عزل وتشخيص عزلة محلية من بكتريا *Erwinia caratrovora* spp. AH88 وأختبار انتاجيتها لانزيم L- Asparginase

أنفال خالد فيصل حميد عبود جبر

الملخص

أمكن في هذه الدراسة الحصول على 15عزلة نقية من البكتريا العصوية من بين اكثر من 100 عزلة تم الحصول عليها من مصادر مختلفة شملت مزارع البطاطا في كلية الزراعة –جامعة بغداد ومزارع واسواق ومخازن البطاطا في ابي غريب، وتميزت هذه العزلات بتكوينها مستعمرات واضحة منتشرة ذات سطح جلدي لماع ولون ابيض مائل للاصفر،عصوية وسالبة لصبغة كرام. اجريت عملية الغربلة الاولية والثانوية لانتقاء العزلات المتميزة منها بإنتاج انزيم Asparaginase، وكانت العزلة A 88 هي الاكثر تمييزاً من بين تلك العزلات في انتاج الانزيم، إذ بلغت الفعالية الانزيمية فيها 52.7 وحدة/مل والفعالية النوعية 8 ملغم/مل مقارنة باقل فعالية انزيمية للعزلةٍ A 73 التي اعطت فعالية انزيمية بلغت 33.4 وحدة/مل وفعالية نوعية بلغت 4.3وحدة/ملغم.تم اجراء بعض الفحوص التشخيصية المورفولوجية والبايوكيميائية للعزلة A88 لمعرفة عائديتها. فوجد انها تعود الى بكتريا *Erwinia carotovora* واعطي لها الرمز AH88، وسميت في الدراسات اللاحقة *Erwinia carotovora* ssp. AH88 .

المقدمــة

يعود جنس بكتريا *Erwinia* الى العائلة المعوية *Enterobacteriaceae*، إذ تتميز هذه البكتريا بأنها عصويه مستقيمة ابعادها تصل الى 0.3×2مايكروميتر، وسالبة لصبغة كرام يمكنها العيش تحت ظروف هوائية ولا هوائية، لاتكون الابواغ ،معظم انواعها متحركة بأسواط محيطية، توجد خلاياها منفرده او بهيئة ازواج، تغذيتها كيميائية عضوية، والبعض منها ينتج صبغات، الحراره المثلى لنموها هي 28°م ومحتوى مادتها الوراثية من GC يصل الى 50-80 % (33).يضم جنس هذه البكتريا أنواعا ممرضة للنبات منها بكتريا *Erwinia amylovora* التي تسبب اللفحه النارية fire blight للتفاح والاجاص (32)، وبكتريا *Erwinia carotovora* ، التي تسبب التعفن الطري في الجزر والبطاطا وغيرها من الخضراوات (31، 35). تكمن القدرة الامراضية لبكتريا *Erwinia* في افرازها انزيمات خارجية قادرة على تحليل مكونات جدار الخلايا النباتية (22). كما تتميز بكتريا *Erwinia* بقابليتها على انتاج مجموعة من الانزيمات مثل Pectinase، Cellulases وProtease وهي المسؤولة عن تحطيم جدار الخلايا النباتية المحتوية على مواد بكتينية وبروتينية التي تساعد في نمو وتضاعف البكتريا (19). الى جانب تلك المجموعة من الانزيمات فقد اشارت العديد من الدارسات الى امكانية بكتريا *Erwinia* من انتاج انزيم L-asparaginase (7).ينتمي انزيم الاسبارجنيز L-asparaginase إلى مجموعة إنزيمات التحلل المائي Hydrolysis(L-asparagine amidohydrolase (EC 3.5.1.1)، ويعمل الإنزيم في وجود الماء على تحليل الحامض الأميني L-asparagine إلى حامض أسبارتيك وأمونيا (23).وتبرز الأهمية الطبية والتغذوية لهذا الانزيم في امكانية استخدامه علاجا مضادا لمرض السرطان خصوصا سرطان الدم (اللوكيميا)، إذ لوحظ ان الخلايا السرطانية تحتاج في نموها الى الحامض الاميني Asparagine وبما ان انزيم Asparaginase يقوم بخفض

جزء من رسالة ماجستير للباحث الاول

كلية الزراعة– جامعة بغداد – بغداد، العراق

مستوى الاسبارجين في بلازما الدم عن طريق تحويله الى حامض الاسبارتيك والامونيا، لذا فهو يقلل من جاهزية الاسبارجين للخلايا السرطانية، مما يؤدي الى كبح نموها (27،23)، كما لاحظ العلماء ان مرض **lymphoma** في الجرذان والفئران قد تراجع وجوده بعد المعاملة بمصل دم خنازير غينيا الحاوي على انزيم الاسبارجنيز، وبعد عمليات البحث والمقارنه بين انواع مخلتفة من انزيم الاسبارجنيز، فقد تبين ان نوعاً واحداً مشتق من ***Escherichia coli*** و***Erwinia chrysanthemi*** اصبح الاحسن قدرة كمضاد لمرض السرطان، كما ان بكتريا ***E.coli*** أصبحت المصدر الرئيس لانتاج انزيم الاسبارجنيز بكميات كبيرة (4)، في حين اصبح الانزيم المنتج من بكتريا ***Erwinia*** مصادقاً عليه في بريطانيا علاجا مضاداً لمرض السرطان ويباع بأسم تجاري هو **Erwinaze** (6). أما النبات فان للانزيم دوراً مهماً في عمليات الأيض للنتروجين وبناء البروتين النباتي (17). وفي مجال الصناعات الغذائية فان الانزيم يؤدي دوراً مهماً في خفض تركيز مادة الاكريلامايد السامة التي تتكون في الاغذية النشوية التي تتعرض الى المعاملات الحرارية العالية. فقد اشارت دراسة أجريت في السويد في عام **2002** ان الاغذية النشوية **Starchy food** التي تتعرض للمعاملات الحرارية العالية تتكون فيها مادة الاكريلاميد ناتجا عرضيا لتفاعلات ميلارد التي تحصل بين الحامض الاميني الاسبارجين والسكريات المختزلة (**20،26،30،36**). ومن ابرز الاغذية التي تعَد مصادر لتكوّن الاكريلاميد هي البطاطا المقلية على شكل اصابع **Finger chips** أو بشكل أقراص أو شرائح و بعض منتجات الحبوب والقهوة (**5**). لذلك فقد اشار **Hendriksen** وجماعته (**12**) الى أن استخدام انزيم الاسبارجينيز مضافاً غذائياً في الانظمة الغذائية النشوية التي تتعرض للمعاملات الحرارية العالية يقلل من مستوى الاكريلامايد بنسبة **90%** دون أن يؤثر في مظهر وطعم المنتوج النهائي .

لذلك فقد هدفت هذه الدراسة الى الحصول على عزلة محلية من بكتريا ***Erwinia* sp.** قادرة على إنتاج انزيم الاسبارجينيز لاستخدامه في مجال الصناعات الغذائية، لاسيما في صناعة بعض المعجنات.

المواد وطرائق البحث

مصادر العزل

جمعت عينات من درنات بطاطا مصابة ، يشك في أنها اعراضاً لمرض التعفن الطري، من حقول البطاطا في كلية الزراعة وحقول واسواق ومخازن بطاطا في ابي غريب.

الاوساط المستخدمة

الوسط الانتخابي (CVP) Crystal Violet Pectate Medium

حضر مباشرة وذلك بأتباع ارشادات الشركة **Himedia**، واستخدم هذا الوسط واسطاً انتخابياً **Selective media** لغرض عزل البكتريا ***Erwinia*** (**14**) .

وسط الاسبارجين السائل Asparagine Broth

استخدم وسط **M- 9** المحور (**pH 7.0**)، واستخدم هذا الوسط لغرض العزل والكشف النوعي عن انزيم الاسبارجنيز(**8**).

وسط الاسبارجين الصلب

حضر هذا الوسط من مكونات وسط الاسبارجين السائل نفسه المذكور في الفقرة السابقة مع اضافة الاكار الصلب **Agar** الى الوسط وبنسبة **2%**. استخدم الوسط لمعرفة كفاءة العزلات البكتيرية على انتاج انزيم **L-asparaginase** بدلالة قطر الهالة المحيطة بالمستعمرة (**8**) .

العزل

تضمنت عملية العزل غسل درنات البطاطا التي تم جمعها بالماء المقطر المقطر المعقم مرات عدة وتم تقطيعها الى قطع صغيرة بطول من **0.5 –1**سم. غسلت بالماء المقطر عدة مرات وجففت على ورق ترشيح معقم. سحقت القطع في كمية من الماء المقطر في طبق بتري معقم. اخذ جزء من المعلق الناتج بواسطة ابرة التلقيح **(Loop)** ولقح به بطريقة تخطيط الوسط الزرعي المغذي (**CVP**) المحضر في أعلاه. حضنت الاطباق الملقحة في حاضنة بدرجة حرارة **28 ± 2**ْم لمدة **48**ساعة.

الغربلة الاولية (شبه الكمية)

الزرع على الوسط المغذي السائل

نشطت العزلات البكتيرية قيد الدراسة باستخدام الوسط **Nutrient broth** ، وحضنت الدوارق بدرجة **28** ^{o}م مدة **24** ساعة ثم اخذ **1** من هذا اللقاح (الحاوي على **3 ×10**^{6} من وحدة تكوين مستعمرة/مل) من كل عزلة واضيف الى دوارق حاوية على **50**مل من الاسباراجين السائل المحضر في أعلاه وحضنت الدوارق بدرجة **28** ^{o}م مدة **24** ساعة في حاضنة هزازة، ثم حددت المستعمرات المنتجة للانزيم من خلال ملاحظة تغير لون الوسط من الاحمر الى الأصفر الذي عدَ مؤشرا على قابلية البكتريا قيد الدراسة على انتاج الانزيم (**8**).

الزرع على وسط الاسبارجين الصلب

لغرض التاكد من نتائج الخطوة السابقة لقح وسط الاسبارجين الصلب المحضر أعلاه بطريقة التخطيط **streaking** بالعزلات المنتحبة وحضنت الاطباق على حرارة **28** م مدة **24**ساعة. تم تمييز المستعمرات التي كونت هالة لونية وتم احتساب قطر الهالة الذي اتخذ معيارا على كفاءة العزلة في انتاج الانزيم في مرحلة الغربلة الاولية (**8**).

الغربلة الثانوية (الغربلة الكمية)

استخدمت الاوساط والمواد التالية في هذه المرحلة وهي:

وسط YMA السائل

حضر هذا الوسط بأذابة المكونات التالية في **100** مل من الماء المقطر : (**1.7 yeast extract** غم ، **1.1 Maltose**غم ، **0.19 L-aspargine** غم)، حيث استخدم هذا الوسط لغرض انتاج الانزيم في مرحلة الغربلة الثانوية (**34**).

تحضير اللقاح البكتيري

نقلت مستعمرات من وسط حفظ العزلات المحضر وفق أعلاه وجرى تنشيطها على الوسط الزرعي **Nutrient broth** بعد الحضن في **28** مْ مدة **24** ساعة . استخدم هذا اللقاح (الحاوي على **3x 10** ^{6} من وحدة تكوين مستعمرة / مل) لانتاج الانزيم واجراء بعض الاختيارات الخاصة بتشخيص العزلة .

انتاج واستخلاص الانزيم

لقحت العزلات البكتيرية في الوسط السائل **YMA** المحضر وفق ماذكر أعلاه وحضنت الدوارق بدرجة حرارة **28** ^{o}م مدة **24** ساعة بحاضنة هزازة بسرعة (**180** دورة/دقيقة). فصلت الكتلة الحيوية من وسط النمو بالنبذ المركزي المبرد وعلى سرعة (**5000** دورة / دقيقة) مدة **20** دقيقة وعلى درجة حرارة **4**^{o}م ، تم التخلص من الرائق، اما الراسب الذي يمثل الخلايا الكاملة فقد تم غسلها بالماء المقطر بحجم يعادل حجم وسط الانتاج (**50**مل) ونبذت مركزيا تحت نفس الظروف المذكورة آنفاً .كررت هذه العملية مرتين وتم التخلص من الرائق وعلق الراسب في كمية من دارئ الفوسفات (**pH=7**)، وعرضت الى الذبذبات فوق الصوتية **Ultrasonication** مدة ساعة كاملة، اجريت بعدها عملية طرد مركزي واخذ الرائق الحاوي على الانزيم وأهمل الراسب الحاوي على بقايا الخلايا المتكسرة، اخذ الرائق الذي يمثل مستخلص الانزيم الخام الى انابيب اختبار نظيفة لتقدير الفعالية الانزيمية (**34**).

تقدير الفعالية الانزيمية

المواد

المحلول الخزين لكبريتات الأمونيوم بتركيز(10mM)

حضر بإذابة **132** ملغم من كبريتات الأمونيوم في **100** مللتر من الماء المقطر، وتم تحضير تراكيز متدرجة منه من **1 – 10** ملي مول.اجري تفاعل النسلرة المباشرة حسب الطريقة التي ذكرها **Imada** وجماعتة (**14**) وتم قياس الامتصاصية على طول موجي **425** نانوميتر بجهاز **Spectrophotometer** مجهز من شركة **LKB** السويدية. تم عمل المنحنى القياسي من هذه المحاليل. استخدم هذا المنحنى لتقدير فعالية انزيم الاسبارجينيز في المستخلصات الانزيمية.

محلول مادة التفاعل (0.1mM L-asparagine, pH 8.6)

حضر بإذابة **0.66** ملغم من الحامض الأميني أسبا راجين **(L-asparagine)** في **50** مللتر من دارئ الترس تركيز **0.01** مولاري و **pH** مقداره **8.6** استخدم هذا المحلول كمادة تفاعل عند تقدير الفعالية الانزيمية.

طريقة قياس فعالية الانزيم

تم تقدير فعالية الاسبارجينيز عن طريق تقدير تركيز الامونيا في نماذج المستخلصات الانزيمية بواقع مكررين لكل عينة، وذلك بمزج **0.1** مل من محلول مادة التفاعل المحضر في اعلاه مع **0.1** مل من المستخلص الانزيمي و**1**مل من محلول الترس ذو الرقم الهيدروجيني **8.6** مع **0.9** مل من الماء منزوع الايونات. مزج الخليط جيدا باسخدام جهاز المازج **(Vortex)**، وحضن المزيج على **37** مْ مدة **30** دقيقة . تم ايقاف التفاعل بأضافة **0.1** مل من **TCA** تركيزه **1.5** مولار. اضيف كاشف نسلر، وترك مدة **5** دقائق بعد ذلك تم قراءة الامتصاصية بطول موجي **425** نانوميتر. اما عينة محلول الكفئ **(Blank)** فحضرت تحت نفس الظروف، الا انها عوملت بأضافة **TCA** قبل اضافة المستخلص الانزيمي وقيست الامتصاصية بنفس الاسلوب (**34**). قدرت الفعالية الانزيمية بالاستعانة بالمنحنى القياسي لتقدير الامونيا .

عرفت وحدة الفعالية الانزيمية (**Unit/ml**) بانها كمية الانزيم التي تحرر **1**مايكرمول من الامونيا في الدقيقة الواحدة تحت ظروف الاختبار.

تقدير البروتين

اتبعت طريقة Bradford (2) في تقدير تركيز البروتين، وحضر منحنى قياسي من محلول البومين المصل البقري Bovine Serum Albumin(BSA) وبتراكيز متدرجة تراوحت من 0– 10ملغم/مل وتم الاستعانة بهذا المنحنى لتقدير كمية البروتين في مستخلص الانزيم الخام المنتج في العمليات التخمرية.

تشخيص العزلة

الفحوصات المظهرية والمزرعية

لقح الوسط Nutrient Agar بالعزلة النقية للبكتريا والتي تميزت بكفائتها العالية لانتاج انزيم L-asparaginase وحضنت بدرجة حرارة 28ْ م تمت متابعة النمو خلال 24 ساعة ودرست طبيعة النمو على الوسط الصلب من حيث شكل المستعمرات ولونها ومعرفة مدى استجابتها لصبغة كرام ، كما فحصت حركتها Motility بطريقة القطرة المعلقة Hanging drop (9).

الاختبارت الفسلجية والكيموحيوية

شملت هذه الاختبارات على فحص الاوكسديز والكاتليز (24)وفحص الكاتليز وفحص اختزال النتريت وانتاج غاز كبريتيد الهيدروجين وانتاج الحوامض من تخمر السكريات (9)وفحص قابلية العزلة على تحلل الجلاتين وفق ماذكره (29) وفحص مقدرة العزلة على على النمو في وسط CVP وانتاج النزيم البكتينيز.

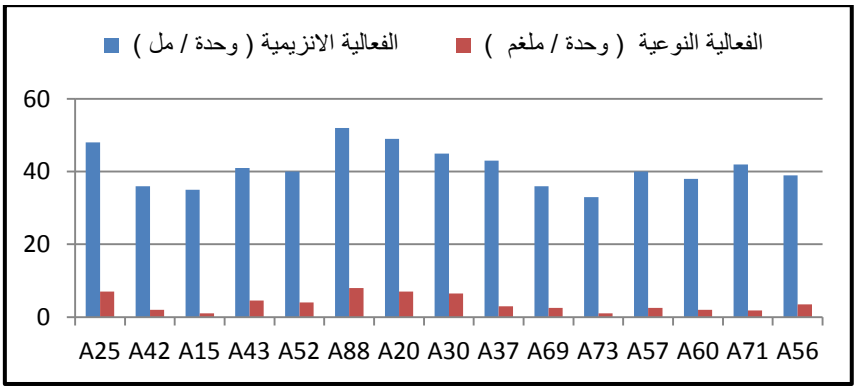
النتائـج والمناقشـة

تم الحصول في هذه الدراسة على 15 عزلة نقية من البكتريا العصوية من بين 100عزلة تم الحصول عليها من مصادر عدة مختلفة شملت مزارع البطاطا في كلية الزراعة – جامعة بغداد ومزارع واسواق ومخازن البطاطا في ابي غريب. اذ تمت تنميتها على الوسط الانتخابي CVP الحاوي على البكتين والمحضر وفق ما ذكر انفاً، وتميزت هذه العزلات بتكوينها مستعمرات واضحة منتشرة ذات سطح جلدي لماع ولون ابيض مائل للاصفر وسالبة لصبغة كرام. أعيد تنمية العزلات على الوسط الاسبارجين السائل المحضر، إذ لوحظ تغير لون الوسط من اللون الاحمر الى اللون الاصفر نتيجة لتغيير الرقم الهيدروجيني للوسط نحو القاعدية بسبب تحول الاسبارجين الى الامونيا بفعل انزيم Asparaginase، واتخذت هذه الصفة معياراً للعزل الاولي للعزلات القادرة على انتاج الانزيم، وعند اعادة زرع تلك العزلات على وسط الاسبارجين الصلب، فقد لوحظ ظهور هالات لونية حول المستعمرات تراوح معدل اقطارها بين 5–28ملم (جدول 1). توضح هذه النتائج قابلية تلك العزلات على انتاج انزيم الاسبارجينيز وتحرر الامونيا التي تجعل الوسط قاعدياً فيتغير لون كاشف الفينول الاحمر الى اللون الاصفر (21).

جدول 1: قطر الهالة المتكونة من العزلات المنتجة لانزيم Asaraginase في مرحلة الغربلة الاولية

العزلة	قطر الهالة اللونية (ملم)	العزلة	قطر الهالة اللونية (ملم)
A 88	28	A 60	16
A 20	27	A 22	13
A25	27	A 70	10
A 30	25	A 69	8
A 37	24	A 42	7
A 43	23	A 15	6
A 52	20	A 73	5
A 57	17		

خضعت تلك العزلات المتميزة في انتاج انزيم الاسبارجينيز الى مرحلة الغربلة الثانوية بتنميتها في الوسط **YMA** السائل لانتاج الانزيم بطريقة تخمرات المزارع المغمورة. فصلت الخلايا واستخلص الانزيم وتم تقدير الفعالية الانزيمية ومحتوى البروتين في المستخلص. لوحظ تفوق العزلة **A88** بانتاجيتها للانزيم مقارنة مع بقية العزلات قيد الدراسة، إذ بلغت الفعالية الانزيمية **52.7** وحدة/مل والفعالية **8** وحدة/ملغم مقارنة ببقية العزلات التي تراوحت الفعالية الإنزيمية فيها بين **33.4** و**49.1** وحدة/مل والفعالية النوعية بين **1.1** - **7.1**وحدة/ملغم، شكل (**1**).لذلك فقد وقع الاختيار على هذه العزلة لإكمال الدراسة عليها.



شكل **1**: انتاجية عدد من عزلات البكتريا لمنتجة لانزيم **Asparaginase** مقدرة على اساس الفعالية الانزيمية (وحدة/مل) والفعالية النوعية (وحدة/ملغم) في مرحلة الغربلة الثانوية .

اخضعت العزلة **A88** لمجموعة من الاختبارات المظهرية والمزرعية فضلا عن اجراء بعض الفحوص الفسلجية والبايوكيميائية لغرض تشخيص هذه العزلة ومعرفة عائديتها. اظهرت الفحوص المظهرية للعزلة **A88** على وسط العزل الانتخابي **CVP** بأنها تكون مستعمرات ذات لون ابيض مائل للبني دائرية محدبة وغير شفافة، كما أظهرت تلك العزلة على الوسط **Nutrient Agar** تكوّن مستعمرات حافاتها كاملة ومستديرة غير شفافة وذات لون ابيض كريمي ،وعند فحص هذه البكتريا تحت المجهر الضوئي المركب وجد بانها عصوية قصيرة مفردة بهيئة أزواج وسالبة لصبغة كرام ومتحركة (جدول**2**). وتتفق هذه النتائج مع ماذكره **Rajneesh** وجماعته (**25**) حول صفات البكتريا نوع ***Erwinia crotovora***.

جدول **2**: الصفات المظهرية للعزلة **A88** المنتجة لانزيم الاسبارجينيز

الصفـة	الملاحظات
تجمع الخلايا	مفردة او بهيئة ازواج
لون المستعمرات وشكلها على الوسط **CVP**	ابيض مائل للبني ، دائرية ومحدبة وغير شفافة
لون المستعمرات وشكلها على الوسط **NA**	ابيض –كريمي ذات حافة كاملة ،مستديرة ، غير شفافة
شكل الخلايابالمجهر الضوئي المركب	عصوية قصيرة
التفاعل مع صبغة كرام	سالبة
الحركة الذاتية	متحركة

كما أظهرت الاختبارات البايوكيميائية (جدول **3**)، ان البكتريا تمتلك المقدرة على تحلل النشأ، واختزال السكريات الاحادية كالكلوكوز ولها القابلية على استعمال السكريات كالاكتوز، كلوكوز، فركتوز، سكروز كمصدر

كاربوني، كما انها قادرة على تحلل البكتين، وانتاج غاز من الكلوكوز، وتحلل الجيلاتين، وانتاج حامض من اللاكتوز، وانتاج الامونيا، وانتاج كبريتيد الهيدروجين كما وان لها القدرة على انتاج انزيم الاوكسيديز واختزال النترات. وتتفق هذه النتائج مع دراسات سابقة (11، 13، 16، 18، 28) فيما يتعلق بالصفات البايوكيميائية لبكتريا ***Erwinia carotovora***.

جدول 3 :نتائج الاختبارات البايوكيمياوية للعزلة A88 المنتجة لانزيم الاسبارجينيز: (+) النتيجة ايجابية، (−) النتيجة سلبية

الاختبارات	الفحص	النتيجة
الفحوصات البايوكيمياوية	انتاج انزيم الاوكسيديز	−
	انتاج انزيم الكاتليز	+
	اختزال النترات	+
	انتاج انزيم الجيلاتينيز	+
	انتاج انزيم البكتنيز	+
	انتاج غاز H2S	+
	تخمر الكلوكوز	+
	تخمر الفركتوز	+
	تخمر السكروز	+
	تخمر الكالاكتوز	+
	انتاج حامض من سكر الكلوكوز	+

وعند مقارنة نتائج الاختبارات المورفولوجية والبايوكيمائية مع ما متوفر في المصادر العلمية الخاصة مثل (3، 10) تبين بأن العزلة A88 تعود الى بكتريا ***Erwinia carotovora*** وقد اعطيت الرمز AH 88 تمييزا لها، لذلك سميت هذه العزلة ***Erwinia carotovora AH88*** .

ويذكر ان العديد من المصادر اشارت بان بكتريا ***Erwinia carotovora*** تتميز بانتاجها العالي من انزيم الاسبارجينيز مقارنة ببقية الانواع من البكتريا (1، 34).

خلصت هذه الدراسة الى أمكانية الحصول على عزلة محلية من بكتريا ***Erwinia carotovora*** من البطاط المتعفنة، إذ تتميز هذه العزلة بمقدرتها على انتاج انزيم الاسبارجينيز. ولاهمية هذا الانزيم ولمجالاته التطبيقية الواسعة في علوم الصناعات الغذائية، ولاسيما صناعة المعجنات والأغذية النشوية التي تتعرض للمعاملات الحرارية العالية، عليه نوصي بأستخدام تلك العزلة المحلية من بكتريا ***Erwinia carotovora*** AH88 في انتاج انزيم الاسبارجينيز لاستخدامه في تلك المجالات.

المصادر

1–العاني، محمد قيس (2005). أنتاج انزيم L-asparaginase من بكتريا ***Erwinia carotovora*** MM-3 وتنقيتة واستخدامة في تثبيط الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي.أطروحة دكتوراه – كلية العلوم – جامعة الانبار، العراق.

2-Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –dye binding. Analytical Biochemistry,72:248-25.

3-Don, J. Brenner and J.J. Farmer III(2001).Family1.Enterobacter.Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd edition, 2(Part B):587- 897.

4- Duval, M.; S. Suciu; A. Ferster; X. Rialland and P. Lutz (2002).Comparison of E. coli – asparaginase with *Erwinia* –asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignance: result of a randomized European organisation for Research and treatment of cancer Children's leukemia group phase 3 trial. Blood, 99(8):2734-2739.

5- FDA. Center for Food Saftey and Applied Nutrition (2011).http://www. cfsan.fda.gov/ Ird/pestadd.html#acrylamide>.

6- FAD. Food and Drug Administration. U.S.(2011). Department of Health and Human Services. FDA Approves Erwinaze to Treat a Form of Leukemia. FDA U.S. Food and Drug Administration. 18 Nov. Web. 1 Dec.

7- Georgia, A. K. and E. Labrou (2007). L-Asparaginase from *Erwinia Chrysanthemi* 3937: Cloning, expression and characterization . Journal of Biotechnology, 127(4):657–669.

8- Gulati, R.; R. K. Saxena and R. Gubta (1997).A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing microorganisms. Lett. Appl. Microbiol. 24:23-26.

9-Harrigan , W .F. and M. McCance (1976). Laboratory method in food and dairy microbiology. Academic Press, London, New York San Francisco. 362

10-Hauben, L.; E. R. B. Moore; L. Vauter; M. Steenackers; J. Mergaert L. Verdonck and J. Swings (1998). Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae.* Syst. Appl. Microbiol, 21:384-39

11-Helias, V.; D. Andrivon and B. Jouan (2000).Internal colonization pathways of potato plants By *Erwinia carotovora* ssp. Atrospectica. Plant Pathol., 49:33-42.

12-Hendriksen,H. V.; B. A. Kornbrust; P. R. Ostergaard and Stringer, M.A. 2009. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae,* J. of Agric. and Food Chemistry,57:4168-4176.

13-Holt, J.G.; N. R. Kirege; J. T. Staley and S. T. Williams (1994). Bergyes manual of dereminative bacteriology . 9th ed. Williams and Wilkins . Baltimors, Maryland, U. S. A

14-Hyman, L. J. ; L. Sullivan; I. K. Toth and M. Perombelon (2001). Modified crystal violet pectate medium (CVP) based on a new polypectate source (Slendid) for the detection and isolation of soft rot erwinias Potato Research ,44(3):265-270 .

15-Imada, A.; S. Igarasi; K. Nakahama and M. Isono, (1973). Asparaginase and glutaminase activities of microorganisms. J. Gen. Microbiol,76:85-89.

16-Kelman, A. and E. A. Maher (1984). Factors that effect evaluation of potato for resistance to bacterial soft rot. Abstracts of conference papers of the ninth triehnial conference of the European Association for potato research, 21-22.

17-Lea P.; L. Sodek; M. Parry ; P. Shewry P. R. and N.G. Halford (2007). Asparagine in plants. Ann. Appl. Biol.,150:1-26.

18-Maitham, J. M. and D. S. Ehab (2013). Detection of local Erwinia isolate causing diseases in potato by using DNA amplification by Polymerase Chain Reaction (PCR). J. of AL-Nahrain Univ.,16(3):224- 229.

19-Marits R,; V. Koiv; E. Laasik and A. Mae (1999) Isolation of an extracellular protease gene of Erwinia carotovora subsp. carotovora strain SCC3193 by transposon mutagenesis and the role of protease in phytopathogenicity. Microbiology, 145:1959–1966.

20-Mottram, D. S.; B. L. Wedzicha and A. Dodson (2002). Acrylamide is formed in the Maillard reaction. Nature, 491:448-449.

21-Neelima D.; P. Choubey, and M. Agashe (2014). Studies on optimization of growth parameters for L-Asparaginase production by *Streptomyces ginsengisoli*. The Scientific World Journal.vol.2014 ,Article ID.895167.

22-Perombelon , M.C.M. 2002. Potato disease caused by soft rot *Erwinias* : an over view of pathogensis. Plant pathology,51:1-12.

23-Pieters R.; S. P. Hunger; J. Boos; C. Rizzari; L. Silverman; A. Baruchel; N. Goekbuget; M. Schrappe and C. H. Pui (2011). L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia* asparaginase. Cancer, 15(2):117,238-249.

24-Prescott, L. M. ; J. P. Harley and D. A. Klein (1996). Microbiology . 3rd ed., Wmc. Brown Communication, Inc. Iowa, USA.

25-Rajneesh, P. ; M. Avinash and N. J. Prabbat (2013). *Erwinia carotrovora* associated with potato .int.J. curr. Microbiol. App. Sci., 2(10):83-89.

26-Rizzi,and M. D. Villagran (2003). Acryl amide formation mechanism in heated foods. Journal of Agriculture and Food chemistry, 51:4782-4787

27-Savitri, S.; N. Asthana and W. Azmi (2003).“Microbial L-asparaginase: a potent antitumour enzyme,” Indian Journal of Biotechnology, 2(2):184–194.

28-Schaad, N. W. (1988). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria . 2nd edition, the American Phytopathological Society. P.164.

29-Seeley ,H. W. and P. J. VanDemark (1981). Microbes in action:A laboratory of microbiology. Third edition . Freeman company. New York.

30-Stadler, R. H.; I. Blank; N. Varga ; F. Robert; J. Hau; P. A. Guy; M.C. Robert and S. Riediker (2002).Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature,*p. 430-450.

31-Solymár, B. D.; G. Walker; N. Carter and G. Bonn (2002). Fire blight of apple and pear in Ontario. Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Agdex. 634/210.

32-Taylor, R. K.; C. N. Hale ; F. A. Gunson and J. W. Marshall (2003) . Survival of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, in calyxes of apple fruit discarded in an orchard. Crop Protection, 22(4):579-688.

33-Toth, I. K.; K. S. Bell; M. C. Holeva and P. R. J. Birch (2003). "Soft rot erwiniae: from genes to genomes". Molecular Plant Pathology,4(1):17–30.

34-Vaibhav D. D.; D. V. Mangesh and L. Rodrigues (2010). Production of intracellular L- Asparaginase from *Erwinia carotrovora* and its statistical optimization using response surface methodology (RSM). International Journal of Chemical Sciences and Applications, l(1):25-36.

35-Vanneste, J. L. (Ed.) (2000). Fire Blight: The Disease and Its Causitive Agent, Erwinia amylovora. CABI Publishing, London, UK p:370

36-Yaylayan, V. A., and R. H. Stadler (2005). Acrylamide formation in food: a mechanistic perspective. Journal of AOAC International , 88:262-267.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LOCALLY ISOLATE OF *Erwinia cartrovora* spp. AH88 FOR ASPARAGINASE PRODUCTION

A. K. faisal **H. A. Jebur**

ABSTRACT

Fifteen of locally isolates among 100 isolates were obtained from different sources of potato fields and storages in College of Agriculture and potato refrigerated storage in Abu –Grab markets. These isolates were distinguished as a clear colony, Shine leather surface, white -yellow color, rod and gram negative. These isolates were subjected to primary and secondary screening to obtain more efficient isolates that have high ability for producing asparagines. It was found that the isolate A88 had the highest enzyme activity and specific activity being 52.7 unit/ml and 8.0 U/ mg respectively, in comparison with isolate A73 which had the lowest of enzyme activity 33.4 U/ml and the specific activity was 1.1 U/mg. A morphological and Biochemical tests were performed for isolate A 88 to identify and evaluate it's origin.The results indicated that this isolate belong to *Erwinia carotovora*, and designated as *Erwinia carotovora* ssp. AH88.

part of M. S. thesis for first author.
College of Agric.– Baghdad Univ.- Baghdad, Iraq.