استخدام منظومة ليزر النتروجين البصرية لتنقية المياه من البكتريا

ندى سهيل احمد اسعد احمد كامل وفاء عبد الستار هند وليد عبد الله

مدرس جامعة ديالى/ كلية العلوم/ قسم الفيزياء

استاذ مساعد/جامعة ديالى/ كلية العلوم/ قسم الفيزياء

فيزياوي اقدم/جامعة ديالى/ كلية العلوم/ قسم الفيزياء

مدرس مساعد/جامعة ديالى/ كلية العلوم/ قسم الفيزياء

الخلاصة

تم في هذا البحث استخدام منظومة ليزرالنتروجين البصرية ذوالطول الموجي 337µm. 0 لقتل بكتريا *Escherichia coli* بامد نبضة 150مايكروجول. شععت عينات من المحلول الفسيولوجي الحاوي على بكتريا *Escherichia coli* في ثلاثة احجام0.3،0.2،0.1 سم^{3}في انابيب اختبار بحجم (0.5) سم ^{3} وبفترات زمنية مختلفة . اظهرت النتائج بعد التشعيع حصول اعلى نسبة قتل 100 %للبكتريا بليزر النتروجين عند فترة تعرض 30 دقيقة وبذلك حصلنا على تنقية للماء بكفاءة عالية .

الكلمات المفتاحية : تنقية المياه بالليزر، قتل البكتريا ،ليزر النتروجين

Employment nitrogen Laser Optical System to Pollution Water from Bacteria

Nada Suheel Ahmad* , Asad Ahmad Kamel , Wafa Abdl Satar*** and Hind Waled****

* teacher/diyala university/sciences college

**Assistant professor/diyala university/sciences college

***physicist oldest /diyala university/sciences college

****Assistant teacher/diyala university/sciences college

Received 26 April 2015 ; Accepted 5 October 2015

Abstract

In this paper , nitrogen laser system with wavelength 0 .337µm was used to kill the *Escherichia coli* bacteria at pulse duration 150 µJ . samples of physiological solution containing *Escherichia coli* bacteria with three sizes of (0.2,0.2,0.3) cm3 was irradiated in test tubes with size 0.5 cm3 at different periods time . After wish 30 minute irradiation the results showed highest percentage bacteria killing which reached to 100%and that lead to perfect purification for water .

Key words: pollution water by laser ,kill bacteria ,laser nitrogen

المقدمة

تعتبر عمليات التعقيم من العمليات الضرورية في المعالجة الاساسية لمياه الشرب ممثلة في محطات مياه الشرب الكبيرة وفي المعالجة الثانوية ممثلة في المنشات المتخصصة لانتاج مياه الشرب معقمة او في المعالجة المنزلية .لقد برزت الحاجة للتعقيم بعد انتشار التلوث البيئي على نطاق واسع بحيث اصبح من الصعب السيطرة على خصائص المياه البيولوجية في الانهار والبحيرات والابار الجوفية .[1]

أن تطبيقات الليزر فاقت حدود التصور وربما لا يعقل عند غير المختصين بفيزياء الليزر أن يستعمل الليزر في تعقيم الماء وبعض المواد الغذائية كطريقة من طرائق التعقيم الفيزيائية مثل استعمال الحرارة والضغط والموجات فوق الصوتية ولأشعة فوق البنفسجية والبلازما فضلا عن الطرائق الكيميائية الأخرى.

وقد يتبادر الى الذهن ان هذه الطريقة تبدو مكلفة فيما اذا طبقت في معامل تصفية المياه وإنتاج المواد الغذائية ألا أنه بمجرد الاطلاع على فوائد هذا التطبيق فأنه سيبدو الامر مستحقا للعناء وعندما يكون لليزر قابلية قتل السبورات (spores) البكترية والتي هي اكثر مقاومة من الخلايا الخضرية بأكثر من(40) مرة وهو فارق كبير جدا قياسيا بالطرائق التقليدية التي لا تستطيع قتلها بهذا الليزر قد حقق انجازا عظيماً[2].

آلية تفاعل أشعة الليزر مع الأنظمة البايولوجية

(Laser radiation-Biological system mechanism interaction)

وتتضمن دراسة جزيئية لتراكيب الأنظمة البايولوجية وحزم الامتصاص والانعكاس وماذا يحصل عند الامتصاص بدءا من تكوين الجزيئات حتى التفاعلات البايولوجية الضوئية:

1- تكوين الجزيئات الحية (Formation of living molecules) :

تتكون الأنظمة البايولوجية من جزيئات مترابطة مع بعضها والجزيئات تتكون من ذرات مترابطة مع بعضها بأواصر كيميائية وتمتلك الأنظمة البايولوجية العديد من ذرات العناصر الطبيعية كالكاربون ولأوكسجين والنتروجين والفوسفات وغيرها ، وترتبط مع بعضها بأواصر مختلفة مثل الأواصر التساهمية covalent bands والأواصر الايونية ionic bands والأواصر الهيدروجينية hydrogen bands .

ترتبط الذرات في الجزيئات العضوية بأواصر تساهمية وهي من أهم الأواص رفي أي نظام بايولوجي وهي تلك التي تكون (C-C), (C-H), (C-O), (C-N), (N-H)كما تحتوي بعض الجزيئات الأهمية البايولوجية على مجاميع فعالة فمثلا يحتوي أي حامض أميني على مجموعة أمين(-NH_2)amino ولهذا سمي بالحامض الأميني أن معظم الأواصر التساهمية قوية جدا ولا تتكسر مالم تجهز بكمية كبيرة من الطاقة.[3] أما الاصرة الهيدروجينية فهي الأخرى ليست اقل اهمية من الاصرة التساهمية فهي المسؤولة عن تكوين الماء حيث تربط الأواصر الهيدروجينية جزيئات الماء سوية لتكوين نظاما تشابكيا متغيرا وهذا التآصر يجعل الماء سائلا ومع ذلك فهو ذو درجة غليان عالية نسبيا كما أن التاصر الهيدروجيني مسؤول عن خواص العديد من الجزيئات ذات الأهمية البايولوجية مثل DNA الخلية،والبروتين، أن الاصرة الهيدروجينية اضعف بكثير من الاصرة التساهمية .ويمكن تصنيف الجزيئات البايولوجية إلى جزيئات صغيرة وجزيئات كبيرة حيث أن الجزيئات الصغيرة تمثل تشكيلة من الذرات توجد معظمها بشكل أيونات مشحونة وهي تشكل 1% من الخلية اما الجزيئات الكبيرة فيمكن تصنيفها إلى ثلاثة أصناف رئيسية وهي البروتينات والأحماض النووية والسكريات المتعددة والجزيئات حيث تحتاج هذه الانتقالات إلى طاقة فوتونات الأشعة فوق البنفسجية والمرئية اما الطاقة المطلوبة لأحداث الانتقالات الجزئية الدورانية والاهتزازية فتكون اقل كثيرا من الطاقة المطلوبة لأحداث الانتقالات الالكترونية وهي مقدرة (Quantimized) ايضا. [4]

2--البايولوجية – الضوئية للجزيئات الحية (PHOTOLOGY FOR HAVING : MOLECULES)

وهي دراسة تختص في تفاعلات الأشعة الكهرومغناطيسية (غير مؤينة) مع الجزيئات البايولوجية ودراسة إستجابتها البايولوجية . أن طاقة الفوتون في منطقة الأشعة فوق البنفسجية والأشعة المرئية كافية لإحداث تهيجات إلكترونية للجزيئات مسببة تفاعلات كيميائية مميزة ، فالأشعة فوق البنفسجية تمتص بشكل مميز من الأحماض النووية للخلية من قبل القواعد النتروجينية فلها قمة إمتصاص عند 260 نانومتر مسببة تفاعلات وأضرار عرضية مسببة تفطير وتثبيط DNA الخلية .[6,5] أما الضوء المرئي فإمتصاصيته قليلة من قبل الجزيئات غير الصبغية لذلك تبدو شفافة تحت المجهر أما في حالة وجو الصبغة فأن جزء من الضوء يمتص وينعكس والباقي لذا تبدو ملونة تحت المجهر وهي تلعب دوراً في عملية البناء الضوئي أما إذا كان الضوء ذا شدة كافية مثل أشعة الليزر فقد تتسبب بتحطم الجزيئات وتكوين الجذور الحرة وبالتالي تثبيط الخلية وقد تسبب في ظروف أخرى تحفز الخلية على النمو . أما الأشعة تحت الحمراء وخاصة البعيدة والمتوسطة فإمتصاصيتها من الخلايا تكاد تكون معدومة وهي أيضاً لا تتسبب بإحداث تفاعلات كيميائية بسبب أن طاقتها واطئة في حين يقتصر تأثيرها في إحداث تأثيرات حرارية بسبب الامتصاصية العالية من قبل جزيئات ماء الخلية الحية . أما الأشعة فوق البنفسجية UV-B فأن لها تأثيرات مهنة كإحمرار الجلد وإلتهاب قرنية العين PHOTOKERATITIS حيث تصل الأشعة فوق البنفسجية UV-B من الشمس إلى الأرض بكميات قليلة جداً ولكنها فعالة جداً في احداث حروق الشمس للجلد erythema ولهذا يعود تسميتها بطيف حروق الشمس . اما الحزمة UV-C تسمى حزم الأشعة المبيدة للجراثيم (germicidle radiation) بسبب فعاليتها في قتل الأحياء المجهرية ولها نفاذية مميزة في الأوساط المادية كالغذاء حيث أستعملت وبنجاح في تعقيم وحفظ الغذاء [8,7] .

البكتيريا (*Bacteria*) :

كائنات واسعة الانتشار في الطبيعة تقطن في مركز بيئي قادر على دعم الحياة ، هناك آلاف الأنواع من البكتيريا تقع في مئات الأجناس ويمكن تصنيف البكتيريا وفق مظهرها الخارجي (مجموعة غرام سالبة وموجبة) كما يمكن تصنيفها حسب حاجتها إلى الأوكسجين (بكتيريا هوائية ولا هوائية) ويمكن تصنيفها حسب مصادر الطـــاقة (بكتيريا تستخدم الضوء للطاقة وبكتيريا تستخدم الحديد والمنغنيز والكبريت وغيرها) وهناك البكتيريا الضوئية اللاهوائية Anacrobic Photobactria البكتيريا الضوئية الهوائية Airobic Photobacteria وهي ذات أشكال مختلفة منها ذات أنماط خيطية المتفرعة والأنماط الخيطية غير المتفرعة ، تسبب البكتيريا أمراضاً عديدة للإنسان والحيوان ، وهي مرضية في الأشخاص الطبيعيين (عدم وجو مناعة) وإنتهازية Opportunistic عمومـــــــاً (في حالة الجروح والحروق) وإنتهازية أحيـــاناً (حالات عدم النضج أو نقص المناعة) وهناك البكتيريا التي تسبب أمراض معدية Diseases infection وهناك التي تسبب إصابات المستترة lateen infectious ، فالبكتيريا مسؤولة عن الكثير من الأمراض مثل إصابات الجروح والتسمم الغذائي والحماة والخناق والجمرة الخبيثة وغيرها الكثير من الأمراض وتعد البكتيريا أكثر الأحياء المجهرية ضرراً وأمرضية بالانسان . أن بكتيريا E.coli من أشهر الأمثلة المعروفة عن البكتيريا المعوية كما انها من أكثر الكائنات المجهرية التي تمت دراستها بصورة شاملة . يسبب هذا الكائن إلتهابات القناة البولية والاسهال وإلتهاب السحايا [10,9] .

الاجهزة والادوات والمواد

1- الأجهزة المستخدمة:

جدول (1-1) الاجهزة المستخدمة في قتل البكتريا

الجهاز	الشركة المصنعة	المنشأ
1- ميزان ألكتروني	Sartorius	ألماني
2- الموصدة (الأوتوكليف)	Takizawa	ياباني
3- فرن كهربائي	Memmert	ياباني
4- حاضنة	Heraeus	ألماني
5- الجهاز المولد للأشعة فوق البنفسجية	Heraeus	ألماني
6- سخان حراري	-	ألماني
7- ليزر النتروجين	-	بلاروسيا

2-- المواد المستعملة:

جدول (1-2) المواد المستخدمة في قتل البكتريا

المواد المستعملة	المنشأ	الشركة
1- ماكونكي أكار	إنكليزي	Oxoide
2- كلوريد الصوديوم	إنكليزي	Oxoide
3- كحول أثيلي	إنكليزي	Oxoide
4- أكار-أكار	إنكليزي	Oxoide
5- ماكونكي بروث	إنكليزي	Oxoide

3-الأدوات المستعملة :

جدول (1-3) الادوات المستخدمة في قتل البكتريا

الأدوات
1- أنابيب إختبار زجاجية مختلفة الاحجام
2- بيكرات زجاجية
3- دوارق زجاجية
4- ماصات زجاجية
5- قطن
6- حامل
7- أطباق بلاستك أو زجاجية
8- قضبان

تهيئة العينات للتشعيع :

1. نقل وحفظ البكتيريا :

أستعملت بكتيريا Escherichi.coli المتوفرة في مختبر الأحيـــــاء المجـــــهرية نقلت من وسط يحتوي على البكتيريا (تم عزلها سابقا) إلى ماكونكي – أكار Mackonky – Agar تحت ظروف معقمة وحضنت بدرجة 37مْ ومدة (48 – 24) ساعة وبعد نمو وظهور المستعمرات تم حفظها في الثلاجة لحين إستعمالها للتشعيع ، أجريت عملية النقل وذلك بأخذ مسحة من سطح المزرعة البكتيرية بواسطة الشراج (loop) بعد ذلك تم الزرع للبكتيريا بطريقة التخطيط (streaking).

2. تحضير الوسط المغذي :

وضع 51.5 غم ماكونكي – أكار في لتر ماء مقطر رُج الخليط حتى يتجانس وبعدها وضع على الصفيحة الكهربائية الساخنة حتى يغلي (يتجانس) بعدها وضع في الموصدة (الأوتوكليف) للتعقيم (على درجة حرارة 121مْ وضغط 15 باسكال مدة 15 دقيقة) بعدها يبرد ثم يصب في أطباق ويترك حتى يتصلب .

3. تحضير المحلول الفسيولوجي :

وضع 0.9 غم من ملح كلوريد الصوديوم في 100سم^3 من الماء المقطر ورُج حتى ذاب وبعدها عقم في الموصدة (على درجة حرارة 121مْ وضغط 15باسكال مدة 15 دقيقة) .

4. تعقيم أنابيب الاختبار والماصات والبيكرات في الفرن على درجة حرارة 180مْ مدة 90 دقيقة .

تحضير البكتيريا لغرض التشعيع :

1- تم سكب 9سم^3 من المحلول الفسيولوجي المعقم في كل أنبوب من أنابيب الاختبـــــار.

2- أجري نقل 1سم^3 من المحلول الفسيولوجي في أنبوبة إختبار منفصلة بالبكتيريا E.coli وذلك بواسطة الشراج (loop) ورُج المحلول جيداً لضمان توزيع البكتيريا بشكل متجانس وهو جاهز للتشعيع

3- أخذ 1سم^3 من المحلول الفسيولوجي في أنبوب الاختبار الذي تم نقل البكتيريا فيه في الفقرة (2) ويوضع في أول أنبوبة إختبار التي تم تحضيرها في الفقرة (1) يصبح الحجم 10 سم^3 ورُج أيضاً وتستمر العملية لكل الانابيب .

4- ناخذ ما يقارب 0.2م^3 من الأنبوب الأخير والذي قبله احياناً ويتم زرعه في أطباق الوسط المغذي Nutreniet Agar وذلك لحساب أعداد البكتيريا الحية قبل التشعيع وقد حسب عدد البكتيريا في الأنبوب الأصلي وفي كل تجربة تشعيع ليزرية

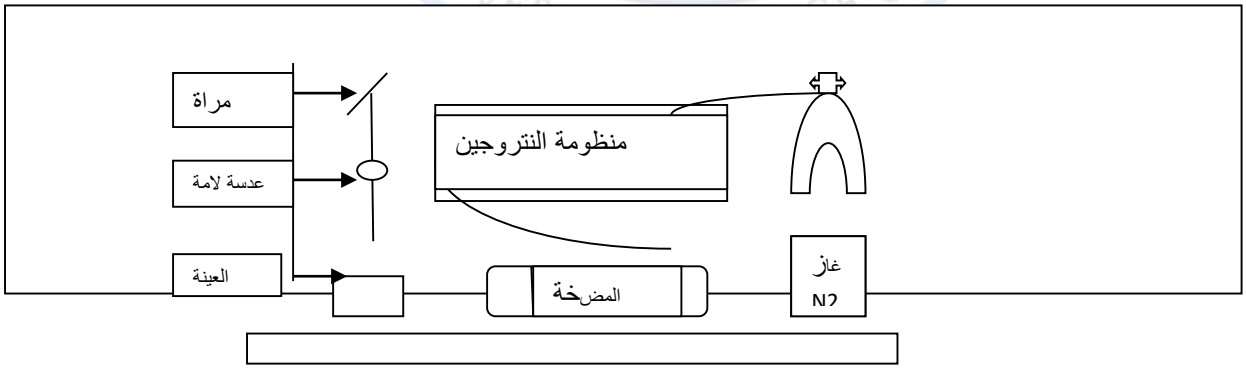
5- أجري تشعيع العينات بالليزر .

6- بعد التشعيع سكب ما يقارب 0.2سم^3 في اطباق الوسط المغذي الصلب ونشر جيداً على السطح ثم تم حساب أعداد المستعمرات بعد 24 ساعة في الحاضنة وذلك لغرض حساب أعداد البكتيريا التي بقيت حية بعد التشعيع .

التشعيع بالليزر النتروجين :

يمتاز هذا الليزر بان له معامل كسب عالي بحيث تنفي الحاجة الى استعمال مرنان واحيانا يكفي وضع مراة واحدة في احد طرفي قناة الليزر يعمل هذا الليزر بطول موجي 333.1 نانو متر وبطاقة نبضة 150 مايكروجول .

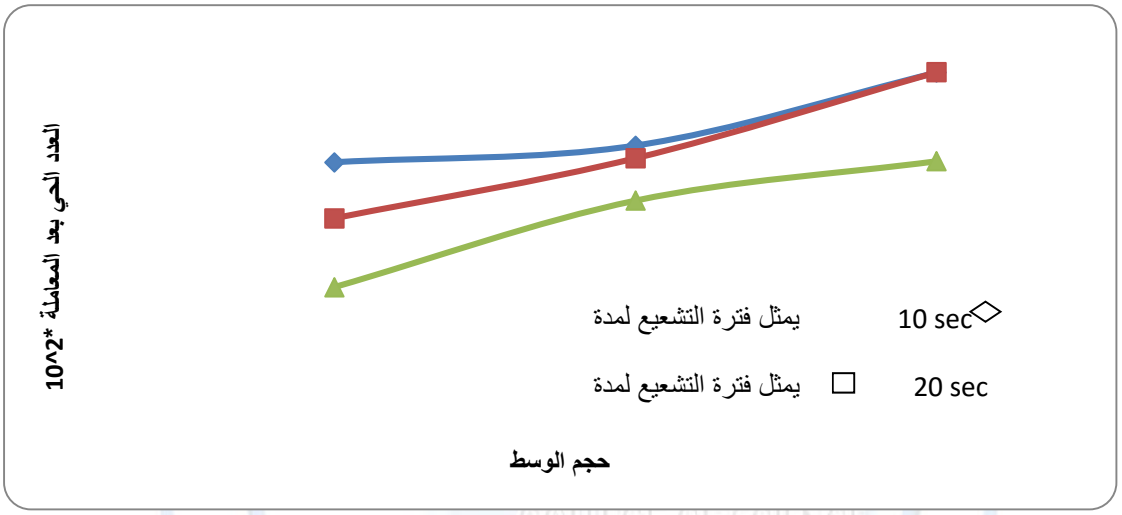
1. تم تركيب الجهاز عمودياً وذلك ليسقط الشعاع مباشرة على العينة كما هو واضح في الشكل (1-1) يمثل مخطط التشعيع
2. تم إستعمال عدسة لامة 15 سم لأن قطر الاشعاع كان صغير والعينة وضعت قريباً جداً من فتحة خروج الليزر مع مرايا.
3. أستعملت ثلاث أحجام من المحلول الفسيولوجي الملوث (0.1 , 0.2 , 0.3)سم .
4. عرضت العينات للتشعيع بالليزر فترات(10,20,30) دقيقة .
5. تم وضع أنابيب الاختبار داخل قطعة من الفلين تستعمل كماسك جيد وحفظ العينة من المؤثرات الخارجية كالحرارة .
6. بعد التعريض لليزر بالمتغيرات أعلاه تم زرع العينات في الوسط المغذي الصلب وحضنت في الحاضنة مدة 24 ساعة تحت درجة حرارة 37مْ .
7. تم حساب المستعمرات البكتيرية في الأطباق حيث تمثل كل مستعمـــــــرة بكتيرية واحدة .



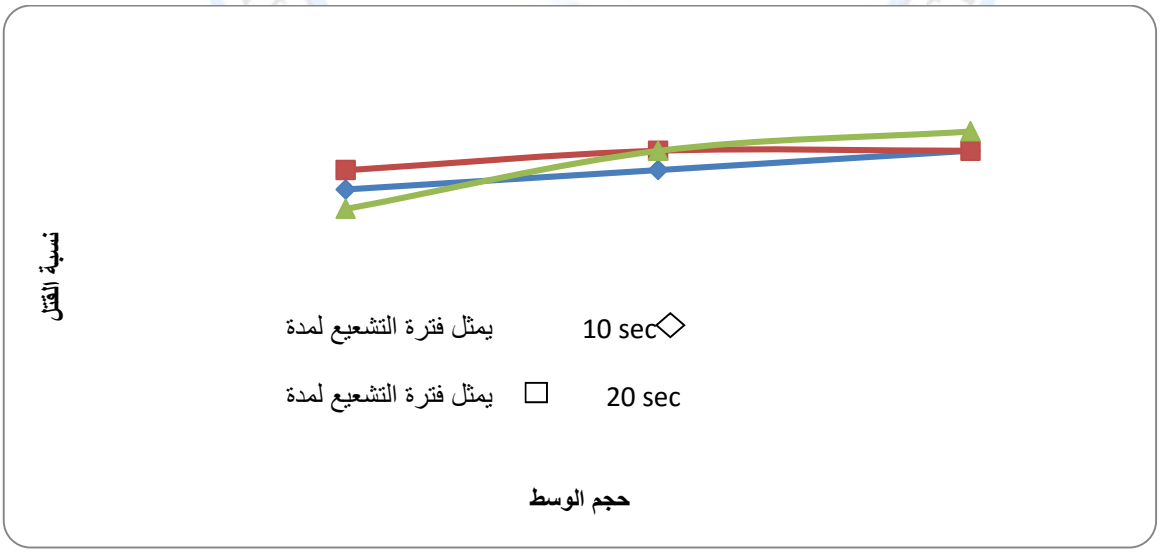
الشكل (1) التشعيع بليزر النتروجين

مناقشة النتائج

اظهرت نتائج التشعيع كما في الشكل (1) لليزر النتروجين لعينة من ماء البئر تناقصا واضحا لاعداد البكتريا اذ كان عددها قبل التشعيع 1.19×10^8 خلية / سم^3 ويلاحظ اعلى نسبة تناقص للبكتريا في فترة 30 دقيقة لحجم وسط 0.3 سم ^{3} حيث وصلت الاعداد الى 8.590×10^2 خلية /سم3 وكذلك ارتفاع نسبة القتل في الشكل (2) ليصل اعلاه في فترة التشعيع 30 دقيقة لتصل نسبة القتل الى 100%.

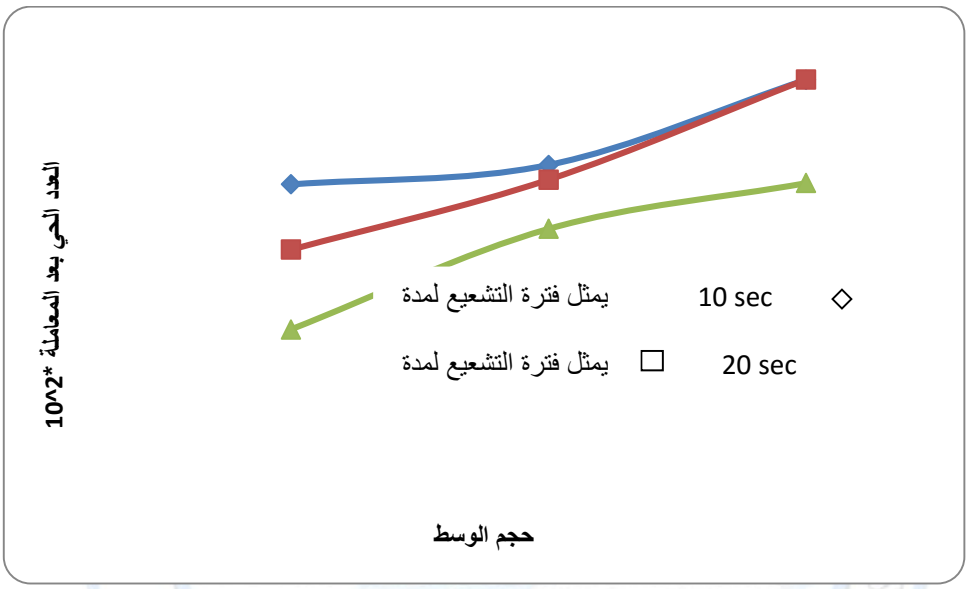


الشكل رقم (1) يمثل العدد الحي للبكتريا بعد المعاملة بليزر النتروجين لعينة من ماء بئر

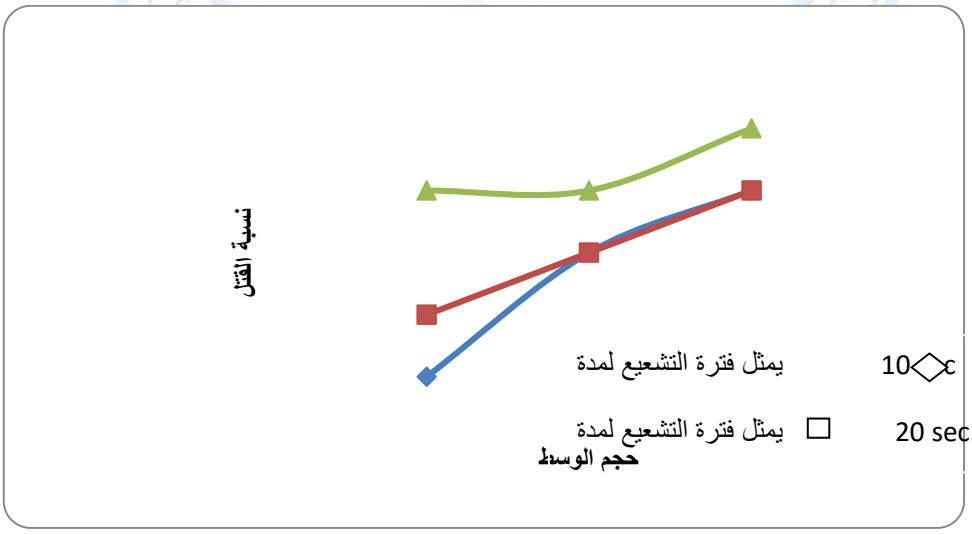


الشكل رقم (2) يمثل نسبة القتل للبكتريا لعينة من ماء بئر

اظهرت نتائج التشعيع كما في الشكل (3) لليزر النتروجين لعينة من ماء النهر تناقصا واضحا لاعداد البكتريا اذ كان عددها قبل التشعيع 2.4×10^8 خلية / سم^3 ويلاحظ اعلى نسبة تناقص للبكتريا في فترة 30 دقيقة لحجم وسط 0.3 سم ^{3} حيث وصلت الاعداد الى 9.21×10^2 خلية /سم3 وكذلك ارتفاع نسبة القتل في الشكل (4) ليصل اعلاه في فترة التشعيع 30 دقيقة لتصل نسبة القتل الى 100%.



شكل رقم (3) يمثل اعداد البكتريا بعد التشعيع بليزر النتروجين لعينة من ماء النهر



الشكل رقم (4) يمثل نسبة قتل البكتريا بعد المعاملة بليزر النتروجين لعينة من ماء نهر

الية القتل بالليزر النيتروجين :-

ان الية القتل بهذا الليزر تختلف اختلافا جذريا عن باقي الليزرات ولتوضيح الية موت الميكروب بالأشعة فوق البنفسجية يجب تحديد حزمة التشعيع فإذا كانت الأشعة فوق البنفسجية منتمية الى حزمة UV-C فأنها تؤثر بشكل مباشر على DNA الخلية وتسبب اضرار قاتلة حيث تسبب بتفاعلات ضوء-كيميائية تنتهي بتكوين برميدين دايمر pyrimidine dimersوثايمن دايمر thymine dimers وغيرها وهي وحدات تكوين DNA الخلية وضررها تسبب تلف عمل DNA الخلية .وقد يكون التأثير مباشر وغير مباشر اذا انتمت الاشعة فوق البنفسجية الى حزمة UV-A كما في ليزر النيتروجين والذي يتطلب تأثيره حدوث تفاعلات ضوء-كيميائية تتوسطها كروموفورات داخل خلوية endogenous sensiter قادرة على امتصاص طاقة الاشعة فوق البنفسجية وتكوين جذور نشطة كالأوكسجين الأحادي والذي يعمل على أكسدة الدهون وتحليل الغشاء البلازمي والإخلال بنفاذيتة .[12,11]

كما يمكن للجذور الحرة مثل بيروكسيد الهيدروجين مهاجمة DNA الخلية وتكسير أواصره المكونة له ، كما وجد الباحث Hollacnder عام 1943 ان الاشعة فوق البنفسجية المنتمية الى الحزمة UV-A قادرة على التأثير على DNA الخلية وبشكل مباشر كما في الحزمة UV-C الا انه وجد ان طاقة حزمة UV-Aيجب ان تكون اكبر ب 10,000 مرة من حزمة UV-C لأحداث نفس التأثير القاتل على DNA الخلية .كما تؤثر اشعة النيتروجين على انظمة اصلاح DNA repair proccsscs الخلية حيث تكون متحسسة لهذه الحزمة اكثر بكثير من الحزمة UV-C من الاشعة فوق البنفسجية وخاصة بكتيريا E.coli ويمكن تثبيط خلايا بكتيريا E.coli بتسليط حزمتين UV-cاو UV-A حتى يتم قتلها بشكل نهائي .

كماوتؤثر على DNA الخلية بشكل مباشر بتحطيم وكسر السلاسل المفردة single-strand DNA الخلية كذلك تؤثر الحزمة في عملية الايض الخلوي بأحداث تغييرات وتفاعلات تكون مثبطة .

كذلك تؤثر الحزمة ذاتها على RNA الخلية وذلك بتكوين 4-thiouracil ان الجرعة المطلوبة لتثبيط DNA الخلية اقل بكثير من RNA الخلية على عموم انواع الميكروبات .[13]

الاستنتاجات

1. أكدت نتائج عمليات التشعيع بليزر النتروجين التاثير الكبيرعلى البكتريا ويترجم هذا التاثير بتناقص الأعداد الحية مع زيادة الجرعة أو فترة التعريض.

2. تفوق طريقة التعقيم بليزر النتروجين في قتل البكتريا وامكانية الحصول على نسبة قتل 100% اذ ما قورن بالطرق الاخرى للتعقيم .

References

1. Celesk RA, McCabe RM, London J. ″ Colonization of the cementum surface of teeth by oral Gram-negative bacteria″. Vol.14,No.22, (1997).

2. Chan Y, Chien, laser med sin.J ″Bactericidal action of diode laser radiation in periodontal pockets″. Proceedings 4th Int'l Congress on Lasers in Dentistry″Vol. 185-190 No.55,(1998).

3. Cobb, CM, McCawley TK, Killoy ,Biology effect .J ″A preliminary study on the effects of the diode laser on root surfaces and microflora *In Vivo*″ vol.13,No.123,2003

4. Gutknect, N, Fischer J, Conrads G, Lampert London J.″ Bactericidal effects of the diode lasers in laser supported curettage″. Vol.11,No.87,2005.

5.Hardee, MW, Miserendino LJ, Kos W, Walia Endodont J. ″ Evaluation of the antibacterial effects of intracanal diode laser irradiation″. Vol.30(8)No. 377-380.2002

6. Harris DM, Loomer PM physics sinses J. ″ Ablation of *Porphyromonas gingivalis in vitro* with dental lasers″. Vol.24,No.102,2010.

7. Klinke T, Klimm W, Gutknecht , Laser Med Surg J ″ Antibacterial effects of diode laser irradiation within root canal dentin. Vol.40(1),No.29-31. (2004).

8.Lamont RJ, Jenkinson HF Microbiol Mol Biol J. ″ Life below the gum line: Pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivali"s*. Vol.70(4)No. 44-63.2006

9.Lin P, Rosen S, Beck FM, Matsue M, Horton . Dent Res J. ″ A comparitive effect of the diode laser with root planing on subgingival anaerobes in periodontal pockets″. Vol.71:299,No.565,2012.

10.Moritz A, Gutknecht N, Doertbudak O, Goharkhay K, Schoop U, Schauer P, Sperr W ,Clin Laser Med SurgJ. ″Bacterial reduction in periodontal pockets through irradiation with a diode laser″: Vol. 100(25)No.33-37,.2009.

11. Moritz A, Jakolitsch S, Goharkhay K, Schoop U, Kluger W, Malinger R, Sperr W,eorgopoulos Lasers Surg Med .J″Morphologic changes correlating to different sensitivities of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* to diode laser irradiation through dentin″.Vol., 82,No. 250-261,2009.

12. Ramskold LO, Fong CD, Stromberg ,EndodontJ. ″ Thermal effects and antibacterial properties of energy levels required to sterilize stained root canals with an diode laser″Vol. 23(2),No.96-100,2010.

13. Gutknecht, N., Moritz, A., Conrads, ,London J.″The diode

laser and its bactericidal effect in the root canal″. An *in vitro* study.Endodontics ,Vol.3, No.217–222,2013