Vol. 3, No. 5 and 6, P. (17-25)A

دراسة تأثير الليزر على بكتريا (Enterococcus) المعزولة من منتجات الألبان

أحمد كاظم خضيري
جامعة بابل – كلية العلوم للبنات – قسم فيزياء الليزر
تاريخ الاستلام: 3 / Aug / 2015
تاريخ قبول النشر: 19 / Jun / 2016

Abstract

In this study, Enterococcus bacteria was isolated from the Iraqi local dairy products then it have been compared with global products from (Saudi Arabia, Jordan, Syria, Iran),An study of absorption spectrum have been achieved to the planted bacteria in the middle nutritious before and after the irradiation by laser, as used several lasers with wavelengths (405, 532, 650)nm and the laser power of irradiation variable (1-20) m Watt and different irradiation times (1-24)min at different doses of radiation. The results showed that the bacteria isolated focused largest amount of Iraqi and Syrian Milk, it turns out that the bacteria isolated positive Gram appeared on the spherical shape under a microscope by (68.8%) of the total isolates, found them almost (79.8%) of the genus (Enterococcus), and have found that higher absorption of isolated bacteria in the extent of wavelengths UV near visible light within the wavelength (235)nm and the absorbance of the bacteria less when irradiation laser، note from the results that the effect of the laser (405)nm his percentage kill of bacteria higher than the laser (532)nm This has the largest of the laser effect (650)nm under the same conditions, the study showed required to get the proportion of killing (100%) of time is (21) min and at least increase the laser power or radiation dose, and increase energy density by increasing the exposure time enough to damage the inside living cell and kill bacteria. The study has shown that lasers can be used as a tool, rather than the traditional pasteurization sterilization that lose Taste the milk and some of its properties.

Keywords

Enterococcus Bacteria, Isolated Bacteria, Irradiation by Laser, Absorption Spectrum, Radiation Dose.

الخلاصة

تم في هذه الدراسة تشخيص وعزل بكتريا من جنس (Enterococcus) من منتجات الالبان المحلية العراقية ومقارنتها بألبان منتجة من مصانع عالمية (سعودية ،اردنية ، سورية وإيرانية) بعد زرع البكتيريا في الوسط المغذي.

دُرس طيف الامتصاص لها قبل وبعد تشعيعها بالليزر ، كما استعملت عدة ليزرات ذات الأطوال الموجية (405,532,650) nm وبقدره أشعاع متغيره mW (1-20) وأزمان تشعيع مختلفة min (1-24) بجرعات إشعاعية مختلفة. بينت النتائج أن البكتيريا المعزولة تركزت بكمية أكبر بالالبان العراقية والسورية، كما تبين أن البكتيريا المعزولة موجبة الغرام ظهرت على شكل كروي تحت المجهر بنسبة (68.8%) من مجموع العزلات الكلية ، وجد منها تقريبا (79.8%) التابعة لجنس (Enterococcus)، وتبين أن أعلى امتصاص للبكتريا المعزولة في مدى الاطوال الموجية فوق البنفسجية القريبة من الضوء المرئي ضمن الطول الموجي nm (235) كما أن الامتصاصية للبكتيريا تقل عند التشعيع بالليزر، نلاحظ من النتائج أن تاثير الليزر nm (405) له نسبة قتل للبكتيريا أعلى من الليزر nm (532) وهذا له تأثير أكبر من الليزر nm (650) ضمن نفس الظروف، أظهرت الدراسة ان الزمن المطلوب للحصول على نسبة قتل (100%) هو min (21) ويقل بزيادة قدرة الليزر أو الجرعة الاشعاعية ، وان زيادة كثافة الطاقة بزيادة زمن التعريض كافية لإلحاق الضرر داخل الخلية الحية وقتل البكتريا.اثبتت الدراسة انه يمكن استعمال الليزرات أداة تعقيم بدل البسترة التقليدية التي تفقد الحليب مذاقة وبعض خواصة.

الكلمات المفتاحية

بكتريا حمض اللبن،عزل البكتيريا،التشعيع بالليزر،طيف الامتصاص، الجرعة الأشعاعية .

1. المقدمة

بكتريا حمض اللبن (العصيات اللبنية)، هي كائنات حية دقيقة موجبة الغرام هوائية – لا هوائية اختيارياً غير متحركة وغير متبوغة (كروية) لا تنتج أنزيم الكاتلاز (يعمل هذا الأنزيم على تفكيك الماء الأوكسجيني إلى ماء وأوكسجين). ومن الجدير بالذكر أن بكتريا حمض اللبن تعمل على تخمير السكريات ضمن ظروف لا هوائية[1]. وقد استخدمت في صناعة الغذاء لسنوات عديدة بسبب قدرتها على تحويل السكاكر بما فيها اللاكتوز والكربوهيدرات إلى حمض اللبن. وهذا يعطي بالإضافة للطعم لمنتجات الألبان المخمرة كاللبن الرائب، ولكن بخفض درجة الحموضة pH تقلل من فرص نمو الكائنات المخربة للطعام، ولذلك تعطي إمكانية فائدة صحية عبر منع الالتهابات المعوية المعدية. يأخذ التنوع الكبير لبكتريا حمض اللبن أهمية كبيرة نظرًا لكونها ذات فائدة كبيرة فهي توجد ضمن الفلور الطبيعية في أماكن مختلفة في البيئة وتتركز بنسبة اكبر في الحليب [2]وتعد مسؤولة عن تخمرة قد عرف التخمر اللبني الحامضي الذي تقوم به بكتريا حمض اللبن منذ فترة طويلة من الزمن واستخدم من أجل حفظ المواد الغذائية بشكل طبيعي، وقد بدأ استخدامها بادئات لإنتاج الحموضة في أثناء تصنيع منتجات الألبان المتخمرة قبل التعرف على البكتريا المسببة لذلك، حيث كان الحليب يترك في درجة حرارة الغرفة عدة ساعات أثناءها تتكاثر بكتريا حمض اللبن الموجودة في الحليب طبيعيًا ومن ثم يستخدم في تصنيع الألبان المتخمرة، واستمر العمل بهذه الطريقة البدائية في إنتاج البادئات حتى أثبت في عام 1919 بأن البادئ الواجب استخدامه في إنتاج منتجات لبنية ذات طعم ونكهة مرغوب فيها يجب أن يحتوي على نوعين من البكتريا الأول ينتج أغلبه حمض اللبن أما الثاني فقادر على إنتاج الأحماض الطيارة التي تسبب الطعم والنكهة [3]، وفي عام 1929 أظهر العالم Van Neil ان البكتيريا هي المسؤولة عن الطعم والنكهة، وبين العالم طيفور، (1988)، ان دور البادئات في إنتاج مركبات النكهة فإنها تعطي القوام المناسب لمنتجات الألبان المتخمرة وترفع القيمة التغذوية والصحية لهذه المنتجات .[4].

تؤثر الظروف الفيزيائية والكيميائية على نمو ونشاط البكتريا ومنها الحـرارة، الضغط ، تركيز الاوكسجين، وتركيز ايون الهيدروجين [5,6] ، ومن هذه الظروف بث وأنبعاث الطاقة خلال الوسط المادي الحاوي على البكتيريا والتي تعرف هذه الطاقة بالتشعيع، حيث يستخدم الليزر بتعقيم الماء والحليب وبعض المواد الغذائية طريقة من طرق التعقيم المعروفة، تحتاج البكتيريا وجود الضوء المرئي لكي تنمو وتتكاثر مستعملة الطاقة الضوئية ومحولة إياها إلى طاقة كيميائية عن طريق عملية التمثيل الضوئي، وتتميز هـذه البكتيريات بوجود مـواد ملونة تشبه الكلوروفيل النباتي تعمل مادة وسيطة في هذه التفاعلات. يكون تأثير الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet والأشعة السينية X-rays تأثيرا ضارا بالبكتيريات [7] ، عموما فقد أجريت دراسات عديدة ومتشعبة للتحقق من الطرق التي يمكن هذه الإشعاعات أن تقتل بها الخلايا البكتيرية توطئة للتعرف على الطرق التي من شأنها إتقاء التأثير الضار لهذه الإشعاعات وغيرها من الكائنات الأخرى الأكثر رقيا بما فيها الإنسان ولا سيما إذا ما علمنا أن درجة التشابه في سلوك وحساسة الخلايا البكتيرية والخلايا الحيوانية للإشعاعات المختلفة قد تسمح بتطبيق النتائج المتحصل عليها عند دراسة التأثرات على مستوى الخلية الـواحـدة. ويلاحظ أن الإشعاعات ذات الموجات القصيرة عن الضوء المرئي يكون لها تأثيراً

مميتاً للكائنات الحية الدقيقة فهي بذلك تستعمل في التعقيم دون أن ترفع من درجة حرارة المادة المعقمة وتعرف لذلك بطريقة التعقيم البارد [8]، ويمكن استعمال هذه الطريقة في تعقيم المواد الحساسة للحرارة المرتفعة مثل بعض أنواع الأدوية.يمكن انتاج أشعة الليزر بأجزاء معينة من الطيف الكهرومغناطيسي مما يجعلها ذات تأثير حاد على الاحياء الدقيقة لكن يتطلب تأثير الاشعة بصورة مباشرة ويزداد تأثيرها بزيادة الجرعة الاشعاعية كثافة الطاقة لوحدة المساحة وهذا يعتمد على الطول الموجي لليزر المستخدم وقدرة الليزر والفترة الزمنية اللازمة للتشعيع [9].

2. الجزء العملي

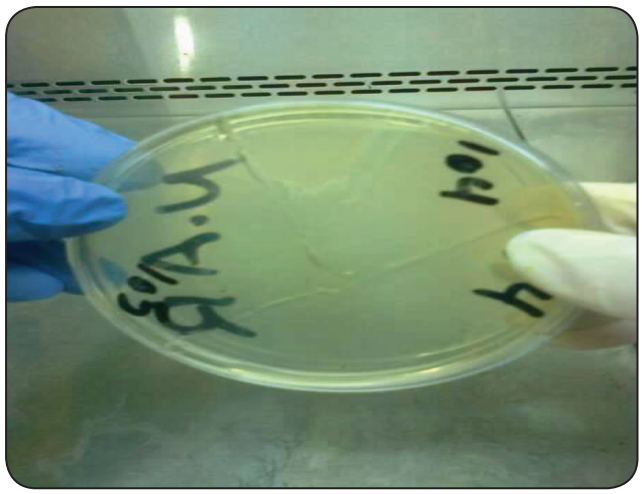
يستعمل الليزر في تعقيم الماء وبعض المواد الغذائية كطريقة من طرائق التعقيم الفيزيائية المعروفة مثل استعمال الحرارة والضغط والموجات الفوق الصوتية والاشعة الفوق البنفسجية وأشعة كاما والبلازما [10]، تم استخلاص بكتريا من الالبان ومقارنة تأثير الليزرات على فترات زمنية مختلفة حيث استخلصت البكتريا من الالبان المحلية وقورنت مع البان منتجة من مصانع (سعودي_ايراني_اردني_سوري). بعد عزل وتشخيص البكتيريا شععت باستخدام الليزر بثلاثة اطوال موجية مختلفة بقدرة متزايدة وفترات زمنية تعرض مختلفة.

1.2. عزل البكتيريا

بعد أخذ ml (10) من محلول فسولوجي من الالبان من المنتجات المذكورة سابقا عزلت البكتيريا بمختبر الاحياء المجهرية في كلية العلوم للبنات جامعة بابل، ثم نقلت الى الوسط المغذي بأخذ مسحة من سطح المزرعة البكتيرية بعد ذلك زرعت البكتيريا بطريقة التخطيط تحت ظروف ملائمة من ضغط ودرجة حرارة لحين تنميتها تحت ظروف مظلمة وحفظها في الثلاجة بعد قياس طيف امتصاصها وتهيئتها للتشعيع.

2.2. تحضير الوسط المغذي

تم وضع g (20) من الوسط المغذي (ماگونكي-اوكسايد اكار Agar Mackounky Oxide) في نصف لتر من الماء المقطر (حسب التعليمات الموضوعة على العلبة من قبل الشركة المصنعة) ثم عقم في الحاضنة على درجة حرارة (200) C^o وضغط Pa (15) لمدة زمنية min (20) بعدها صب في الاطباق، كما مبين بالشكل (1).



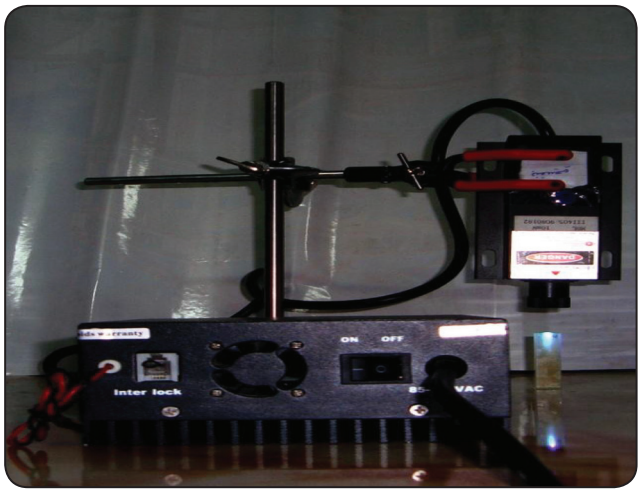
الشكل (1): تحضير الاطباق الحاوية على الوسط المغذي.

3.2. تسجيل طيف الامتصاص

تم فحص طيف امتصاص البكتيريا المعزولة في الاوساط المغذية بأستخدام جهاز (UV-Visible Spectrophotometer) والمجهز من قبل شركة (CECIL) الانكليزية. والذي يعمل ضمن المدى nm (190-900) والمبينة صورته في الشكل (2).

الشكل (2): جهاز لحساب طيف الامتصاص.

تم وضع (3)ml من البكتيريا المعزولة داخل الوسط المغذي في خلية من الكوارتز لفحص طيف امتصاص العينة.وبعدها تشعع العينة بليزر طوله الموجي (405) nm لفترة زمنية مقدارها (10) min وبعد التشعيع أخذ طيف الامتصاص لنفس العينة، كما في الشكل (3).



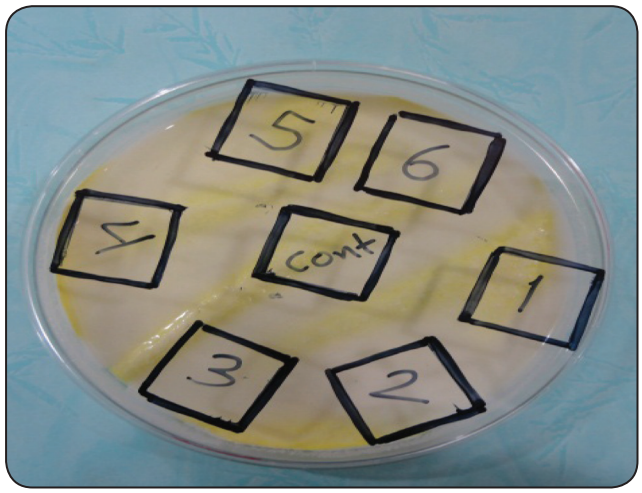
شكل (3): تشعيع الوسط المزروع فيه البكتيريا بالليزر

4.2. تحضير العينات

عزلت وشخصت بكتريا (Enterococcus) من منتجات الالبان في مختبر الاحياء المجهرية ثم نقلت الى الوسط المغذي ماگونكي_اكار تحت ظروف معقمة وحضنت بدرجة حرارة C^{o} (37) لمدة زمنية (24ساعة) في الحاضنة تحت ظروف مظلمة لضمان عدم تأثير الضوء على البكتيريا . وبعد نمو وظهور مستعمرات البكتريا تم حفظها في الثلاجة لحين استعمالها للتشعيع.

5.2. تحضير البكتيريا لغرض التشعيع

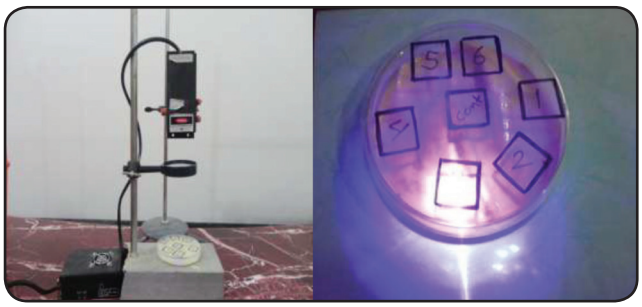
وضع (4) ml من محلول الوسط المغذي في كل طبق من الاطباق المعقمة المراد تشعيعها وخلط معة (4) ml من المحلول الذي يحوي البكتيريا المعزولة ورج جيدا لضمان التوزيع المتجانس وقسمت مناطق مساحة كل منطقة cm^2 (1) لتحديد المنطقة المعرضة لضوء الليزر ليكون جاهز للتشعيع، كمافي الشكل (4).



الشكل (4): الاطباق المحضرة لغرض التشعيع.

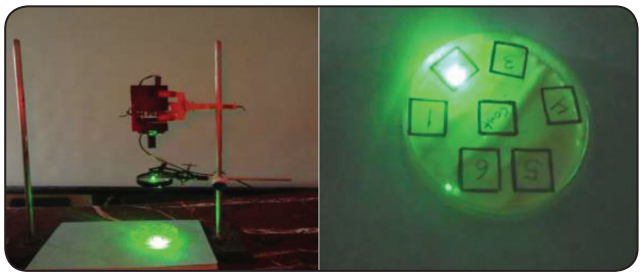
6.2. تشعيع العينات بالليزر

بعد تهيئة العينات عرضت للتشعيع لمدد زمنية مختلفة باستخدام ثلاثة ليزرات، ليزر الحالة الصلبة المضخ بالدايود بطول موجي (405) nm، كما مبين بالشكل (5).



شكل (5): تشعيع الأطباق الحاوية على المزرعة البكتيرية باستخدام ليزر بطول موجي nm (405).

للمقارنة ومعرفة تأثير الطول الموجي عند التشعيع أستخدم ليزر الحالة الصلبة ايضا المضخ بالدايود بطول موجي nm (532)، كما مبين بالشكل (6).



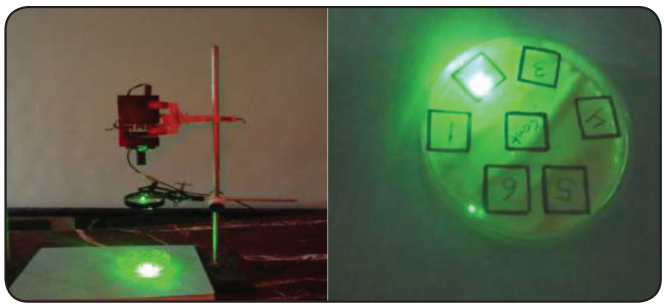
شكل (6): تشعيع الاطباق الحاوية على المزرعه البكتيرية بأستخدام ليزر بطول موجي nm (532).

استخدم ليزر الدايود بطول موجي nm (650) متغير القدرة، كما مبين بالشكل (7)، حيث أسقطت الأشعة عمودياً على العينة الحاوية على العزلات البكتيرية، وأستخدمنا عدسة لامة ذات بعد بؤري cm (15) لتركيز أشعة الليزر على العينة.

لحساب الجرعة الاشعاعية لكثافة الطاقة البصرية لوحدة المساحة أستخدمت العلاقة [8,10]، المبينة في المعادلة رقم (1).

$$Fluence = \frac{Pt}{A} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \quad (1)$$

حيث : Pتمثل قدرة شعاع الليزر ، t زمن التشعيع ، A مساحة البقعة الليزرية .



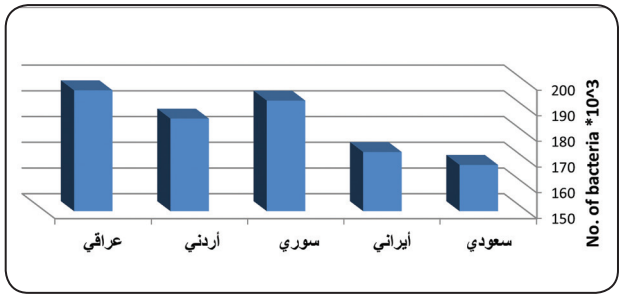
شكل (7): تشعيع الاطباق الحاوية على المزرعه البكتيرية بأستخدام ليزر بطول موجي nm (650).

3. النتائج والمناقشة

بينت نتائج البحث أن البكتيريا المعزولة موجبة الغرام ظهرت على شكل كروي تحت المجهر بنسبة (68.8%) من مجموع العزلات الكلية، وجد منها تقريبا (79.8%) التابعة لجنس (Enterococcus) وانقسم هذا الجنس الى نوعين من البكتيريا كان النوع السائد (E.faecium) بنسبة (59.6%) والنوع (E.faecalis) بنسبة (20.2%)، ووجد الجنس (Lactococcus) بنسبة (13%) جميعها من نوع (L.lactissubsp) وبلغت نسبة وجود النوع (Streptococcus thermophilus) بمقدار (6.2%). اما البكتيريا موجبة الغرام من الشكل البيضوي فقد ظهرت بنسبة (29.5%) من مجموع العزلات الكلية، حيث كانت تابعة لجنس (Pediococcus) جميعها من نوع (P.pentosaceus). وظهر المتبقي من العزلات الكلية بكتيريا بشكل عصوي موجب الغرام بنسبة (1.7%) وكانت تابعة للجنس (Lactobacillus) ومن نوع (Lb.paracaseisubsp)، تقاربت النتائج مع الدراسات السابقة .[1]

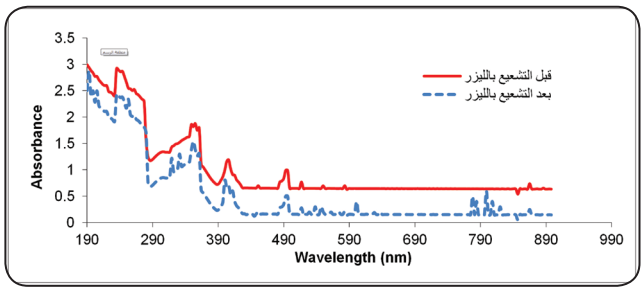
عزلت العينات من منتجات الالبان من مصانع في بلدان مختلفة (العراق ، السعودية ، الأردن ، سوريا و أيران) وبواقع (10) عزلات من كل منتج، حيث تم أخذ حجم

ml (10) من كل عينة تحت نفس الظروف، بينت النتائج أن الالبان العراقية والسورية تحوي على اكثر عدد من البكتريا المعزولة ، اما الألبان السعودية تحوي على اقل نسبة، وذلك الأختلاف التغذية الحيوانية وطبيعة البيئة للحيوان، يبين الشكل (8) هيكل احصائي لعدد البكتريا المعزولة من المنتج المحلي ومقارنتة بالمنتجات الاجنبية.



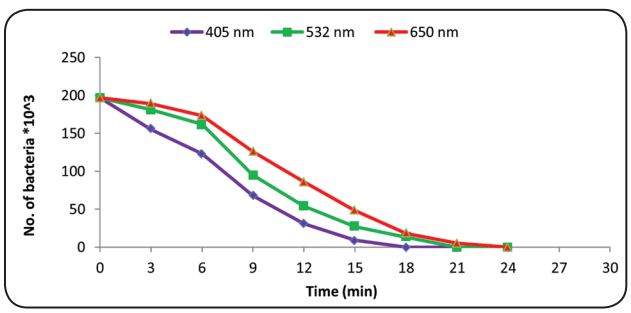
الشكل (8): يمثل عدد المستعمرات البكتيرية للعينات تحت الدراسة.

لمعرفة تأثير اشعة الليزرعلى البكتيريا تم دراسة طيف أمتصاص البكتريا المعزولة من الالبان كذلك ليتم معرفة نوع الطول الموجي المختار لغرض التشعيع، درس طيف امتصاص البكتيريا المعزولة قبل تشعيعها بالليزر وبعد تشعيعها بليزرالحالة الصلبة المضخ بالدايود بطول موجة (405) nm وقدرة خرج (20) mW لفترة زمنية مقدارها (10) min، بينت النتائج ان قمة الامتصاص للبكتريا في منطقة الاشعة فوق البنفسجية ،ولها امتصاصية في الضوء المرئي القريب من الاشعة فوق البنفسجية ، كما نلاحظ ان البكتريا تمتلك امتصاصية متباينة في الطيف المرئي والاشعة تحت الحمراء القريبة. عند مقارنة طيف الامتصاص للعينة قبل وبعد التشعيع باليزر لاحظنا نقصان طيف الامتصاص بنسبة ملحوظة مما يدل على أن نسبة من الخلايا الحية تم قتلها عند تشعيعها بالليزر، حيث يعزى قتل البكتيريا بالليزر الى التأثير الحراري والضغط المتولد داخل الخلية الحية نتيجة أرتفاع درجة الحرارة المتولدة نتيجة امتصاص الماء الاشعة الليزرمما يؤدي الى تمزق الخلايا الحية للبكتيريا، كما مبين بالشكل (9).



شكل (9): طيف الامتصاص للبكتيريا المعزولة.

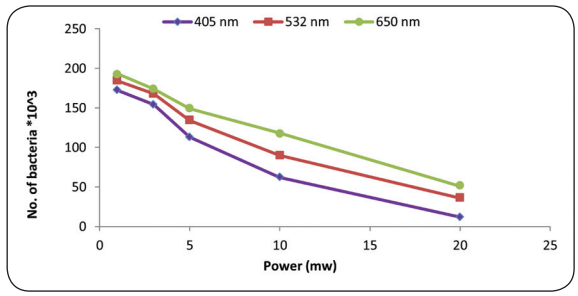
أن زيادة الجرعة الاشعاعية أي زيادة زمن التشعيع يؤدي الى نقصان عدد المستعمرات البكتيرية هذا بدورة يدل ان عدد من المستعمرات البكتيرية قتلت بالتشعيع، حيث تم المقارنة بين أطوال موجية مختارة لليزر المستخدم بعملية التشعيع ، نلاحظ ان الطول الموجي nm (405) له نسبه قتل اكثر من الطول الموجي nm(532) وهذا الطول الموجي له نسبة قتل اكثر من الطول الموجي nm (650) بثبوت قدرة شعاع الليزر mW(10) وسبب هذا ان امتصاص البكتريا للاشعة المرئية القريبة من الطيف الفوق البنفسجي اكثر من باقي الطيف المرئي، كما مبين في الشكل (10) .



الشكل (10): تأثير زمن التشعيع على عدد المستعمرات البكتيرية

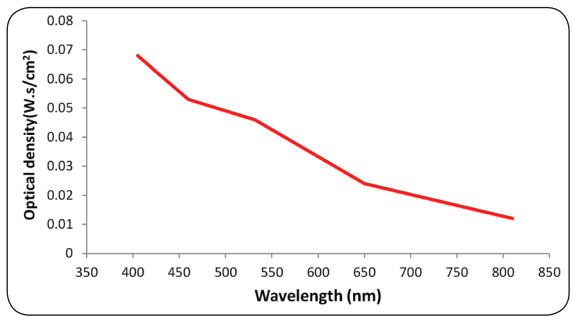
يبين الشكل (11) علاقة عدد المستعمرات البكتيرية كدالة لقدره شعاع الليزر حيث نلاحظ نقصان عدد البكتريا

بزيادة قدرة شعاع الليزر المسلطة، بثبوت زمن التشعيع min (5) .وهذا مؤشر لزيادة او تسريع قتل البكتريا، نلاحظ من النتائج أن الطول الموجي nm (405) له نسبة قتل اكبر من بقية الاطـوال الموجية، لان المنطقة البنفسجية من الضوء المرئي اقرب منطقة الأشعة الفوق البنفسجية من الطيف الكهرومغناطيسي التي تزداد عندها امتصاصية البكتيريا المعزولة.



شكل (11): يمثل تناقص عدد المستعمرات البكتيرية بزيادة قدرة شعاع الليزر

يبين الشكل(12) كثافة الطاقة البصرية كدالة للطول الموجي لوحدة المساحة المسلطة المحسوبة من المعادلة رقم (1) الطاقة للجرعة الاشعاعية (معادلة فلونس) بتشعيع مساحة cm^2 (1) من العينة، نلاحظ نقصان الكثافة البصرية للعينة بزيادة الطول الموجي.



شكل (12): الكثافة البصرية كدالة للطول الموجي.

4. الأستنتاجات

من الدراسة الحالية نستنتج مايلي:-

1. وجـود أكثر من نوع من البكتيريا في منتجات الالبان المستخدمة في البحث وتركز البحث على الجنس السائد منها (Enterococcus) بصورة أكبر في المنتج المحلي مقارنة بالالبان السعودية والاردنية والسورية والايرانية، وهذا يرجع الى أختلاف التغذية الحيوانية [1].
2. كان الجنس السائد في جميع العزلات (Enterococcus) من الشكل الكروي موجب الغرام من نوع (E.faecium) بنسبة (59.7%) تركزت بكميه أكبر بالمنتج العراقي والسوري من باقي المنتجات.
3. للبكتيريا المستخدمة في البحث أستخدام الليزرات بأطوال موجية قريبة من المنطقة فوق البنفسجية لها تأثير أكبر من الليزرات ذات الاطوال الموجية الأكبر، وذلك لأمتلاك البكتيريا المعزولة قمم امتصاص الاشعة الكهرومغناطسية في هذة المنطقة من الطيف .
4. أن تشعيع البكتيريا بالليزر يؤدي الى تناقص الأعداد الحية للبكتيريا مع زيادة الجرعة أو فترةالتعريض.
5. أمكانية الحصول على نسبة قتل (100%) للبكتيريا بالليزرات المستخدمة ضمن ظروف التجربة.
6. أمكانية أستغلال اجهزة الليزر في تعقيم الماء ومنتجات الالبان.

5. المصادر

[1] عهد أبو يونس، الكشف عن بكتيريا حمض اللبن المعزولة من بعض منتجات الالبان السورية، مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية، المجلد (23) العدد (2) الصفحات (317-334)، (2007).

[2] حسين، بهاء الدين والمصلح، رشيد، الأحياء الدقيقة المجهرية في الأغذية، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، مطبعة دارالكتب للطباعة والنشر، جامعة بغداد، 257-260، (1990).

[3] العاني، فائق عزيز ،التكنولوجيا الحيوية، مطبعة دارالكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل، (1993).

[4] طيفور، أنطون، تكنولوجيا الألبان منتجات التخمر، منشورات جامعة دمشق،46-33، (1994).

[5] الموسوي، جاسم حلو، أستعمال ليزر الدايود ذي القدرة العالية في تعقيم الماء والحليب، مجلة ابحاث البصرة، المجلد (4)، العدد (37)، الصفحات (-10 18)،(2011).

[6] Layla M. Hassan,Effectsofdiodelaser 805 nm on the viability of some types of gram negative and gram positive pathogenic bacteria, Iraqi Journal of Science, Vol.(51) , No.(4), PP. 665 - 669 , (2010).

[7] Karue, T, Primary and Secondary mechanisms of action of visible to near IR radiation on cells. Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology, Vol.(49), No.(1), PP. 1 - 17, (1999).

[8] Chopra, S. and Chawla, H.M, "Laser in Chemical and Biological Sciences". Wiley Eastern LTD, New Delhi,(1992).

[9] Markolf, H.N. ''Laser- Tissue Interaction. Fundamentals and Applications'' Third Enlarged Edition . Heidelberg, Germany, (1996).

[10] Prasad N.P, Introduction to Biophotonics John Wiley & Sons, Inc., Publication,(2003).