

بررسی اثر موج لیزر کم توان 808 nm بر زنده‌مانی و رشد باکتری *E.coli* - DH5α

سهیلا تکاور¹، مجید صادقی زاده*²، حشمت‌الله رحیمیان³، غلامرضا اسماعیلی جاوید⁴، محسن فاتح⁵

- 1- دانشجوی دکتری گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 2- استاد گروه ژنتیک و نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 3- استاد گروه بیماری‌شناسی گیاهی، باکتریولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
- 4- استادیار مرکز تحقیقات کاربرد لیزر در علوم پزشکی، جهاددانشگاهی علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- 5- مربی مرکز تحقیقات کاربرد لیزر در علوم پزشکی، جهاددانشگاهی علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: 1399/8/17

تاریخ دریافت: 1399/4/18

*نویسنده مسئول: sadeghma@modares.ac.ir

چکیده:

کاربرد لیزر NIR در باکتری‌ها اغلب بر خاصیت‌کشندگی و تشدیدکنندگی اثر آنتی‌بیوتیک‌ها متمرکز است. در این باره طیفی از درجات کشندگی و حتی نفوذ آن گزارش شده است. هدف از این پژوهش بررسی اثر موج لیزر کم توان 808 nm بر زنده‌مانی و رشد باکتری *E.coli*-DH5α با سه روش شمارش کلنی‌ها (CFU)، MTT و فلوسایتومتری است. به این منظور باکتری در محیط کشت مایع LB تحت تیمار لیزر 100J/cm² و 200 قرار داده و روند رشد و زنده‌مانی نسبت به کنترل بررسی و مقایسه شد. نتایج CFU پس از 24 ساعت به لحاظ آماری بین کنترل و تیمارهای لیزر معنادار نشد (P=0/06)، ولی نتایج MTT یک ساعت پس از اعمال لیزر نشان داد، کشندگی باکتری‌ها میان تیمار لیزر 200J/cm² و کنترل معنادار است (P=0/006). نتایج فلوسایتومتری بلافاصله پس از تیمار لیزر با به‌کارگیری PI و Triton X100 نشان داد، لیزر هم اثر کشندگی دارد و هم نتایج MTT را تأیید و همچنین تغییر در نفوذپذیری غشا باکتری‌ها تا کشندگی را با افزایش دوز لیزر ثابت می‌کند. به این ترتیب روش‌های به‌کاربرده شده، نشان دادند دوزهای مختلف لیزر اثر مهاري با شدت متفاوت بر زنده‌مانی و رشد باکتری *E.coli*-DH5α دارد. بنابراین، تیمار لیزر می‌تواند کاربردهایی با هدف باکتری‌زدایی یا تسهیل در روند انتقال ژن داشته باشد.

کلید واژگان: لیزر کم توان 808 nm، باکتری *E.coli*-DH5α، زنده‌مانی، رشد، CFU، MTT و فلوسایتومتری.

مقدمه

تشکیل شده⁸ (CFU) با کنترل گزارش کردند [11]. Beer و همکاران در سال 2012 اثر لیزر 810 nm با توان 4/5W و تواتر 0/1 ms و طول پالس 0/05 ms، 5 بار پرتوتابی 5 ثانیه‌ای با فاصله 20 ثانیه را بر *E. coli* انکوبه‌شده پس از کشت شبانه در حدود 98/8 درصد کشندگی گزارش کردند [8]. Da Fonseca و همکاران در 2019 در بررسی اثر لیزر کم‌توان NIR (AsGaAl) با طول موج 808 nm با شدت 100J/cm² و توان 100 mW طی پرتوتابی پیوسته و 10Hz و 100 بر سوسپانسیون نرمال سالیین سویه‌هایی از باکتری *E. coli* را از طریق بررسی و مقایسه CFU، کشنده گزارش کردند [12].

همچنین، Wendy و همکاران در سال 2014 طی بررسی اثرات لیزر کم‌توان 904 nm در محدوده NIR با شدت 5000 Lux بر رشد در پتری دیش سه باکتری متداول در زخم *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* طی پرتودهی در فاصله 6 اینچی به مدت 15 دقیقه، به نتیجه معناداری نرسیدند و نتایج ایشان اثر باکتری‌کشی لیزر کم‌توان را تأیید نکرد [13]. Pirnat و همکاران در سال 2011 اثر لیزر 808 پالسی با تواتر 20 Hz در توان 1/5 W را بر *E. coli* بی‌معنا گزارش کردند [7]. Andraus و همکاران در سال 2015 اثر لیزر 808 را با توان 60، 30 mW و 100 طی زمان‌های پرتودهی 135، 67 و 40 بر چندین باکتری گرم مثبت و منفی از جمله *E. coli* پس از 24 ساعت خنثی گزارش کردند [14].

Karu و همکاران نیز در سال 1994 در بررسی اثر لیزر NIR بر *E. coli* با شدت پرتوتابی 50J/m² به مدت 100 ثانیه، پس از 60 دقیقه، آن را افزایش بر رشد باکتری اعلام کردند [15]. Nussbaum و همکاران در سال 2002 با انتشار

ماهیت لیزر Laser¹ که ناشی از تواتر تابش یک فوتون به یک ذره (یون، اتم یا مولکول)، القا و برانگیختگی آن ذره و پیامد آن رهایش فوتونی هم‌فرکانس با فوتون تابیده است، منشا خصوصیات امواج لیزر چون تکرنگی² (یک طول موج مشخص)، واگرایی کم³ (عدم پراکندگی)، هم‌دوسی⁴ (هم‌فازی امواج) و شدت بالا⁵ (تمرکز در یک مقطع کوچک) است که در تعامل با سلول‌ها زمینه بروز انواع برهمکنش‌های فتودینامیک، فتوشیمیایی و فتوترمیک را فراهم می‌آورد که در حوزه‌های پزشکی، محیط زیست و کشاورزی کاربردهای فزاینده‌ای دارد [1-3]. در این راستا کاربرد لیزر NIR⁶ در باکتری‌ها، بیشتر بر خاصیت کشندگی و تشدیدکنندگی آنتی‌بیوتیک‌ها تمرکز یافته است؛ به‌صورتی که لیزرهای کم‌توان⁷ در محدوده NIR در اثر کشندگی بر باکتری‌ها کاربرد پذیرفته‌شده‌ای دارند. این مسئله به دستورالعمل‌های کلینیکی منجر شده است [4-7]. این درحالی‌ست که از طیف وسیع اثر لیزر NIR بر باکتری‌های مختلف از جمله باکتری *E. coli* در شرایط *invitro* (در کشندگی، خنثی و حتی تشدیدکننده) طی چندین سال گزارش‌های متنوع و متناقض منتشر شده است [7-10].

Schoop و همکاران در سال 2004 اثر کشنده لیزر دیودی 810nm را در محدوده NIR بر سوسپانسیون باکتری *E. coli* انکوبه‌شده به مدت 4 ساعت طی اعمال توان 1/5W و تواتر 120Hz به صورت 5 بار پرتوتابی 5 ثانیه‌ای با فواصل 15 ثانیه، در بررسی و مقایسه شمارش کلنی‌های

1. Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation
2. Monochromatic
3. Low divergence
4. Coherency
5. High intensity
6. Near InfraRed
7. low-intensity laser therapy (LILT)

8. Colony Forming Units

استفاده و باکتری *E.coli*-DH5 α از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهیه شد.

آماده‌سازی باکتری

یک کلنی از باکتری *E.coli*-DH5 α در 5 ml محیط LB در دمای 37 درجه سانتی‌گراد با 200 rpm کشت شبانه شد. پس از آن 100 μ l از کشت شبانه به 10 ml محیط تازه LB اضافه و در همان شرایط تا رسیدن به OD600 = 0/6 نگهداری شد. سپس 501 μ l از باکتری به میکروتیوپ‌های 1/5 جهت تیمار انتقال داده شد.

تیمار لیزر

نمونه‌های باکتری‌ها در حجم 501 μ l در فاصله 5 سانتی‌متری از منبع لیزر با دوز انرژی 100J/cm² و 200 تحت تیمار لیزر NIR با طول موج 808 nm لیزر (MDL-III-808 nm) از کمپانی Changchun New Industries Optoelectronics Tech قرار گرفتند. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد.

تعیین تغییر دمایی

تغییر دمای نمونه باکتری‌ها پس از تیمار با لیزر به‌منظور تعیین مکانیسم اثرات احتمالی لیزر بر آنها، با استفاده از پروب ترموکوپل ترمومتر دیجیتال Marmonix اندازه‌گیری شد.

شمارش تعداد کلنی CFU

به‌منظور تعیین اثر لیزر 808nm در رشد کلنی باکتری‌ها و اثرات سمیت احتمالی طی 24 ساعت، به هر میکروتیوپ پس از تیمار با لیزر تا رسیدن به حجم 450 μ l محیط LB اضافه شد. نمونه‌ها به انکوباتور با شرایط 37 درجه با rpm 200 برای مدت 3 ساعت و پس از آن 501 μ l از رقت 10⁻³

نتایج بررسی اثرات لیزر کم‌توان NIR در طول موج‌های 905nm و 810 استفاده‌شده در تراپی با دوز 1-50J/cm² بر کشت invitro باکتری *E.coli*، اثر لیزر 810 nm در محدوده 20-1J/cm² را افزایشده بر رشد باکتری گزارش کردند [17, 16, 10] (p=0/01-0/04).

این طیف وسیع از تنوع در نتایج گزارش‌های بررسی اثرات امواج NIR بر رشد باکتری‌ها، بر اهمیت لزوم بررسی برحسب شرایط دقیق لیزر، سویه باکتریایی و نیز شرایط پژوهش به‌منظور طراحی پروژه‌هایی در راستای تعامل لیزر با نانوذرات با اهدافی چون انتقال هدفمند، فتوزنتیکی و ترانوستیکی می‌افزاید [19, 18].

از این‌رو، در این پژوهش تعیین اثر موج لیزر کم‌توان 808nm در شرایط آزمایشگاهی بر باکتری *E.coli*-DH5 α بررسی شد. همچنین، تست CFU از آزمون زنده‌مانی⁹ (MTT) به‌عنوان تکنیکی سریع و حساس در تعیین زنده‌مانی باکتری‌ها و فلوسایتومتري¹⁰ (FCM) به‌عنوان روشی در تشخیص سریع اثرات آنتی‌بیوتیکی در بررسی‌های زیست‌سنجی باکتری‌ها استفاده شد [24-20].

مواد و روش

مواد شامل محیط (10 g tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl) Luria-Bertani (PBS¹¹)، بافر فسفات (DMSO¹²)، متیل سولفوکسید (MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)، دترژنت دیونیزه تریتون X100 (t-Triton X100) و octylphenoxypolyethoxyethanol) و ماده فلورسنت (Propidium Iodide)PI از شرکت سیگما آلدریج تهیه شد. در تمام مراحل پژوهش، از آب دوبار تقطیر دیونیزه

9. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide Assay

10. Flow Cytometry Method Assay

Triton X100+ لیزر $200\text{J}/\text{cm}^2$ ، اضافه و پس از 20 دقیقه نمونه‌ها با دستگاه فلوسایتومتری BD FACSCanto II آنالیز شدند. داده‌های فلوسایتومتری تیمارهای لیزر و کنترل با استفاده از نرم‌افزار 1-4-2-FlowingSoftware کنترل و تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج

اثر حرارتی لیزر بر باکتری‌ها

تغییرات دمایی طی اعمال لیزر به‌منظور تعیین شرایط پژوهش بررسی شد. نتایج بررسی قبل و بعد از تیمار لیزر نشان داد، تغییرات ناچیز دمایی به‌وجودآمده در رشد باکتری‌ها تأثیری ایجاد نمی‌کند.

اثر لیزر بر شمارش تعداد کلنی CFU

بررسی اثر لیزر بر زنده‌مانی باکتری‌ها (سمیت) طی 24 ساعت از طریق شمارش تعداد کلنی‌های تیمار شده با لیزر با دوز $100\text{J}/\text{cm}^2$ و $200\text{J}/\text{cm}^2$ بررسی شد. این بررسی به‌عنوان روشی کلاسیک در بررسی اثر لیزر بر باکتری‌ها اهمیت دارد. همان‌گونه که از نمودار تصویر 1 مشخص است، نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون T نشان می‌دهد، تفاوت معناداری میان کنترل و تیمارهای لیزر ایجاد نشده است ($P=0/06$). با این حال، تیمار لیزر $100\text{J}/\text{cm}^2$ سبب افزایش رشد تعداد کلنی باکتری‌ها و تیمار $200\text{J}/\text{cm}^2$ و کاهش تعداد کلنی‌ها بعد از رشد شبانه شد.

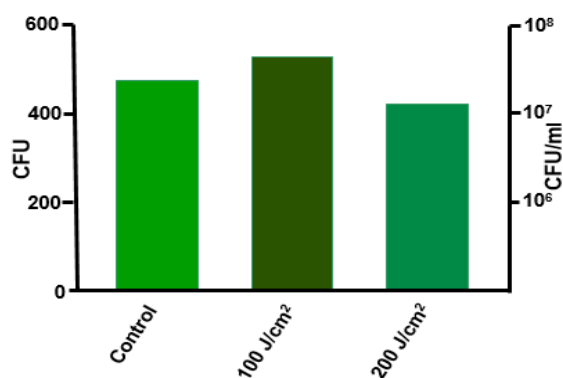
آنها در LB مایع به محیط LB جامد در همان شرایط انکوباتور 37 درجه برای 21 ساعت منتقل شد. کلنی‌های رشد کرده بر محیط پس از این مدت شمارش و داده‌ها با آزمون آماری T در نرم‌افزار 8 GraphPad Prism تجزیه و تحلیل شد.

آزمون MTT

برای تعیین اثر کوتاه‌مدت اعمال لیزر بر زنده‌مانی باکتری‌ها، به $100\mu\text{l}$ از نمونه باکتری‌ها پس از تیمار لیزر، $10\mu\text{l}$ از محلول MTT با غلظت 5 mg/ml اضافه و به مدت 60 دقیقه انکوبه شد. سپس نمونه‌ها برای 10 دقیقه با 2000 rpm سانتریفیوژ، رسوب در $100\mu\text{l}$ محلول DMSO حل و 15 دقیقه انکوبه شد. نمونه‌ها با 570 nm در طول موج microplate reader (biotek) خوانش [20, 22] و داده‌های حاصل از سه تکرار لیزر و کنترل آزمون MTT از طریق آزمون T در نرم‌افزار 8 GraphPad Prism تجزیه و تحلیل آماری شد.

فلوسایتومتری

اثر تیمار لیزر بر مقاومت دیواره غشای باکتری به تنش نسبت به کنترل با استفاده از فلوسایتومتری بررسی شد. به این ترتیب که $50\mu\text{g/ml}$ رنگ فلورسنت پروپیدیوم یدید (PI) در مجاورت Triton X100 با غلظت 0/1 درصد به نمونه‌های باکتری در حجم $100\mu\text{l}$ با تعداد 10^7 طبق گروه‌های 1. باکتری بدون رنگ 2. باکتری همراه با PI + Triton X100 3. باکتری همراه با PI + Triton X100 4. باکتری همراه با PI + Triton X100 لیزر $100\text{J}/\text{cm}^2$ بررسی شد.

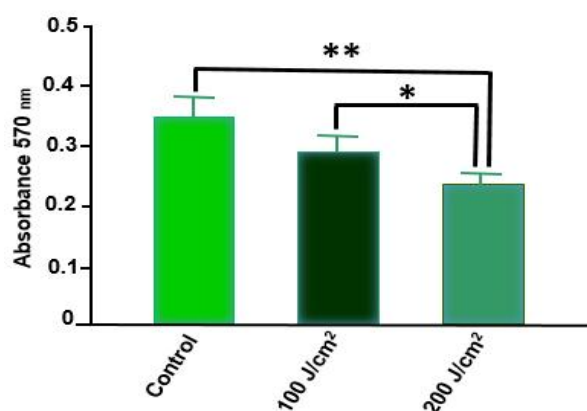


تصویر 1. اثر لیزر 100 و 200 J/cm² بر تعداد کلنی‌های شمارش شده پس از 24 ساعت تفاوت تیمارهای لیزر با کنترل معنی‌دار نشد (P=0/06).

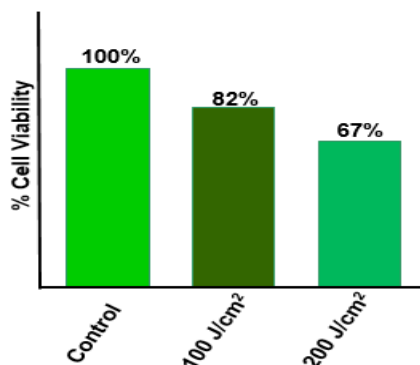
بیشتر است (P=0/04). در صورتی که میان تیمار 100J/cm² و کنترل تفاوت کشندگی معناداری ایجاد نشد (P=0/07). این در حالی است که درصد زنده‌مانی تیمار لیزر 200J/cm² برابر با 67% و تیمار لیزر 100J/cm² برابر با 82% شد (تصویر 3). به این ترتیب، اثرات کشندگی تیمار با لیزر 200 J/cm² بیشتر از تیمار 100J/cm² دارد.

اثر لیزر در زنده‌مانی باکتری‌ها با سنجش MTT

اثر لیزر بر بقای سلول‌های باکتریایی در یک ساعت اول پس از تیمار لیزر 100J/cm² و 200 J/cm² در برابر کنترل از طریق سنجش MTT بررسی شد. همان‌گونه که در نمودار تصویر 2 مشخص است، اثر کشندگی لیزر پدید آمد. نتایج تجزیه و تحلیل خوانش داده‌ها نشان داد که تیمار لیزر 200J/cm² نسبت به کنترل اثر کشندگی معناداری دارد (P=0/006). همچنین، اثر کشندگی تیمار لیزر 200J/cm² نسبت به 100 J/cm² به صورت معناداری



تصویر 2: آنالیز داده‌های آزمون MTT، اثر معنی‌دار تیمار لیزر 200J/cm² در مقایسه با کنترل را نشان می‌دهد (P=0/006). میان دو تیمار لیزر 100J/cm² و 200 J/cm² هم تفاوت معنی‌دار است (P=0/04). در حالی که میان تیمار 100J/cm² با کنترل تفاوت معنی‌دار نیست (P=0/07).

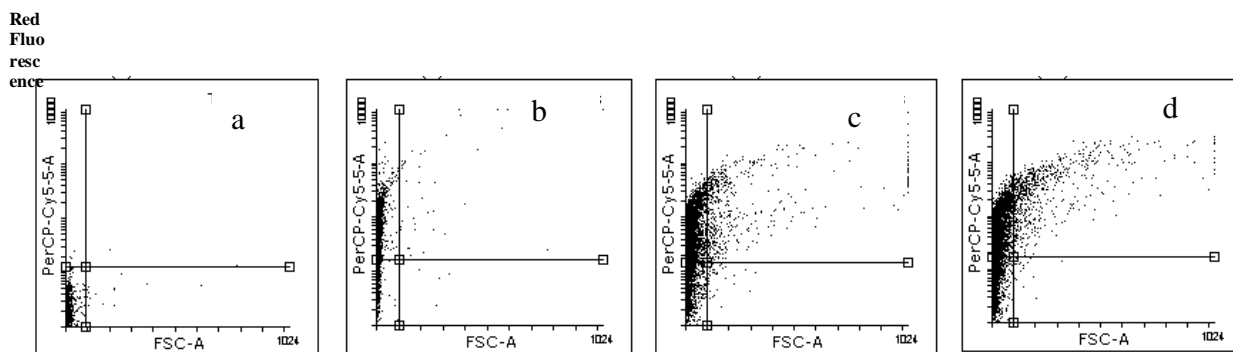


تصویر 3: درصد زنده‌مانی باکتری‌ها با سنجش MTT. اثر کشندگی تیمار لیزر 200J/cm² بیش از 100J/cm² شد.

نتایج فلوسایتومتری

نتایج فلوسایتومتری طبق دات‌پلات‌های خروجی از نرم افزار FlowingSoftware-2-4-1 نشان داد که لیزر 808nm موجب افزایش رنگ‌پذیری PI جمعیت سلولی نمونه‌ها نسبت به کنترل می‌شود. همان‌گونه که در تصویر 4 مشخص است، جمعیت دات بلات سلولی در نمودار a اثر زمینه‌ای جمعیت سلولی و در نمودار b نفوذپذیری غشا سلولی در اثر تیمار با Triton 100X و ورود PI به DNA سلولی را

نشان می‌دهد. در نمودار c دات بلات ایجادشده در اثر تیمار با Triton 100X و PI و لیزر 100J/cm² و در نمودار d دات بلات در اثر تیمار با Triton 100X و PI و لیزر 200J/cm² است. همان‌طور از پروفایل دات بلات‌ها مشخص است، هر دو تیمار لیزر باعث افزایش کشندگی باکتری‌ها نسبت به دو کنترل استفاده‌شده در این تحقیق شده است. همچنین، تیمار لیزر 200J/cm² بیشتر از لیزر 100J/cm² سبب کشندگی باکتری E.coli شده است.



تصویر 4: اثر تیمارهای مختلف لیزر بر باکتری با استفاده از فلوسایتومتری: بررسی رنگ‌پذیری PI در محدوده نشر 700 تا 550 nm با دستگاه فلوسایتومتری نشان می‌دهد، افزایش کشندگی تیمارهای لیزر (c و d) در باکتری E.coli بسیار بیش از دو کنترل (a و b) است.

بحث

براساس نتایج این پژوهش، با توجه به تغییرات ناچیز دما، بروز اثرات کشندگی باکتری‌ها با افزایش دما ایجاد نمی‌شود.

تغییر بحرانی دمای نمونه‌ها در اثر تیمار با لیزر به‌عنوان عامل اصلی کشندگی باکتری‌ها تلقی می‌شود [7, 25]. در این پژوهش اثر لیزر 808nm در دوز 100J/cm² و 200 بر سمیت و رشد کلنی باکتری‌ها از طریق شمارش

آزمون MTT به عنوان شاخصی در تعیین زنده ماندنی و سمیت تیمارهای اعمال شده در کشت های باکتریایی کاربرد دارد [20, 21]. در این پژوهش به کارگیری آزمون MTT در کنار روش کلاسیک شمارش تعداد کلنی تشکیل شده (CFU) موجب دریافت دقیق تری از تعامل تیمارهای لیزر 808 با باکتری شد. نتایج تجزیه و تحلیل آماری از طریق آزمون آماری T در نرم افزار GraphPad Prism 8 نشان داد که اثر کشندگی لیزر در یک ساعت اول بین تیمار $100\text{J}/\text{cm}^2$ و کنترل معنی دار نشد ($P=0/07$)، ولی بین $200\text{J}/\text{cm}^2$ و کنترل به لحاظ آماری معنی داری پدید آمد ($P=0/006$).

در مقایسه نتایج CFU و MTT، اینکه چرا اثر لیزر نسبت به کنترل پس از 24 ساعت با شمارش کلنی معنادار نشد و در یک ساعت اولیه در نتایج آزمون MTT اثر معنادار $200\text{J}/\text{cm}^2$ نسبت به کنترل به دست آمد می توان ناشی از شرایطی دانست که در آن واکنش های ترمیم و جبران سلولی، روند رشد را در 24 ساعت تسریع و آسیب اولیه و اثر کشندگی لیزر را جبران کردند. در واقع، رهایش و جذب فوتون های لیزر کم توان NIR در محیط باکتریایی، منشا انواع تعاملات و برهمکنش های فتودینامیک، فتوشیمیایی و فتوترمیک در سلول های باکتریایی *E.coli* می شود. این تنوع در تعاملات موجب می شود، لیزر NIR در شرایط مختلف کشنده، بی اثر و در مواردی افزایش دهنده رشد باکتری باشد. به این ترتیب، نتایج به شدت تحت تأثیر متغیرهای لیزر (توان، زمان، سطح مقطع، شدت، دوز انرژی، پیوسته یا پالسی بودن لیزر) و البته سویه باکتری و شرایط طراحی پژوهش قرار می گیرد [28, 29]. در این پژوهش از لیزر پیوسته با معیار گزارش دهی دوز انرژی J/cm^2 استفاده شد که به موجب آن پالس، زمان، توان و سطح مقطع به عنوان متغیر مطرح نیستند. این مسئله، می تواند تکرارپذیری آزمایش را افزایش دهد.

کلنی های تشکیل شده در 24 ساعت بر محیط LB جامد به عنوان روش کلاسیک (که در بررسی اثر لیزر بر باکتری ها مورد توجه است) بررسی شد. مقایسه دو تیمار لیزر نشان داد که کلنی های بیشتری در تیمار $100\text{J}/\text{cm}^2$ نسبت به تیمار $200\text{J}/\text{cm}^2$ تشکیل شده است. در حالی که تیمار لیزر در مقایسه با کنترل بی تفاوت بود. این نتایج نشان می دهد، لیزر $100\text{J}/\text{cm}^2$ شاید سبب افزایش سرعت رشد باکتری در بازه زمانی 24 ساعت شده است، اما لیزر $200\text{J}/\text{cm}^2$ سبب سطحی از تخریب غشا و از بین رفتن باکتری ها شده است که طی 24 ساعت ترمیم نشده اند. اثر خنثی آماری لیزر از طریق CFU با نتایج چندین گزارش چون گزارش Andraus و همکاران [14]، Wendy و همکاران [13] و Pirnat و همکاران [7] تطابق دارد. Nussbaum در تحقیقات انجام شده بر لزوم استفاده محتاطانه از لیزر در باکتری زدایی تأکید کرده است [26].

در این پژوهش به منظور بررسی دقیق تر اثر لیزر 808nm دوز $100\text{J}/\text{cm}^2$ و 200 بر باکتری *E.coli*-DH5a از آزمون MTT استفاده شد. آزمون MTT سنجش متابولیکی است که به عنوان روشی سریع و با دقت بالا برای تعیین اثر آنتی بیوتیک ها بر باکتری ها کاربرد گسترده دارد. هر چند مکانیسم دقیق MTT در باکتری ها مشخص نیست و سازوکار جایگزین آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی در باکتری ها تاکنون شناسایی نشده است، گمان می رود NADPH اکسیداز باند شده در سطح غشای سلول باکتریایی در احیای تترازولیوم نقش داشته باشد. به هر صورت مکانیسم عملکردی آزمون MTT استوار بر احیای تترازولیوم به فورمازان ارغوانی کریستالی در سلول های باکتریایی زنده است. به این ترتیب، فرایند زیست سنجی را بر اساس شدت رنگ فورمازان، به عنوان بررسی کمی از واکنش های آنزیمی و به دنبال آن زنده ماندنی می توان پیگیری کرد [20, 27]. در این راستا،

زنده‌مانی به واسطه واکنش‌های ترمیمی در آن‌ها امکان وقوع دارد [32, 42, 41].

نتیجه‌گیری نهایی

در این پژوهش با توجه به اثرات متناقض گزارش‌شده لیزر NIR بر زنده‌مانی باکتری‌ها، از سه روش شمارش کلنی‌ها، MTT و فلوسایتومتري بعد از تیمار باکتری *E. coli*-DH5 α با لیزر 808 در دوزهای 100J/cm² و 200J/cm² برای تأیید دقیق اثرات لیزر استفاده شد. نتایج نشان داد که لیزر 200J/cm² در هر سه روش کشندگی بیشتری نسبت به 100J/cm² دارد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود لیزر 200J/cm² در باکتری‌زدایی سریع باکتری *E. coli*-DH5 استفاده شود. درحالی‌که به احتمال زیاد لیزر 100J/cm² و 200J/cm² را می‌توان در روش‌های انتقال ژن به باکتری که به نفوذپذیری غشا و متعاقب آن رشد باکتری در بازه 24 ساعت نیاز دارد، استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس که از این تحقیق پشتیبانی کرده‌اند، تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

- Coluzzi, D. J., & Parker, S. P. (2017). *Lasers in Dentistry—Current Concepts*: Springer.400p
- Schneckenburger, H., Hendinger, A., Sailer, R., Strauss, W. S., Lyttek, M., & Schmitt, M. (2002). Laser-assisted optoporation of single cells. *Journal of biomedical optics*, 7(3), 410-417.
- Topaloglu, N., Gulsoy, M., & Yuksel, S. (2013). Antimicrobial photodynamic therapy of resistant bacterial strains by indocyanine green and 809-nm diode laser. *Photomedicine and laser surgery*, 31(4), 155-162.
- Canuto, K., Sergio, L., Marciano, R., Guimarães, O., Polignano, G., Geller, M., . . . Fonseca, A. (2013). DNA repair in bacterial cultures and plasmid DNA

همچنین، در این پژوهش از فلوسایتومتري که به‌عنوان روشی دقیق و سریع تشخیص اثرات آنتی‌بیوتیک‌ها بر باکتری‌ها کاربردی روزافزون دارد و از PI به‌عنوان رنگ نفوذکننده در DNA بعد از تخریب دیواره سلول باکتری با جذب 485 nm و نشر 636 nm کاربرد دارد، استفاده شد [30-32]. در این تحقیق از Triton X100 با غلظت 0/1 درصد بلافاصله پس از لیزر 100J/cm² و 200 استفاده شد. Triton X100 یک دترجنت غیریونی است که موجب می‌شود نفوذپذیری غشا افزایش یابد [33-36] و در مکانیسم آن در باکتری‌ها ایجاد حلالیت پروتئین‌های دیواره پپتیدوگلیکانی غشای سلول باکتریایی است [37]. Triton X100 در مقایسه با عوامل مشابه چون SDS و SDS، برای سلول‌ها اثری ایمن‌تر دارد. همچنین، به‌عنوان عاملی سازگار با باکتری در غلظت کم و زمان به‌کارگیری کوتاه، در تسهیل شرایط ترشحي باکتری کاربرد دارد [38-40]. نتایج فلوسایتومتري نشان داد از آنجاکه تعداد باکتری‌های استفاده‌شده برای آزمون فلوسایتومتري در هر نمونه برابر و معادل 10⁷ بود، لیزر با شدت 200J/cm² نسبت به 100J/cm² بر کشندگی باکتری‌ها تأثیری بیشتری دارد. همان‌طورکه در تصویر 4 مشخص است، دات پلات d که خروجی لیزر 200J/cm² از نرم‌افزار FlowingSoftware-2-4-1 است، نسبت به c که خروجی لیزر 100J/cm² است، اثرات تخریبی بیشتری در غشا باکتری ایجاد کرده است. این مسئله سبب شده است، رنگ PI بیشتری در باکتری‌های تیمار 200J/cm² نفوذ کند. دات پلات‌ها در امتداد محور Y باکتری‌های کشته‌شده را نشان می‌دهد. درحالی‌که دات پلات‌های موجود در میانه نمودار که با افزایش دوز لیزر بر تراکم آنها افزوده شده (نمودار d نسبت به c تصویر 4)، می‌تواند به باکتری‌هایی مربوط باشد که با وجود رنگ‌پذیری PI نمرده‌اند، بلکه آسیب دیده‌اند و پیامد

- Prado, R. P. (2015). Analysis of low level laser therapy in vitro cultures of bacteria and fungi. *Manual Therapy, Posturology & Rehabilitation Journal*, 13, 6p. doi: 10.17784/mtprehabjournal.2015.13.304
15. Karu, T., Tiphlova, O., Esenaliev, R., & Letokhov, V. (1994). Two different mechanisms of low-intensity laser photobiological effects on *Escherichia coli*. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology*, 24(3), 155-161.
16. Nussbaum, E. L., Lilge, L., & Mazzulli, T. (2002). Effects of 630-, 660-, 810-, and 905-nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1-50 J/cm² on three species of bacteria in vitro. *Journal of clinical laser medicine & surgery*, 20(6), 325-333.
17. Nussbaum, E.L., L. Lilge, and T. Mazzulli, (2002). Effects of 630-nm laser irradiation on in vitro growth of bacteria: comparison of continuous wave and frequency modulated light. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, 31(5): p. 351-353
18. Chakravarty, P., Qian, W., El-Sayed, M. A., & Prausnitz, M. R. (2010). Delivery of molecules into cells using carbon nanoparticles activated by femtosecond laser pulses. *Nature nanotechnology*, 5(8), 607-611.
19. Rahimzadeh, M., Sadeghizadeh, M., Najafi, F., Arab, S., & Mobasheri, H. (2016). Impact of heat shock step on bacterial transformation efficiency. *Molecular Biology Research Communications*, 5(4), 257.
20. Grela, E., Kozłowska, J., & Grabowiecka, A. (2018). Current methodology of MTT assay in bacteria—A review. *Acta histochemica*, 120(4), 303-311.
21. Feng, J., Wang, T., Zhang, S., Shi, W., & Zhang, Y. (2014). An optimized SYBR Green I/PI assay for rapid viability assessment and antibiotic susceptibility testing for *Borrelia burgdorferi*. *PloS one*, 9(11), e111809. 8p. doi: 10.1371/journal.pone.0111809.
22. Wang, H., Cheng, H., Wang, F., Wei, D., & Wang, X. (2010). An improved 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells. *Journal of microbiological methods*, 82(3), 330-333.
23. Lloyd, D. (1993). *Flow cytometry in microbiology*: Springer. London. 200p.
- exposed to infrared laser for treatment of pain. *Laser Physics Letters*, 10(6), 065606. 8pp
5. da Silva Sergio, L. P., da Silva Marciano, R., Teixeira, G. R., da Silva Canuto, K., Polignano, G. A. C., Guimarães, O. R., . . . da Fonseca, A. d. S. (2013). Therapeutic low-intensity red laser for herpes labialis on plasmid survival and bacterial transformation. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 12(5), 930-935.
6. Gursoy, H., Ozcakir-Tomruk, C., Tanalp, J., & Yılmaz, S. (2013). Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clinical oral investigations*, 17(4), 1113-1125.
7. Pirnat, S., Lukac, M., & Ihan, A. (2011). Study of the direct bactericidal effect of Nd: YAG and diode laser parameters used in endodontics on pigmented and nonpigmented bacteria. *Lasers in medical science*, 26(6), 755-761.
8. Beer, F., Buchmair, A., Wernisch, J., Georgopoulos, A., & Moritz, A. (2012). Comparison of two diode lasers on bactericidity in root canals—an in vitro study. *Lasers in medical science*, 27(2), 361-364.
9. Carlsson, L. Thesis. Supervisors: Otfilia Biksi, DVM & Dávid Sándor Kiss, PhD (2017). Impact of laser therapy on the healing processes. The University of Veterinary Medicine Department of Physiology and Biochemistry. Budapest, Hungary. 44p
10. Nussbaum, E. L., Baxter, G. D., & Lilge, L. (2003). A review of laser technology and light-tissue interactions as a background to therapeutic applications of low intensity lasers and other light sources. *Physical therapy reviews*, 8(1), 31-44.
11. Schoop, U., Kluger, W., Moritz, A., Nedjelik, N., Georgopoulos, A., & Sperr, W. (2004). Bactericidal effect of different laser systems in the deep layers of dentin. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, 35(2), 111-116.
12. da Fonseca Iwahara, L. K., de Paoli, F., & da Fonseca, A. d. S. (2019). Low-Power Red and Infrared Laser Effects on Cells Deficient in DNA Repair. *Journal of lasers in medical sciences*, 10(3), 157-162.
13. Wendy, C., Jerrold, S. P., Michael, L., Jason, L., Park, J., Judy, L., & Lee, H.-N. (2014). The effects of low level laser radiation on bacterial growth. *Physical Therapy Rehabilitation Science*, 3(1), 20-26.
14. Andraus, R. A. C., Maia, L. P., Santos, J. P. M. d., Mesquita, A. R., Santos, T. G., Braoios, A., &

35. Riccardi, C., & Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols*, 1(3), 1458-1461.
36. Rosenberg, M., Azevedo, N. F., & Ivask, A. (2019). Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.
37. Schnaitman, C. A. (1971). Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. *Journal of bacteriology*, 108(1), 545-552.
38. Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A., & Simons, K. (2003). Resistance of cell membranes to different detergents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(10), 5795-5800.
39. Weiner, J. H., MacIsaac, D. P., Bishop, R. E., & Bilous, P. T. (1988). Purification and properties of *Escherichia coli* dimethyl sulfoxide reductase, an iron-sulfur molybdoenzyme with broad substrate specificity. *Journal of bacteriology*, 170(4), 1505-1510.
40. Yeagle, P. L. (2016). *The membranes of cells*: Academic Press. 452p.
41. Rosenberg, M., Azevedo, N. F., & Ivask, A. (2019). Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.
42. Grégori, G., Citterio, S., Ghiani, A., Labra, M., Sgorbati, S., Brown, S., & Denis, M. (2001). Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in freshwater and marine waters based on analytical flow cytometry and nucleic acid double staining. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4662-4670.
24. Robinson, J. P. (2018). Overview of Flow Cytometry and Microbiology. *Current protocols in cytometry*, 84(1), e37.
25. Hibst, R., Graser, R., Udart, M., & Stock, K. (2010). Mechanism of high-power NIR laser bacteria inactivation. *Journal of biophotonics*, 3(5-6), 296-303.
26. Nussbaum, E. (2017, August). Comparing the effects on bacterial growth of continuous and pulsed 810 nm laser irradiation over a wide range of radiant exposure. In *Opto-Canada: SPIE Regional Meeting on Optoelectronics, Photonics, and Imaging* (Vol. 10313, p. 103133A). International Society for Optics and Photonics.
27. Zhang, J., & Liu, X. (2002). Study on tetrazolium salt colorimetric assay for growth and survival of bacteria. *Wei sheng yan jiu. Journal of hygiene research*, 31(5), 361-363.
28. Hamblin, M. R., & Demidova, T. N. (2006). Mechanisms of low level light therapy. Paper presented at the Mechanisms for low-light therapy. 12p. doi: 10.1117/12.646294.
29. Percival, S. L., Francolini, I., & Donelli, G. (2015). Low-level laser therapy as an antimicrobial and antibiofilm technology and its relevance to wound healing. *Future microbiology*, 10(2), 255-272.
30. Kirchoff, C., & Cypionka, H. (2017). Propidium ion enters viable cells with high membrane potential during live-dead staining. *Journal of microbiological methods*, 142, 79-82.
31. Feng, J., Yee, R., Zhang, S., Tian, L., Shi, W., Zhang, W.-H., & Zhang, Y. (2018). A rapid growth-independent antibiotic resistance detection test by SYBR green/propidium iodide viability assay. *Frontiers in medicine*, 5, 127. 11p.
32. Grégori, G., Denis, M., Sgorbati, S., & Citterio, S. (2018). Resolution of Viable and Membrane-Compromised Free Bacteria in Aquatic Environments by Flow Cytometry. *Current protocols in cytometry*, 85(1), e42. 9p.
33. Arumuganathan, K., & Earle, E. (1991). Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant molecular biology reporter*, 9(3), 229-241.
34. Pozarowski, P., & Darzynkiewicz, Z. (2004). Analysis of cell cycle by flow cytometry. In *Checkpoint controls and cancer. Methods in Molecular Biology*, vol 281, 301-311,

Assessment of Low Level Laser (808 nm) Effects on *E.coli*-DH5 α Viability and Growth

Soheila Takavar¹, Majid Sadeghizadeh^{2*}, Heshmatollah Rahimian³, Gholamreza Esmaeeli javid⁴, Mohsen Fateh⁴

1. PhD Candidate, Nanobiotechnology Department, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Professor, Genetics and Nanobiotechnology Departments, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Professor, Plant Pathology- Bacteriology Department, Sari Agricultural Sciences & Natural Resources University, Sari, Iran
4. Assistant Professor, Medical Laser Research Center, Iranian Academic Center for Education, Culture & Research, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran
5. Instructor, Medical Laser Research Center, Iranian Academic Center for Education, Culture & Research, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran

Received: 2020/7/10

Accepted: 2020/11/7

*Corresponding author :sadeghma@modares.ac.ir

NIR Laser application in bacteria is often focused on the killing and reinforcing properties of antibiotics. The literature records on this point are absolutely diverse from mortality in different degrees to immortality and even viability enhancement. The aim of this study is to investigate 808 nm laser effects on *E.coli*-DH5 α viability and Growth with CFU, MTT and FCM assays. To obtain the purpose, bacteria in LB media put on with 808nm laser on 100 and 200 J/cm² dosages and were investigated and compared by CFU, MTT and FCM assay. CFU assay results after 24 hours incubation were not significant different between laser treatments and control. (P=0.06). Contrastly, MTT assay results after 1 hours from laser treatment indicated significant deleterious effects in 200 J/cm² laser treatment compared to the control(P=0.006). On the other hand, FCM assay results of laser treatments with using of PI and Triton X100 not only approved MTT assay results but also ratified dosage-dependent changes on bacteria from membrane permeability effects to mortality. As a conclusion of the results in these method assays, we can state that these different laser doses produce diverse effects on viability and growth in *E.coli*-DH5 α . Consequently the laser treatments could be planned for antibiotic purposes or enhancing gene transformation process.

Key words: low level laser (808 nm), *E.coli*-DH5 α , Viability, Growth, CFU assay. MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay and FCM(Flow Cytometry Method Assay).