

Er:YAG Laser Irradiation Induces Behavioral Changes in *V. harveyi*

*Idan Redenski, MSc, DMD,1,2 Sharonit Sahar-Helft, DMD,2
Adam Stabholz, DMD,2 and Doron Steinberg, PhD,1*

Photomedicine and Laser Surgery, 2017

【指導教授】柯俊宏 副教授 國立台北科技大學機電整合研究所

陳芷翎 · 呂柏毅 · 邱國泓

Objectives:

Laser technologies have many different applications in medical, agricultural, and industrial fields. Studies have shown several effects of laser energy on different bacterial species, in a wide variety of settings. Recent reports have found that one of the unique features of bacteria is their ability to communicate among themselves (quorum sensing). We sought to investigate whether low-energy laser irradiation affects bacterial behavior, which is regulated by quorum sensing. **Methods:** Laser irradiations were performed using Er:YAG laser (2940 nm wavelength) at output powers of 0.5, 1.5, 2.5, and 4 W on wild-type *Vibrio harveyi*. Bioluminescence, motility, and biofilm forming capability were assessed on the bacteria after irradiation.

Results:

After irradiation of bacteria, positive dose/output power dependencies were found in the bioluminescence omitted from tested experimental groups. Motility of colonies on semi-solid media was inhibited as irradiation output power was increased. However, after irradiation, biomass analysis of biofilm samples showed negligible differences between the irradiated samples and controls. **Conclusions:** Results indicate the impact of low-energy laser irradiation on bacterial behavior such as quorum sensing and motility, without affecting bacterial growth patterns.

Keywords: laser, biofilm, quorum sensing

研究目的：

雷射有許多不同的應用面不管是在醫療方面、農業或者是工業領域中。在各式各樣的環境中，研究顯示雷射對不同細菌會造成不同影響。最近報告發現，細菌彼此有一獨特的溝通能力，我們稱為“群體感應”。我們試圖研究低能量雷射是否影響細菌群體感應。

方法：

雷射使用輸出功率為 0.5,1.5,2.5,4W 的 Er:YAG 雷射 (波長為 2940nm)，照射野生型哈氏弧菌後對其進行生物發光、活動力及生物膜形成能力進行評估。

結果：

照射細菌後，從測試實驗組的生物螢光可發現陽性劑量與輸出功率的關係。當雷射輸出功率增加，半固體培養皿的菌落活動力會被抑制。然而，照射後生物膜的生物量分析顯示，對照組與樣品組之間的差異可忽略不計。

結論：

低能量雷射照射細菌後將影響群體感應與活動力，而不影響細菌的生長模式。

在不同環境中，細菌會藉由分泌微小特定的信號分子 (自動感應 [AIs]) 做交互溝

通。這樣的交互溝通稱為“群體感應”，可促進細菌的基因適應力，包括生物膜的形成、對抗生素的抵抗力、酸的生產力及耐受力、以及其他特點和有毒特質。革蘭氏陽性菌有如鏈球菌或腸球菌，主要依賴刺激蛋白質作為群體感應的信號分子，革蘭氏陰性菌有如假單胞菌，使用高絲氨酸內酯 (HSLs) 進行信號傳導及交互溝通之目的。

autoinducer-2 (AI-2) 能在許多革蘭氏陽性菌和革蘭氏陰性菌中被找到，故被稱為“通用自動誘導劑”。

The autoinducer-2 (AI-2) 是一種呋喃酰 (呋喃) 硼酸二酯，是用於群體感應的信號分子家族的成員。

自由生活的哈氏弧菌被廣泛應用於群體感應的研究。這些細菌產生三種可調節生物發光的自動誘導劑：種特異性的高絲氨酸 (HSL) (AI-1)、通用型感應 (AI-2) 和霍亂弧菌自動感應 (CAI-1)。群體感應能調節細菌的一些性質，例如生物發光、在半固體培養基中活動力以及生物膜的生產力。

雷射是醫學中一種新興的治療方法，不同的雷射以不同方法與組織及微生物產生交互作用。這些交互作用取決於雷射不同的特性，例如：特定的波長、發射的能量值 (功率)、曝光時間。鉬雅各雷射包含了鉍鋁石榴石的晶體介質。鉬雅各雷射的波長為 2.94 μm ，屬於中紅外線，此波長可被所有生物體中豐富的水分子所吸收。

尋找出解決細菌感染及抗生素抗藥性的新方法已成為醫療領域的重大挑戰。過去十年中，發現抑制細菌交互溝通可預防和控制

細菌感染。當輔以光敏劑或直接應用於標的物時，光子能量技術可做抑菌和殺菌作用。而低劑量的雷射對細菌群體感應的影響將會是個新的研究。這也是這個研究主要目的。

Materials and Methods

雷射照射 Laser irradiation

使用柔觸水雷射™ (LiteTouch™, 以色列) 長17mm，直徑400 μ ，波長為 2940nm 藍寶石尖端 Er:YAG 雷射進行照射。使用不同的功率輸出，範圍為 0.5W (50mJ, 10Hz) 至 4.0W (100mJ, 40Hz)。在功率 0.5, 1.5 和 2.5W 時，總能量密度不超過 0.255 J/cm²，而4W時總能量密度不超過 0.5 J/cm²。低能量雷射的設定被評估為不能抑制細菌生長。發射光束的尖頭必須固定於表面4.5cm距離處並垂直照射於的孔的中心。關閉水噴霧避免樣品被稀釋，並將每個樣品每15秒照射一次。

細菌菌株和生長

在AB培養基中，野生的哈維氏弧菌生長在30°C有氧的環境中一個晚上。菌株由普林斯頓大學 B. Bassler 慷慨提供。

照射細菌

經過一晚的培育過後，將細菌的培養物稀釋成光密度0.5的懸浮液，20 μ L的等份懸浮液備於96孔的聚合酶連鎖反應板，並進行15秒的雷射照射，以此作為檢測照射效果的依據。

哈維氏弧菌經照射後的生長曲線和生物發光

將經過照射的15微生細菌懸浮液接種在具有視覺底部的96孔白板中，並使用185 μ L的硫胺素和核黃素來補充AB培養基。使用平板閱讀器每30分鐘記錄哈維氏弧菌的吸光度和生物發光，總共紀錄18小時，波長為595nm，在每個循環進行前搖晃90秒。計算發光度和吸光度之間比率曲線下的面積來得到相對發光值，這些數據能將不同生長速率所造成的差異減到最小。

哈維氏弧菌經照射後的生物膜生成

Soni等學者描述了哈式弧菌生物膜的形成。將經過照射50 μ L的哈維氏弧菌接種在材質為聚氯乙烯的48孔板，並在AB培養基上補充450 μ L的硫胺素及核黃素。在30°C的環境下培育24小時後，使用500 μ L的生理食鹽水進行兩次的清洗，然後將生物膜樣品逕行DNA定量並描述如下。

哈維氏弧菌生物膜生物量化

將樣本以前述方式做DNA的萃取及量化。簡言之，將160 μ L的氫氧化鈉和40 μ L碳酸二乙脂進行調和後，加入到經清洗過的生物膜孔中。在60°C的環境培育1小時後，將每一個樣品中加入18.5 μ L的氨基丁三醇，並保存在-20°C的環境直到進行下個步驟。使用稜鏡儀器去根據標準曲線對樣品的DNA進行定量。使用DNA試劑盒去提取過夜哈維氏弧菌的DNA基因組。將DNA基因組儲存在-20°C的環境。

哈維氏弧菌活動力的量測

在琼脂板上進行活動力量測。將經 (0.5, 1.5, 2.5, 4W) 照射培育過夜後的哈維氏弧菌接種在含有0.2%琼脂AB培養基上。在30°C 環境下培育18小時後進行運動量的量測。

統計分析

所有實驗都是一式三份的方法進行。並使用單向方差分析的方法去計算統計量。

Results

哈維氏弧菌照射後的成長

透過OD測量法去每30分鐘監測浮游細菌的生長長達18小時，來記錄哈維氏弧菌接種物的生長模式 (圖1)。經過照射和未照

射細菌生長曲線的對照圖。從圖中可得知，指數在3.5至12小時間變化最為明顯，靜置18小時後達到0.74 OD平均值。各組別間沒有顯著差異 (p 值 > 0.05)。

哈維氏弧菌生物膜生物量化

照射24小時後的樣本採用定量的聚合酶連鎖反應來確認生長模式是否會受到影響 (圖2)。研究發現實驗組和對照組無明顯差異，平均細菌DNA為15.07 ng/IL (p 值 > 0.05)。

哈維氏菌發光和群體感應

儘管細菌的生長不會顯著地受到雷射影響 (圖1,2)，當施以較高輸出功率的雷射時，細菌的生物發光動力學將有明顯較高的

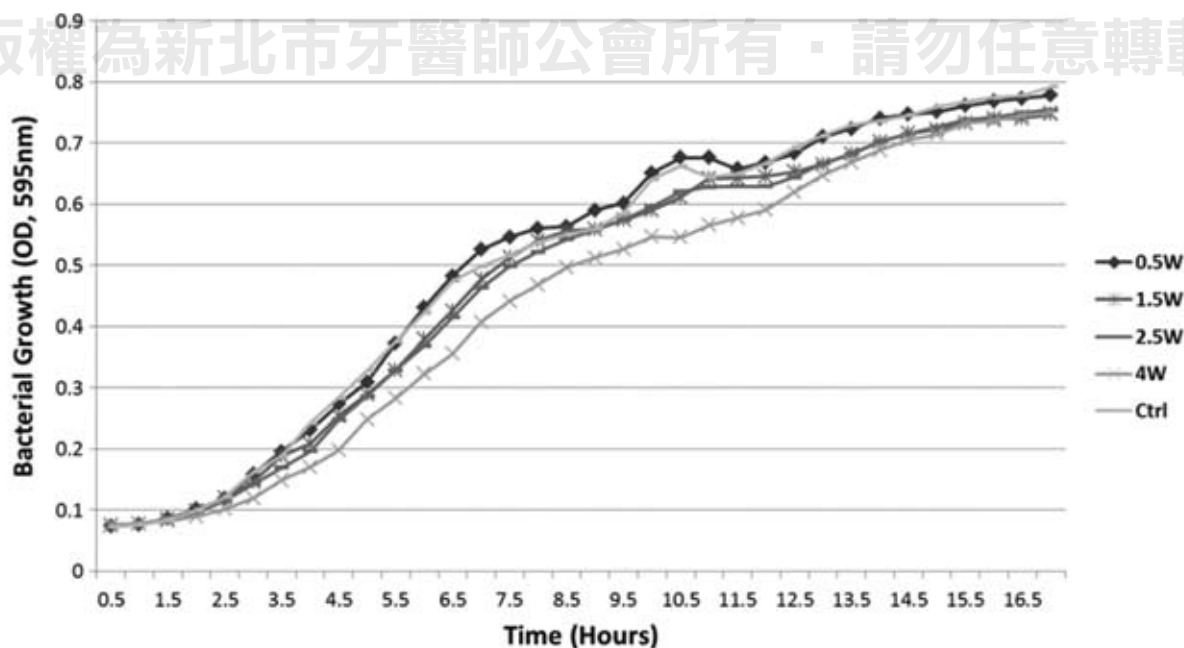


FIG.1. Optical density measurements of bacterial growth kinetics recorded every 30min for 18h. Graphs represent irradiated *V. harveyi* study groups (0.5, 1.5, 2.5, and 4W).

數值 (圖3)。圖4 為評估定量培養接種群體感應的方法，計算出每組曲線面積並除上對應的OD實驗數據。可以看到0.5W照射組與未處理組並無太大差異，但1.5W、2.5W和4W的生物發光個別升高至 $22.6\% \pm 3.31\%$ 、 $3.52\% \pm 8.47\%$ 和 $66.9\% \pm 2.00\%$ 。

哈維氏菌動力檢測

靠包含AB+介質的培養皿評估照射後細菌的活力狀況。圖5 顯示使用不同功率照射孵育於培養皿中的細菌圖像。圖6 提供了各組實驗組與未處理組對照的運動光量的計算與分析。隨著提高輸出雷射功率，菌落擴展的能力也被抑制下來了。0.5W的照射光量下降了 $21.7\% \pm 7.4\%$ 、1.5W的下降了 $37.5\% \pm 8.0\%$ 、2.5W的下降了 $24.4\% \pm 8.0\%$ 與 4.0W的 $65.9\% \pm 8.4\%$ 。

討論

細菌的胞外信號分子 (如AIs) 的合成、分泌與結合也有助於細菌間的溝通，就像我們所知的群體感應一樣。細菌對AIs的反應將導致細菌基因調控的改變，進而造成細菌表現型的改變。抑制群體感應對控制細菌性質來說是很重要的。關於抑制細菌感染目前主要研究集中在尋找傳感器阻滯劑、AIs相似物和影響AIs的分泌與降解。

由於群體感應是細菌中的重要調控系統，因此需探索其他方法防止群體感應發生。目前尚未得到光子能量照射對群體感應的影像之研究。特定波長的光能量可有效地滲入細菌生物膜的深層，若與標準技術相比，使用這種光能量會有很大的優勢存在。因此我們試圖研究低劑量的 Er:YAG 雷射對

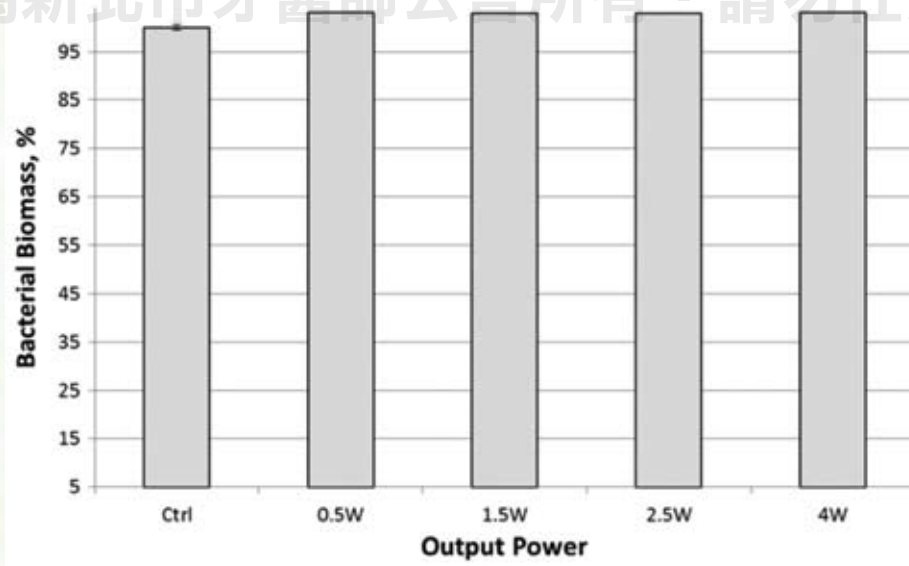


FIG.2. qPCR quantification of bacterial biomass from biofilms incubated for 24h and grown from samples previously exposed to laser irradiation at 0.5, 1.5, 2.5, and 4W compared with nonirradiated controls. qPCR, quantitative polymerase chain reaction.

版權為新北市牙醫師公會所有，請勿任意轉載

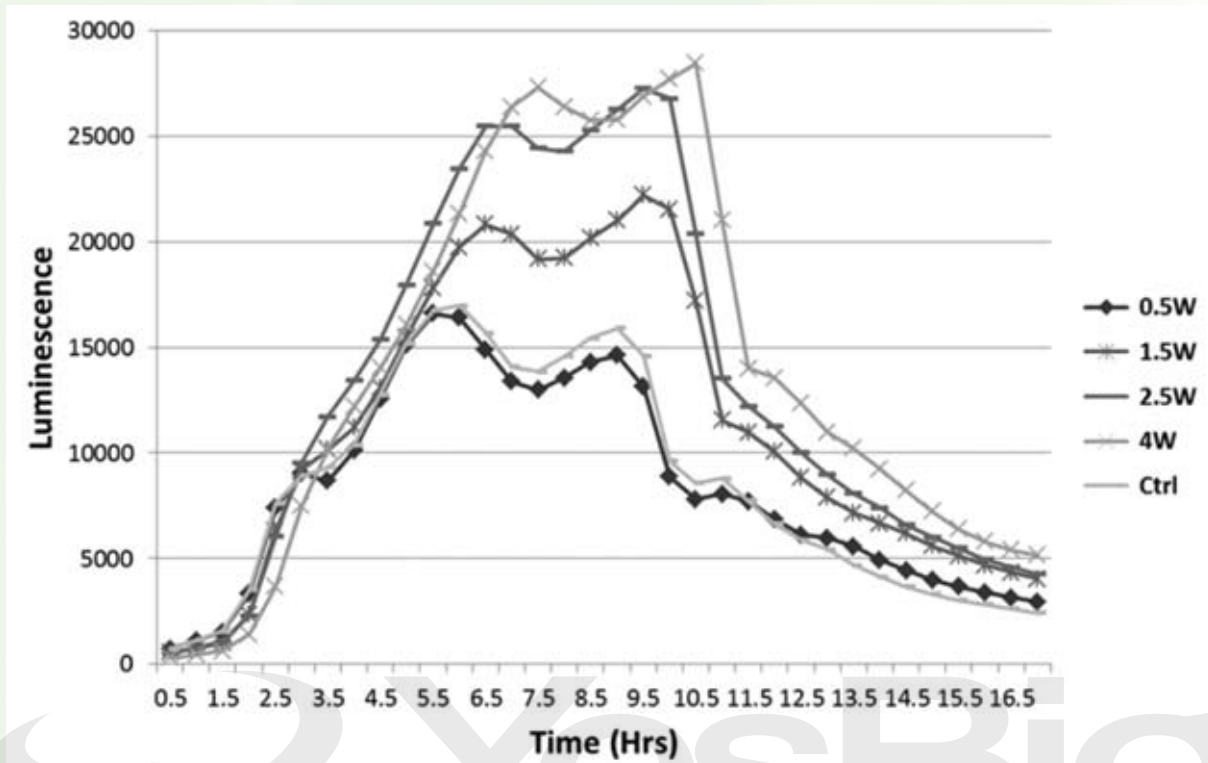


FIG.3. Kinetics of irradiated *V. harveyi* wild-type BB120 cultures during 18 h incubation. Bioluminescence values of incubated cultures increased as the output power setting was higher.

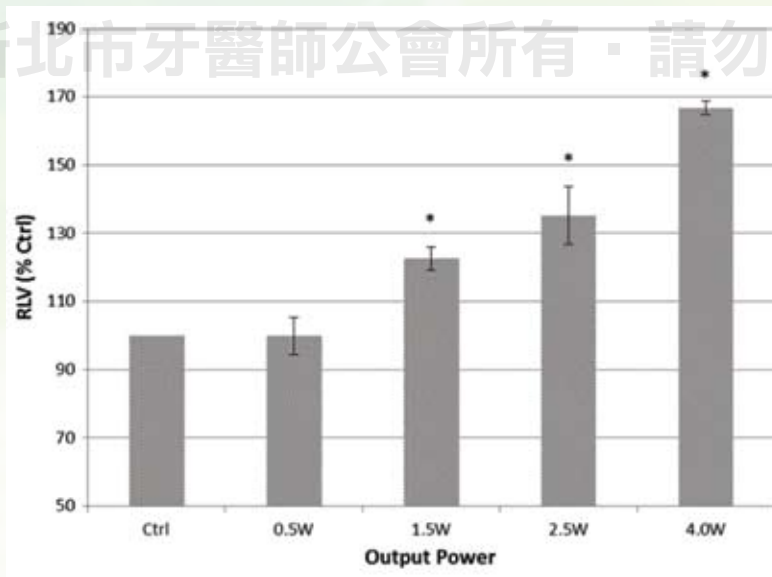


FIG.4. Comparison of RLVs for each group. RLV curves were calculated by dividing each bioluminescence reading by the absorbance values to normalize the luminescence value of each sample to its cell density and to avoid dissimilarities caused by differences in growth rates by absorbance values. Asterisks mark indicates significant difference to the respective controls (t-test, p value <0.05). RLVs, relative luminescence values.

YESBIO
版權為新北市牙醫師公會所有 · 請勿任意轉載

哈氏弧菌的影響，這種細菌被廣泛作為研究菌體間交互溝通的模型。

目前已有研究指出光子的能量會以不同的方式影響細菌。一方面是變形鏈球菌於生長生物膜時，會因藍光照射而有所成長，另一方面則會受損細菌活力。使用共聚焦激光掃描顯微鏡觀看高功率CO₂照射會如何影響牙齒表面生物膜之狀況，而可發現照射區域的邊緣處死亡細菌比例增加，焦點中心則是細菌蒸發了。

低能量雷射治療可能會稍稍影響細菌的生長與生存能力，也可能在高劑量時抑制細菌之活力，而這些影響也取決於細菌的生活環境與生理狀態。此外，Er:YAG 雷射已被證明具有低能量的治療效果。

當設定輸出15秒時，使用功率密度不超過1.0 J/cm²的低能量輸出時，接種細菌的生長與浮游狀態會與未處理對照組不同，OD至少達到0.73，這確保了我們在雷射治療後，細菌發生的變化不是因為生長模式的不同。

使用OD測量去記錄細菌批次生長的生物發光。將細菌的生物發光用來作為測量細菌分泌和分佈到細菌環境中的手段，並且作為細胞間通訊的指標，特別是使用哈維氏弧菌作為被測試的細菌時。^{41,42}

發現雷射水平能量與輻射組 (1.5, 2.5 和 4W) 的測量值之間的正相關係為2.6% ~ 66.9%。由光子能量誘導的不同雷射水平可能導致細菌增加細胞間群體感應，作為建立協調保護免受雷射照射的手段。雖然基於人群的AI分泌增加，但生物膜形式的細胞質量不受低劑量照射的影響。這些研究結果表明，儘管細胞間分泌和結合負責的聯集被上調，但是其他細胞被抑製到在孵育24小時後生物膜中的細胞質量才相似。

已知哈維氏弧菌以高密度組織生產生物膜。生物膜生產通過受群體感知調控的基因進行調控，當分析從輻射樣品生長的生物膜時，實驗組與未處理的對照之間記錄的差異可以忽略不計，以DNA表達細胞質量測定。細菌到非常低的雷射能量水平可能通過

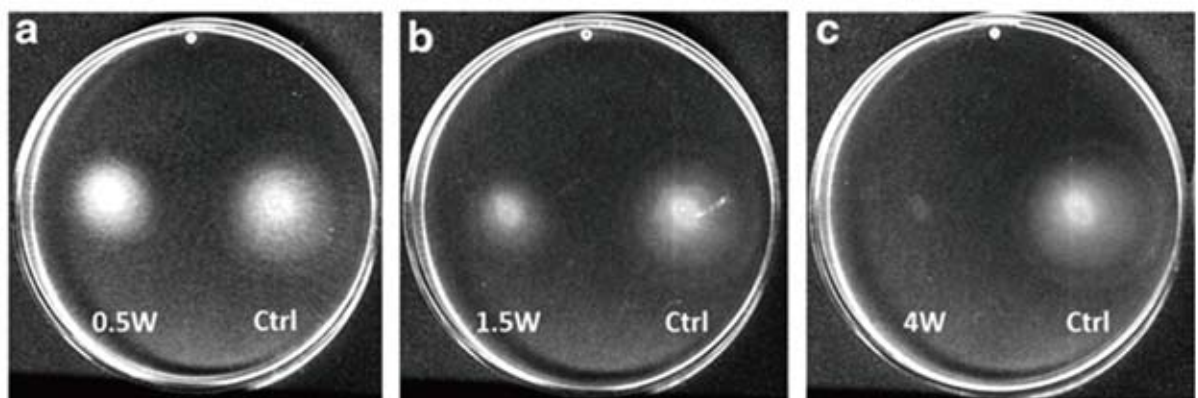


FIG.5. Scans of agar plates inoculated with bacteria after laser irradiation at 0.5W(a), 1.5W(b), and 4W(c). All plates were scanned using a digital scanner after which images underwent analysis using ImageJ digital processing software to assess and compare postirradiation motility of the colonies (left) to untreated controls (right).

生物刺激可以忽略不計，甚至對細菌生長產生積極的影響，並不一定是殺菌效果。

哈維氏弧菌 *V. harveyi* 利用的三個主要的群體感知聯集有助於生物膜基因調控和表達。三個信號聯集最終都依賴於調節成分的LuxO脫磷蛋白。一旦處於其磷酸酶形式，LuxO不能抑制調節蛋白LuxR產生的調控RNA，而啟動基因表達。⁴⁶ Waters和Bassler⁴¹ 表明，雖然三個信號聯集最終導致LuxR產生和基因表達，但是不同的啟動因子對調節蛋白具有不同的親和力。每個聯集 (HAI-1, AI-2和CAI-1) 對LuxR積累具有不同的影響，這意味著三種信號中的每一種對基因激活的影響是不同的。在目前的研究中，Er:YAG 雷射照射可能以不同的方式影響這些聯集，通過抑制對細菌生長或抑制“強”聯集 (HAI-1) 的影響最小的“弱”聯集 (CAI-1) 並在同一時間上調節其他聯集。這裡提供的數據強調照射的細菌仍然能夠生長和發展群聚的生物膜。

活動力被認為是哈維氏弧菌原始毒性因子之一。該細菌具有雙鞭毛系統，其結合單極鞭毛在水性環境中泳動和一組外側鞭毛用於聚集黏著於表面上。記錄所有經過照射的哈維氏弧菌泳動現象顯著減少，從0.5W照射減少21.7%，4.0W照射降低至65.9%。運動和生物膜傳導受到群體感知和信號途徑的積極調節，包括 AI-2 和 HAI-1 信號級聯。如前所述，雷射對細菌代謝的影響可能會阻礙且具有不同通信信號能力，導致我們的結果中觀察到不同的表型。因此，雷射照射對於鞭毛基因的表現有關鍵的影響作用，但是對細菌的生長只有限於生物膜及浮游狀態，導致我們的結果觀察到不同的表型。

鑑於目前的證據，我們認為 Er:YAG 雷射對哈維氏弧菌 *V.harveyi* 的行為適應性有直接的影響。未來研究應著重分析經輻射照射的基因表達和生物膜特徵。我們研究的結果對細菌溝通的調控帶來重要的洞察，這與使用雷射來控制感染性疾病有著顯著相關。

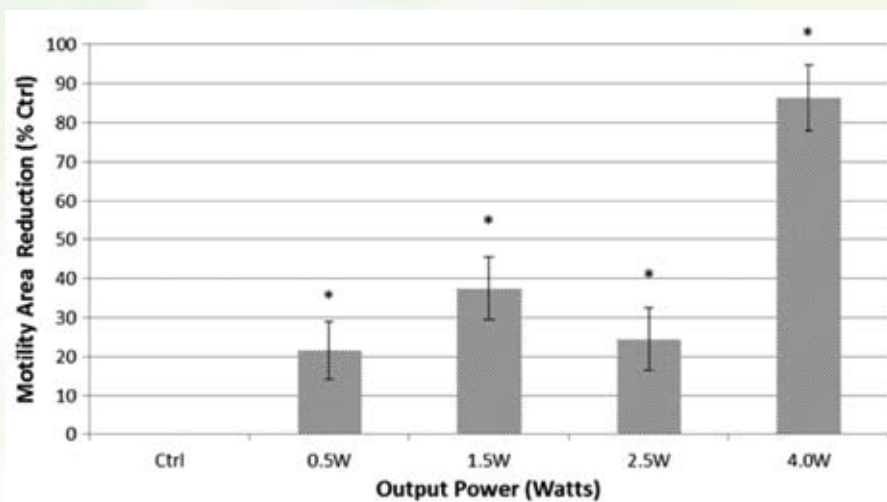


FIG.6. Comparison of motility halos reduction by irradiated bacteria for 15 sec at 0.5,1.5, 2.5, and 4.0W to untreated controls. Halos area analysis was performed using ImageJ software. Asterisks mark represents significant difference to the respective controls (t-test, p value <0.05).

References

1. Camilli A, Bassler BL. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* 2006;311:1113–1116.
2. Bassler BL, Losick R. Bacterially speaking. *Cell* 2006; 125: 237–246.
3. Straight PD, Kolter R. Interspecies chemical communication in bacterial development. *Annu Rev Microbiol* 2009; 63:99–118.
4. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 1998; 280:295–298.
5. Rezzonico F, Duffy B. Lack of genomic evidence of AI-2 receptors suggests a non-quorum sensing role for luxS in most bacteria. *BMC Microbiol* 2008; 8:154.
6. Bassler BL, Wright M, Silverman MR. Multiple signaling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol Microbiol* 1994; 13:273–286.
7. Winzer K, Hardie KR, Williams P. LuxS and autoinducer-2: their contribution to quorum sensing and metabolism in bacteria. *Adv Appl Microbiol* 2003; 53:291.
8. Henke JM, Bassler BL. Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* 2004; 186:6902–6914.
9. Anetzberger C, Reiger M, Fekete A, et al. Autoinducers act as biological timers in *Vibrio harveyi*. *PLoS One* 2012; 7:e48310.
10. Barrios GAF, Zuo R, Hashimoto Y, Yang L, Bentley WE, Wood TK. Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *J Bacteriol* 2006; 188:305–316.
11. Hammer BK, Bassler BL. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 2003; 50:101–104.
12. Rice SA, Koh KS, Queck SY, Labbate M, Lam KW, Kjelleberg S. Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *J Bacteriol* 2005; 187:3477–3485.
13. Li J, Attila C, Wang L, Wood TK, Valdes JJ, Bentley WE. Quorum sensing in *Escherichia coli* is signaled by AI-2/LsrR: effects on small RNA and biofilm architecture. *J Bacteriol* 2007; 189:6011–6020.
14. Vikram A, Jesudhasan PR, Jayaprakasha GK, Pillai SD, Patil BS. Citrus limonoids interfere with *Vibrio harveyi* cell-cell signalling and biofilm formation by modulating the response regulator LuxO. *Microbiology* 2011; 157:99–110.
15. Roy V, Meyer MT, Smith JA, et al. AI-2 analogs and antibiotics: a synergistic approach to reduce bacterial biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97:2627–2638.
16. Kadirvel M, Fanimarvasti F, Forbes S, et al. Inhibition of quorum sensing and biofilm formation in *Vibrio harveyi* by 4-fluoro-DPD; a novel potent inhibitor of signalling. *Chem Commun* 2014; 50:5000–5002.
17. Hong NT, Baruah K, Vanrompay D, Bossier P. Characterization of phenotype variations of luminescent and non-luminescent variants of *Vibrio harveyi* wild type and quorum sensing mutants. *J Fish Dis* 2016; 39:317–327.
18. Hibst R, Keller U. Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances: I. Measurement of the ablation rate. *Lasers Surg Med* 1989; 9:338–344.
19. Hentzer M, Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 2003; 112:1300–1307.
20. Zhang LH, Dong YH. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol Microbiol* 2004; 53:1563–1571.
21. Jackson Z, Meghji S, Macrobert A, Henderson B, Wilson M. Killing of the yeast and Hyphal forms of candida albicans using a light-activated antimicrobial agent. *Lasers Med Sci* 1999; 14:150–157.
22. Karrer S, Szeimies RM, Ernst S, Abels C, Baumler W, Landthaler M. Photodynamic inactivation of staphylococci with 5-aminolaevulinic Acid or photofrin. *Lasers Med Sci* 1999; 14:54–61.
23. Zakariasen KL, Dederich DN, Tulip J, DeCoste S, Jensen SE, Pickard MA. Bactericidal action of carbon dioxide laser radiation in experimental dental root canals. *Can J Microbiol* 1986;32:942–946.
24. Whitters CJ, Macfarlane TW, Mackenzie D, Moseley H, Strang R. The bactericidal activity of pulsed Nd-YAG laser radiation in vitro. *Lasers Med Sci* 1994; 9:297–303.
25. Dederich DN, Pickard MA, Vaughn AS, Tulip J, Zakariasen KL. Comparative bactericidal exposures for selected oral bacteria using carbon dioxide laser radiation. *Lasers Surg Med* 1990; 10:591–594.
26. Aharoni R, Bronstheyn M, Jabbour A, Zaks B, Srebnik M, Steinberg D. Oxazaborolidine derivatives inducing autoinducer-2 signal transduction in *Vibrio harveyi*. *Bioorg Med Chem* 2008; 16:1596–1604.
27. Feldman M, Weiss EI, Ofek I, Steinberg D. Interference of cranberry constituents in cell-cell signaling system of *Vibrio harveyi*. *Curr Microbiol* 2009;59:469–474.
28. Soni D, Smoum R, Breuer A, Mechoulam R, Steinberg D. Effect of the synthetic cannabinoid HU-210 on quorum sensing and on the production of quorum sensing-mediated virulence factors by *Vibrio harveyi*. *BMC Microbiol* 2015; 15:159.
29. Assaf D, Steinberg D, Shemesh M. Lactose triggers biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Int Dairy J* 2015;42: 51–57.
30. Yang Q, Defoirdt T. Quorum sensing positively regulates flagellar motility in pathogenic *Vibrio harveyi*. *Environ Microbiol* 2015; 17:960–968.
31. Rutherford ST, Bassler BL. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a012427.
32. Grandclément C, Tannie' res M, More' ra S, Dessaux Y, Faure D. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol Rev* 2016; 40:86–116.
33. Lubart R, Lipovski A, Nitzan Y, Friedmann H. A possible mechanism for the bactericidal effect of visible light. *Laser Therapy* 2011; 20:17–22.
34. Feuerstein O. Light therapy: complementary antibacterial treatment of oral biofilm. *Adv Dental Res* 2012; 24:103–107.
35. Cohen-Berner J, Steinberg D, Featherstone JD, Feuerstein O. Sustained effects of blue light on *Streptococcus mutans* in regrown biofilm. *Lasers Med Sci* 2016; 31:445–452.
36. Cohen J, Featherstone JD, Le CQ, Steinberg D, Feuerstein O. Effects of CO2 laser irradiation on tooth enamel coated with biofilm. *Lasers Surg Med* 2014; 46:216–223.
37. Daniels LL, Quickenden TI. Does low-intensity He-Ne laser radiation produce a photobiological growth response in *Escherichia coli*? *Photochem Photobiol* 1994;60:481–485.
38. Nandakumar K, Shinozaki T, Obika H. Impact of pulsed Nd: YAG laser on the marine biofilm-forming bacteria *Pseudoalteromonas carrageenovora*: significance of physiological status. *Canadian J Microbiol* 2002; 48:326–332.