

Uticaj lasera ($\lambda = 632.8$ nm) na inicijalne ćelije bakterijskih sojeva *Escherichia coli* SY252 i *Bacillus thuringiensis*

Ispitivan je uticaj niskoenergetskog lasera na rast inicijalnih ćelija bakterija. U istraživanju su korišćeni sojevi *Escherichia coli* SY252 (Gram negativne) i *Bacillus thuringiensis* (Gram pozitivne). Bakterije oba soja su bile podeljene u 4 grupe, u one koje su zračene u vremenskim intervalima od 5, 15 i 30 s, i kontrola koja nije bila zračena. Korišćen je Uniphase He-Ne (gasni) laser talasne dužine 632.8 nm i maksimalne izlazne snage 10 mW. Konstatovano je da laser ima inhibitorno dejstvo na rast bakterija datog soja *E. coli*. Rezultati za soj *B. thuringiensis* su pokazali da duže lasersko zračenje neznatno smanjuje brojnost bakterija, dok je kratkotrajno delovanje pokazalo inhibitorno dejstvo.

Uvod

Za razliku od svetlosti koju emituju uobičajeni izvori, kao što su sijalice, laserska svetlost je uglavnom monohromatska, tj. samo jedne talasne dužine (boje) i usmerena je u uskom snopu (Raspopović 2008).

Bakterije mogu biti izazivači mnogobrojnih oboljenja i infekcija i oduvek su predstavljale jedan od problema u medicinskoj, stomatološkoj i veterinarskoj praksi. Kao takve, one su jedna od najzanimljivijih tema za istraživanje u mikrobiologiji. Lasersko zračenje ima različit uticaj na bakterijske ćelije što zavisi od talasne dužine i energije. Nussbaum, Liege i Mazuli su u svom istraživanju (Nussbaum *et al.* 2002) dokazali da zračenje niskoenergetskog lasera

ima inhibitoran uticaj na rast bakterija. Talasna dužina od 630 nm je u tom istraživanju ispoljila najjače inhibitorno dejstvo. Dejstvo i mehanizmi delovanja niskoenergetskog lasera se objašnjavaju fotohemijskim reakcijama. Svetlost apsorbuju određeni reseptorni molekuli, zatim sledi niz bioloških promena u bakterijskoj ćeliji. Lasersko zračenje deluje na ćeliju tako što aktivira oksido-redukciono procese koji smanjuju permeabilnost ćelijske membrane. Poslednja istraživanja pokazuju da je infracrveni (light CO₂) laser pogodan za dekontaminaciju određenih bakterijskih sojeva (Nussbaum *et al.* 2002).

Baktericidno svojstvo monohromatske svetlosti potvrđuje i inhibitoran uticaj „plave svetlosti“ (talasne dužine 405 nm) na rast bakterija. Kratkotrajna stimulacija ovom svetlošću uništava kulture *Staphylococcus aureus*, što govori da fototerapija može biti efektan vid lečenja infekcija koje izaziva ova bakterija (Enwemeka *et al.* 2008).

Cilj ovog istraživanja je da se utvrdi dejstvo laserske svetlosti ($\lambda = 632.8$ nm) na inicijalne ćelije kolonija sojeva *Escherichia coli* i *Bacillus thuringiensis* u svrhe pronalazaženja novih metoda dekontaminacije u mikrobiologiji.

Materijal i metode

Za istraživanje su izabrani sojevi bakterija *Escherichia coli* SY252 i *Bacillus thuringiensis*, a kao izvor svetlosti Uniphase He-Ne laser (model CLØ 1125 class IIIb, $\lambda = 632.8$ nm). Sojevi *E. coli* i *B. thuringiensis* zasejane su u po 4 epruvete sa LB podlogom. Neposredno posle zasejavanja bakterije su izlagane laseru. Vremenski intervali zračenja su bili različiti. U oba soja, prvi uzorak su činile bakterije na koje je delovano laserom u periodu od 5 s, drugi uzorak je zračen 15, a treći 30 s. Kao kontrola

Živojin Jevtić (1991), Lazarevac, Dositeja Obradovića 13, učenik 3. razreda, Gimnazije u Lazarevcu

MENTOR: Jelena Savić, dipl. biolog, XII beogradska gimnazija

korišćen je četvrti uzorak bakterija koji nije zračen. Korišćen je He-Ne laser talasne dužine 632.8 nm i maksimalne izlazne snage 10 mW, međutim proširivač snopa je upotrebljen da bi se povećala aktivna površina zračenja, tako da je na taj način smanjena snaga zračenja po jedinici površine. Posle tretiranja bakterije su ostavljene u termostatu na 37°C da se inkubiraju tokom noći.

Metodom decimalnih razblaženja (Knežević i Simić 2006) određen je broj razvijenih bakterijskih kolonija u sve 4 grupe tako da su rezultati grupa tretiranih laserom bili upoređivani sa kontrolnom grupom.

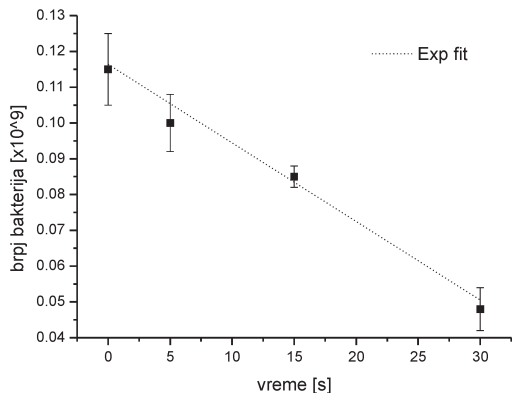
Rezultati i diskusija

Laserska stimulacija inicijalnih ćelija bakterijskih kolonija pokazala je inhibitoran uticaj na rast soja *E. coli* SY 252. Brojnost bakterija bila je najveća u kontrolnoj grupi. Sa povećanjem dužine zračenja od 5 s do 30 s, smanjivala se razvijena brojnost (tabela 1). Sve grupe su imale manju brojnost u odnosu na kontrolu i ta razlika je iznosila od 10%, kod tretmana sa 5 s zračenja, do čak 70% kod tretmana sa 30 s zračenja. Brojnost kultura bakterija eksponencijalno opada sa produženjem vremena dejstva laserom što se jasnije vidi na slici 1.

Tabela 1. Broj razvijenih bakterija *Escherichia coli* SY 252 u grupama

Vreme tretiranja	Srednja vrednost broja bakterija (10^9 mL^{-1})	Udeo u odnosu na kontrolu (%)
Kontrola (0 s)	0.140	100
5 s	0.126	90.4
15 s	0.078	55.3
30 s	0.043	30.7

Efekat lasera je na brojnost bakterijskog soja *B. thuringiensis* bio u maloj meri inhibitoran (od 4 do 11% manja brojnost kultura u odnosu na kontrolu, tabela 2) ukoliko je vreme delovanja bilo duže. Sa kraćim vremenom zračenja efekat je bio relativno smanjenje brojnosti bakterija, ali ne i inhibicija rasta. Brojnost bakterija je rasla sa produženim vremenom delovanja (tabela 2). Kontrolna, netretirana, grupa je i kod soja *B. thuringiensis* imala najveću brojnost, a

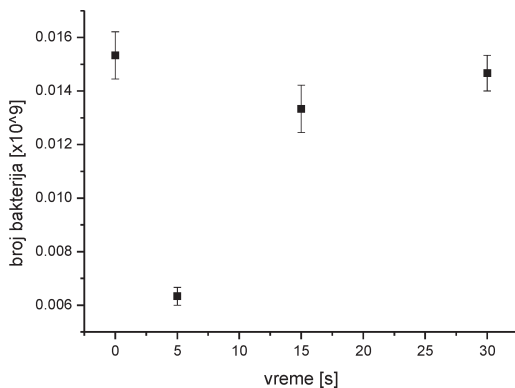


Slika 1. Procenat broja razvijenih bakterija u odnosu na vreme delovanja lasera na inicijalne ćelije kolonija *E. coli*

Figure 1. Percentage of bacteria developed in relation to the time of laser activity on the initial cell colonies of *E. coli* SY 352

sa povećanjem dužine tretmana brojnost bakterija u kulturi ne opada pravilno (slika 2).

Osnovna razlika u mehanizmu delovanja kratkotrajne i dugotrajne laserske radijacije nije u potpunosti razjašnjena i zahteva dalja istraživanja. Neki autori ističu da veće zagrevanje ciljanih bakterija tokom kratkotrajne stimulacije može biti glavni faktor (Nussbaum *et al.* 2002).



Slika 2. Procenat broja razvijenih bakterija u odnosu na vreme delovanja lasera na inicijalne ćelije kolonija *B. thuringiensis*

Figure 2. Percentage of bacteria developed in relation to the time of laser activity on the initial cell colonies of *B. thuringiensis*

Različiti odgovor kolonija na lasersko zračenje proizilazi iz različite strukture ćelijske membrane i ćelijskog zida. Ćelijska membrana *Bacillus* je okružena gustim slojem peptidoglikana koji može ili apsorbovati ili rasejati svetlost, i koji je razlog efekta koji laser izaziva kod ovih bakterija.

Tabela 2. Broj razvijenih bakterija *Bacillus thuringiensis*

Vreme tretiranja	Srednja vrednost broja bakterija (10^9 mL^{-1})	Udeo u odnosu na kontrolu (%)
Kontrola (0 s)	0.140	100
5 s	0.006	42.9
15 s	0.012	89.3
30 s	0.014	96.4

Zaključak

Na osnovu sprovedenog istraživanja može se zaključiti da efekat lasera na bakterije zavisi od bakterijskog soja i vremena tretiranja. Laserska radijacija inicijalnih bakterijskih ćelija soja *E. coli* SY 252 utiče inhibitory na njihovu deobu i rast, što znači da značajno umanjuje broj razvijenih bakterijskih kolonija. Kod soja *E. coli* SY 252 (Gram negativne), lasersko zračenje u periodu od 30 s pokazalo je inhibitory dejstvo, gde razlika u broju razvijenih kultura u odnosu na kontrolu iznosi do 70%. U skladu sa ovim, može se zaključiti da bi se laser mogao koristiti kao sredstvo za dekontaminaciju ukoliko bi vreme delovanja bilo produženo.

Dugotrajna laserska radijacija inicijalnih bakterijskih ćelija soja *B. thuringiensis* (Gram pozitivne) smanjuje brojnost bakterija, ali nema inhibitory uticaj, dok kratkotrajno lasersko zračenje deluje inhibitory na ove bakterije. Najmanju brojnost bakterija kod soja *B. thuringiensis* je imao uzorak čije su inicijalne ćelije prethodno izlagane laseru u periodu od 5 s (43% manja brojnost od kontrolne grupe). Zaključuje se da kratkotrajna laserska radijacija utiče negativno na deobu ovih bakterija, i da bi njeno ponavljanje u kratkom vremenskom periodu moglo biti u potpunosti baktericidno.

Literatura

- Demidova T. N., Hamblin M. R. 2005. Photodynamic inactivation of *Bacillus* spores mediated by phenothiazinium dyes. *Applied and Environmental Biology*, **7**: 6918.
- Deppe H., Horch H. H., Schrödl V., Haczek C., Miethke T. 2007. Effect of 308-nm excimer laser light on peri-implantitis-associated bacteria: an in vitro investigation. *Lasers in Medical Science*, **22** (4): 223.
- Dobrowolski J. W., Wachalewski T., Smyk B., Rózycki E., Barabas W. 1997. Experiments on the influence of laser light on some biological elements of the natural environment. *Environmental Management and Health*, **8** (4): 136.
- Enwemeka C. S., Williams D., Hollosi S., Yens D., and Enwemeka S. K. 2008. Visible 405 nm SLD light photo-destroys methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vitro. *Lasers Surgery and Medicine*, **40**: 734.
- Knežević J., Simić D. 2006. *Metode u mikrobiologiji*. Beograd: Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu
- Maver-Bišćanin M., Mravak-Stipetić M., Jeroklinov V., Klaić B., Žarković D., Bišćanin A. 2007. Rekolonizacija gljivica *Candida albicans* u pacijenata s protetskim stomatitisom nakon terapija niskoenergetskim laserom. *Acta Stomatol Croatica*, **41** (3): 225.
- 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/cm^2 on three species of bacteria in vitro. *Lasers in Surgery and Medicine*, **20** (6): 325.
- Raspopović M. O. 2008. *Fizika za treći razred gimnazije prirodno-matematičkog smera*. Beograd: Zavod za izdavanje udžbenika i nastavna sredstva
- Raspopović M. O. 2008. *Fizika za četvrti razred gimnazije prirodno-matematičkog smera*. Beograd: Zavod za izdavanje udžbenika i nastavna sredstva

Živojin Jevtić

Effect of 632.8 nm Laser Light on Initial Cells of *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis*

The effect of low-energy laser light on initial bacterial cells was surveyed. The study used strains of *Escherichia coli* SY 252 (Gram negative) and *Bacillus thuringiensis* (Gram positive). Bacteria of both strains were divided into 4 groups: three that were treated for 5, 15 and 30 s, and one control group that was not treated. We used a Uniphase He-Ne gas laser (wavelength 632.8 nm and maximum output power of 10 mW). It was found that the laser light has an inhibitory effect on growth of the bacterial strain *E. coli*. Results for the *B. thuringiensis* strain showed a negative, but not an inhibitory influence of long-term laser radiation on the incubation of bacteria, while the short-term treatment showed an inhibitory effect. 