, T;Hasan , T;and Hamblin, MR.(2004). Effect of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram – positive pathogenic bacteria,Microb. Agents Chemotherapy 48 : 2173 – 2178 .

[3] Gillbert,P and Brown,M.R.W.(1995).some perspectives on preservation and disinftion in the present day .Int.biodeterior.biodegrard.36:219-226.

[4]Hui,T.U. (2007) . Journal of Proteome research, 6,3628-36.

[5]KasperD.L.,Braunwald, E.,Fauci A.S.,Hauser,*S.T.*,Longo ,D.L.,Jameson,J.L.,Isselbacher,K.J,editors.(2005).Harrison's Principles of inter.

[6]Kirby, W.M. and Bauer, A.M.(1966) Antibiotic Susceptibility testing by a standardized single disc methode J. Clini.Pathol. 45: 493- 496.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

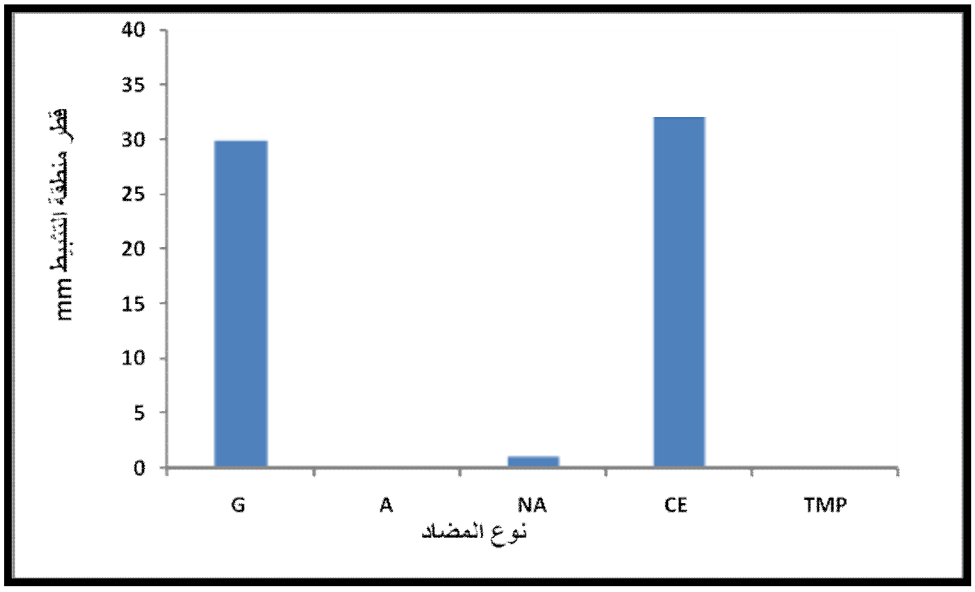
[7]Moellering R.C.(2006).The growing menace of community–acquired methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* .Ann Intern Med 2006;144=368 – 370.
[8]Neuman,K.C.and chadd, , E.H.g(1991) Characterization of Photodamage to *Escherichia coli* in optical traps" biophysical journal Vol: 77, November , pp: 2856- 2863
[9]Paulsen,I.T.;Park,J.H.;Choi,P.S.;and Saier,M.H.(1997).A family of gram membrane factors that function in the export of proteins,carbohydrats,drugs and heavy metals from gram –ve bacteria .FEMSmicroial.Lett,156:1-8.
[10]Vladimir V.,(2001) "the pasteurization effect of Laser infrared irradiation on beer " Department of Environmental Biology , university of Guelph,Guelph , Ontario, Canada, vol: 38,no:4:pp:211-214.

جدول(1)يوضح المضادات الحيوية المستخدمة

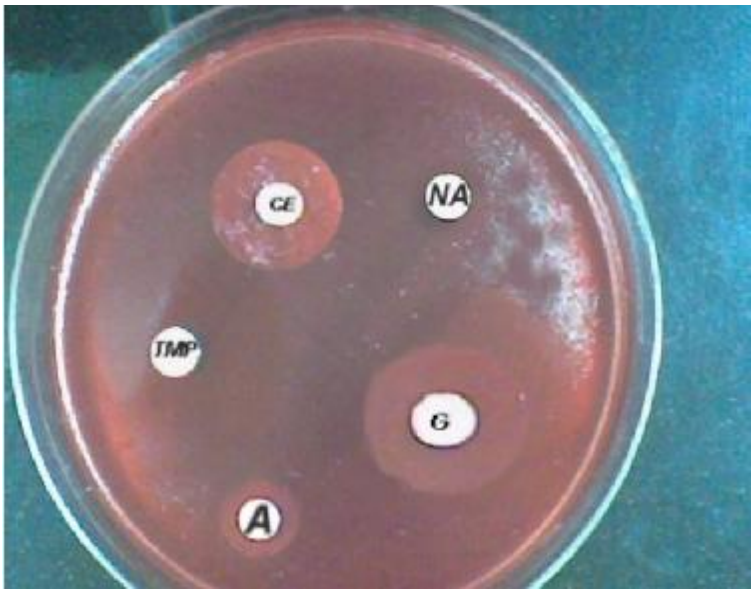
E.coli	*S.aureus*	العزلات البكتيرية
Gentamycin(G) Vancomycin(VA)	Gentamycin (G) Nalidixicacid(NA)	
Amikaycin(AMC)	Ampicillin(A)	**المضادات الحيوية**
Cephotaxime (Ce)	Cephotaxime (Ce)	
Trimethoprim(TMP)	Trimethopri (TMP)	

الشكل (1) المنظومة الليزرية المستخدمة

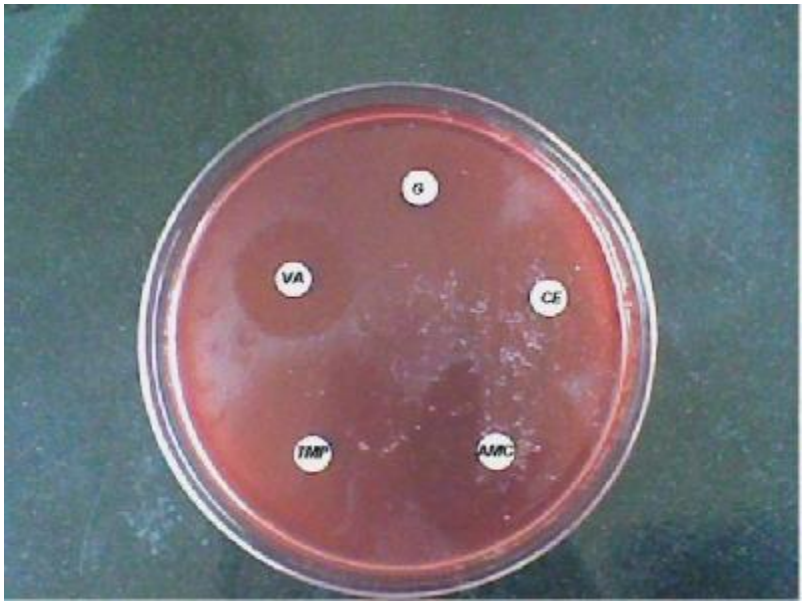
PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



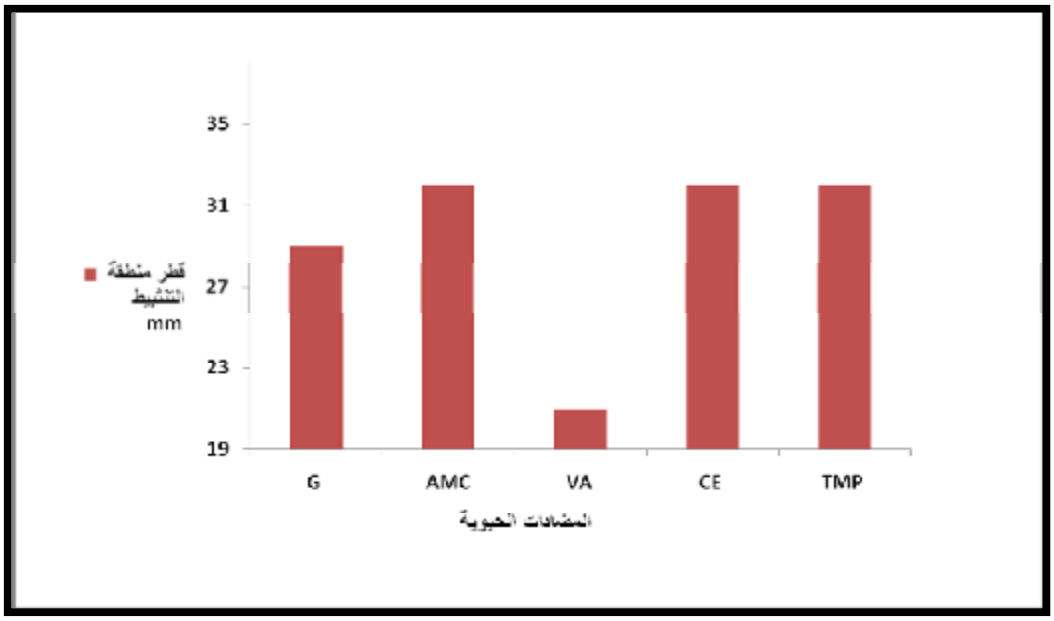
الشكل (3) رسم بياني يوضح تأثير المضادات الحيوية في نمو البكتريا المعوية *E.coli*.
بدون استعمال الليزر



PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

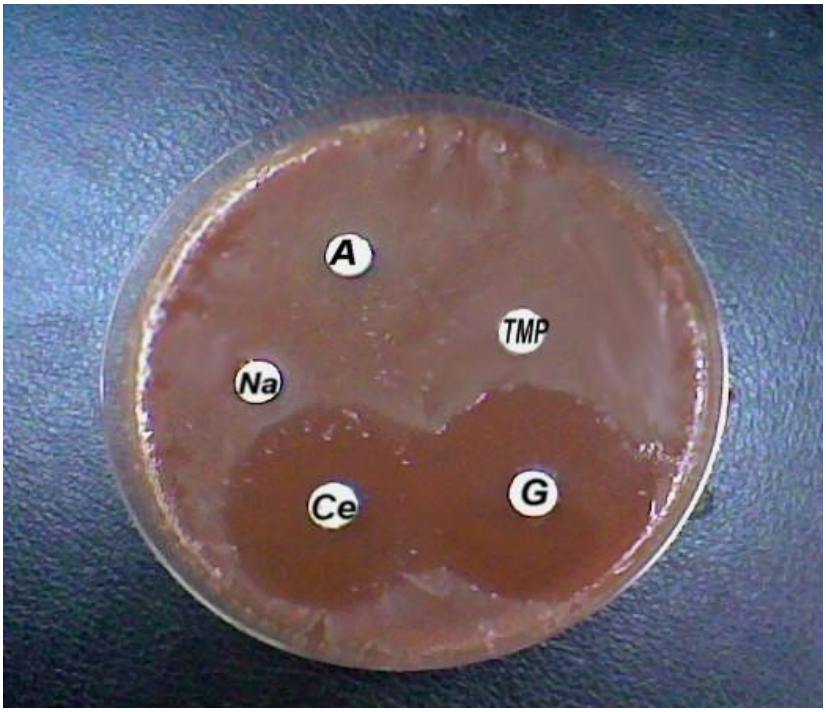


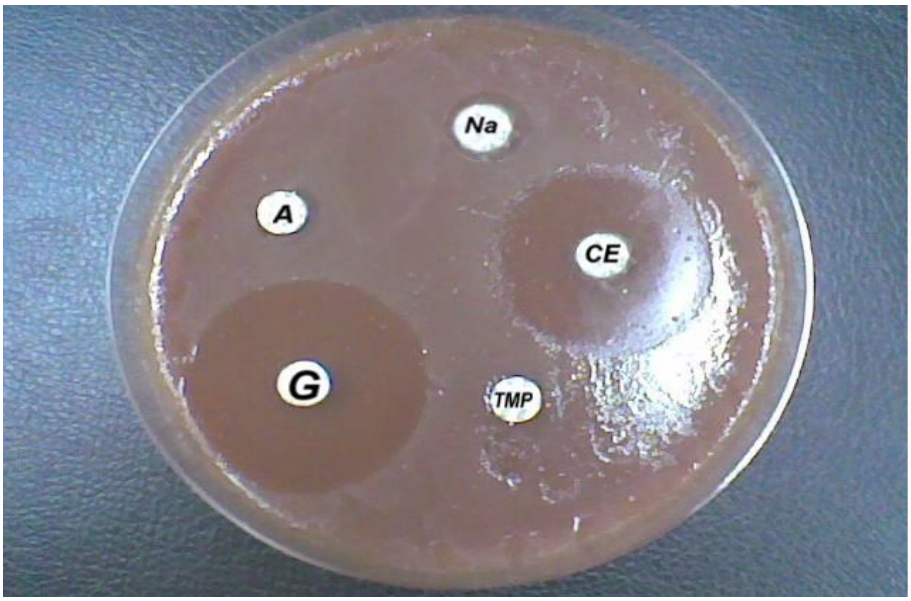
الشكل (4) تأثير المضادات الحيوية في نمو بكتريا الجروح *Staphylococcus aureus* بدون استعمال الليزر



الشكل (5) رسم بياني يوضح تأثير المضادات الحيوية في نمو بكتريا الجروح *Staphylococcus aureus* بدون استعمال الليزر

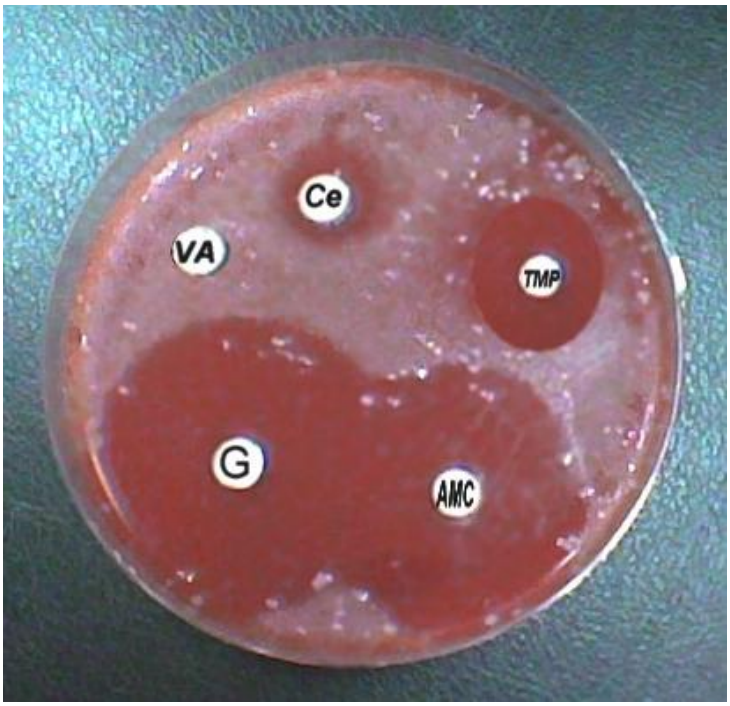
PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



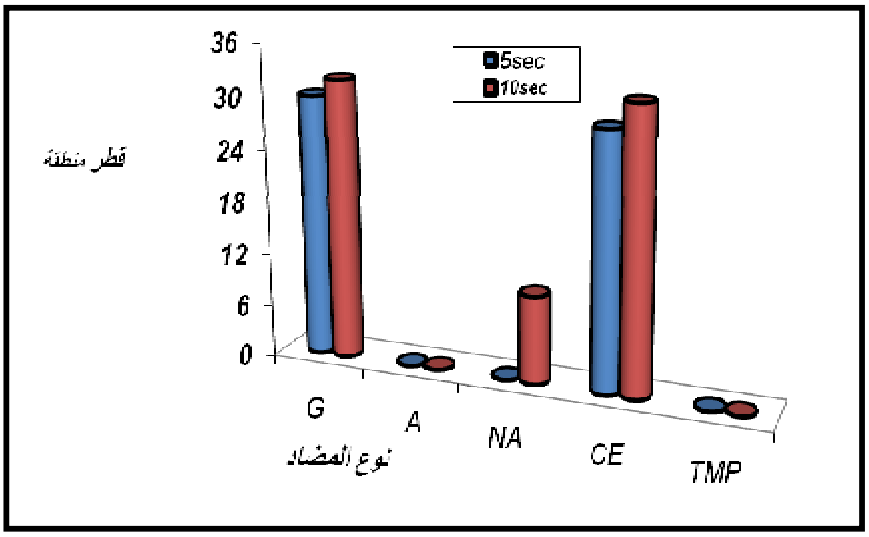


الشكل (6) تأثير المضادات الحيوية في نمو البكتريا المعوية *E.coli* بعد فترة تعريض لليزر ولمدة 5 دقائق

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

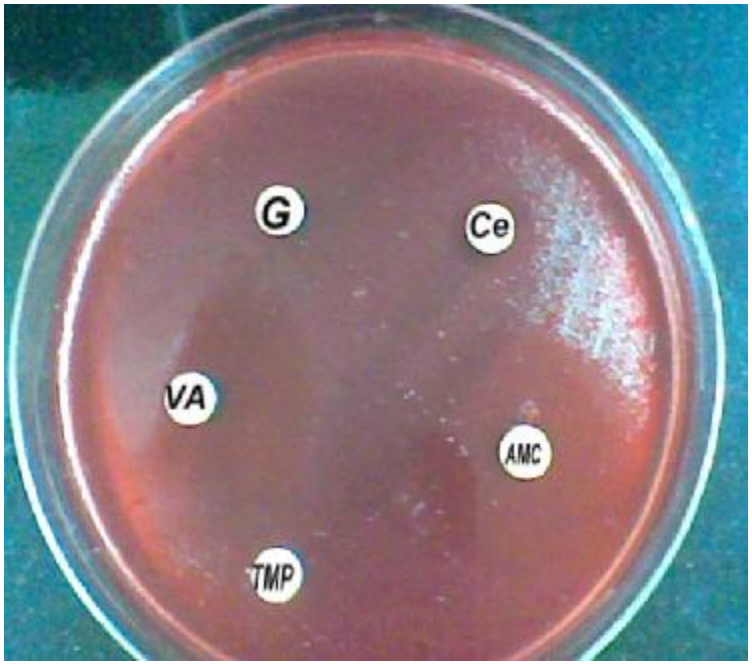


الشكل (7) تأثير المضادات الحيوية في نمو البكتريا المعوية *E.coli* بعد فترة تعريض لليزر ولمدة 10 دقائق

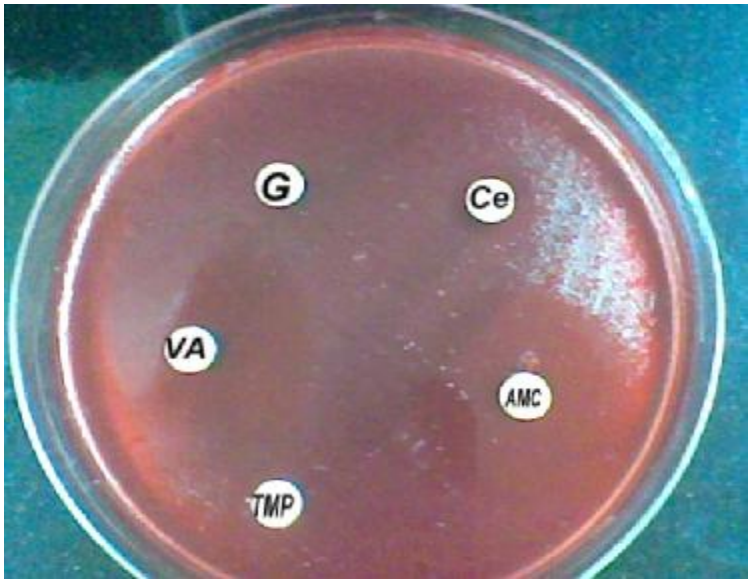


الشكل (8) رسم بياني يوضح تأثير المضادات الحيوية في نمو البكتريا المعوية *E.coli* بعد فترة تعريض لليزر ولمدة 10 دقائق

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



الشكل (9) تأثير المضادات الحيوية في نمو بكتريا الجروح *Staphylococcus aureus* بعد فترة تعريض لليزر ولمدة 5 دقائق



الشكل (10) تأثير المضادات الحيوية في نمو بكتريا الجروح *Staphylococcus aureus* بعد فترة تعريض لليزر ولمدة 10 دقائق

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com