فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۸، تابستان ۱۳۹۵، صفحه ۶۶- ۵۵
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۳/۰۲ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۵/۱۴

جداسازی و شناسایی جدایه‌های *اروینیای* مولد ال-آسپاراژیناز از مزارع سیب‌زمینی

ارسطو بدویی دلفارد*: دانشیار بیوشیمی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران، badoei@uk.ac.ir
زهرا کرمی: استادیار بیوفیزیک، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران، karami@uk.ac.ir
نرجس رمضانی‌پور: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران ramezany22@yahoo.com

چکیده

مقدمه: ال-آسپاراژیناز، به‌طور مؤثری در درمان لوسمی لنفوبلاستیک کاربرد دارد. سلول‌های سرطانی برای رشد سریع خود به ذخیرهٔ ال-آسپاراژین احتیاج فراوانی دارند. ال-آسپاراژیناز، هیدرولیز ال-آسپاراژین به ال-آسپارتیک اسید و آمونیاک را کاتالیز می‌کند. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی جدایه‌های *اروینیای* مولد ال-آسپاراژیناز از مزارع سیب‌زمینی جیرفت است.

مواد و روش‌ها: گونه‌های *اروینیای* واجد فعالیت پکتولایتیکی در محیط کشت M9 از سیب‌زمینی‌های تیره و فاسدشده جداسازی شدند. باکتری‌های تولیدکنندهٔ آنزیم مدنظر، براساس تغییر رنگ محیط متمایز شدند. تست‌های بیوشیمیایی-میکروبی و اثر بیماری‌زایی گونه‌های جداشده بر گیاه سیب‌زمینی و شمعدانی انجام شد. سپس میزان تولید آسپاراژیناز و شناسایی مولکولی *اروینیای* Er8 و Er11 بررسی شد.

نتایج: در این پژوهش، جدایه‌های *اروینیای پکتولایتیک* مولد ال-آسپاراژیناز روی محیط‌های CVP و M9 جداسازی شد. آزمایش‌های مربوط به اثر بیماری‌زایی *اروینیا* بر گیاه سیب‌زمینی و شمعدانی نشان داد که گونه‌های Er8 و Er11 دارای توان بیماری‌زایی بر این دو گیاه هستند. بیشترین میزان بیماری‌زایی گونه‌های Er8 و Er11، در زمان‌های ۴۸ و ۱۵ ساعت پس از تلقیح به‌ترتیب در گیاه سیب‌زمینی و شمعدانی مشاهده شد. بررسی مولکولی ژن 16S rDNA نشان داد که جدایه‌های Er8 و Er11 به *اروینیا کریزانتومی* با ۹۸درصد همولوژی نزدیک هستند.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به کاربردهای گستردهٔ ال-آسپاراژیناز در زمینه‌های مختلف، اروینیاهای جداشده و آنزیم‌هایی که تولید کرده‌اند، می‌توانند گزینه‌های مناسبی برای استفاده‌های کاربردی باشند.

واژه‌های کلیدی: ال-آسپاراژیناز، لوسمی، غربال‌گری، *اروینیا*، سرطان

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

لوسمی لنفوبلاستی حاد[۱] (ALL) یک سرطان[۲] بدخیم مغز استخوان و خون است که آن را توده‌های کنترل‌نشده و سلول‌های خونی غیرطبیعی ایجاد می‌کند (۱). این بیماری، سرطان گلبول‌های سفید خون است که با توقف فعالیت‌های طبیعی سلول‌های خونی و در خیلی از موارد مرگ آن‌ها، باعث مرگ‌ومیر افراد به‌ویژه در سنین نزدیک به ۲۰ سال می‌شود (۲).

درمان لوسمی حاد شامل شیمی‌درمانی[۳]، مصرف استروئیدها[۴]، پرتودرمانی[۵] و ترکیبی از درمان‌های متمرکز شامل کاشت مغز استخوان[۶] و سلول‌های سخت است (۳). در میان آن‌ها، شیمی‌درمانی به‌عنوان بهترین روش مورد توجه است که در آن از داروهایی مانند پردنیزولون[۷]، دگزامتازون[۸]، وینکریستین[۹]، ال-آسپاراژیناز[۱۰]، دانوروبسین[۱۱]، سیتارابین[۱۲]، اتوپوزاید[۱۳] و... استفاده می‌شود (۴). هرچند انواع این داروها امروزه در دسترس هستند، اما درجهٔ اثر آن‌ها در درمان سرطان در سومین و چهارمین مرحله، مشکوک است. علاوه بر این، شیمی‌درمانی عوارض جانبی زیادی ایجاد می‌کند. از جملهٔ این عوارض می‌توان به ناباروری، رشد دوبارهٔ سلول‌های بدخیم، حالت تهوع و استفراغ و سرکوب سیستم ایمنی اشاره کرد (۵). در میان داروهای ضدسرطان، آنزیم باکتریایی ال-آسپاراژیناز به‌عنوان مؤثرترین عامل دارویی شیمی‌درمانی، خصوصاً در درمان کودکان برای سرطان لنفوسیت حاد، به کار گرفته می‌شود (۶).

ال-آسپاراژین[۱۴]، یک اسیدآمینهٔ ضروری برای سلول‌ها درجهت تولید پروتئین است (۷). این ماده را یک آنزیم به نام آسپاراژین-سنتتاز[۱۵] می‌تواند در داخل سلول تولید کند و یا از خارج جذب شود (از راه خوراکی جذب بدن شود و در دسترس سلول‌ها قرار گیرد). سلول‌های سرطانی، به‌ویژه سلول‌های سرطانی لنفوسیتی برای رشد سریع و بدخیم خود نیازمند مقادیر زیادی آسپاراژین هستند (۸)؛ بنابراین، آسپاراژین دریافت‌شده ازطریق رژیم غذایی را در کنار آسپاراژینی که خودِ بدن تولید کرده (که محدود است) این سلول‌ها استفاده می‌کنند تا نیاز فوق‌العادهٔ آن‌ها تأمین شود (۸). درنتیجه، ال-آسپاراژین یک اسیدآمینهٔ مهم برای رشد سلول‌های سرطانی است، درحالی‌که سلول‌های طبیعی برای رشد خود وابسته به آن نیستند؛ زیرا آنزیم سنتزکنندهٔ ال-آسپاراژین به‌میزان کافی و برای برآورده‌کردن نیازهای متابولیک بدن، آن را سنتز می‌کند (۹).

وجود ال-آسپاراژیناز باعث می‌شود سلول‌های سرطانی از یک فاکتور رشد مهم محروم شوند و نتوانند به حیات خود ادامه دهند (۱۰). ال-آسپاراژینازهای باکتریایی موضوع قابلِ‌توجهی در پزشکی هستند و در درمان لوسمی لنفوبلاستیک حاد استفاده می‌شوند. هرچند فعالیت ضدسرطانی و سمیت ال-آسپاراژیناز به‌دست‌آمده از *اروینیا* (*پکتوباکتریوم*[۱۶]) *کاراتوورا*[۱۷] و *اشرشیا کلای*[۱۸] مشابه است ولی از نظر سرولوژی و بیوشیمی ال-آسپاراژیناز *اروینیا کاراتوورا* برجسته است (۱۱). علاوه‌بر کاربردهای بالینی، ال-آسپاراژیناز در فرآوری مواد غذایی نیز استفاده می‌شود. در طی گرم‌کردن غذا، اسیدآمینهٔ ال-آسپاراژینی که به‌طور طبیعی در غذاهای نشاسته‌ای وجود دارند، دچار واکنش‌های میلارد قهوه‌ای می‌شود. متأسفانه، در واکنش‌های میلارد عوامل پنهانی سرطان‌زایی در انسان مثل آکریل‌آمید شکل می‌گیرند. ال-آسپاراژیناز یک راه بالقوه برای کاهش میزان ال-آسپاراژین آزاد در مواد اولیهٔ محصولات غذایی است (۱۲). به‌این‌ترتیب، هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی جدایه‌های *اروینیای* مولد ال-آسپاراژیناز دارویی از مزارع سیب‌زمینی جیرفت است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: با توجه به اینکه جدایه‌های *اروینیای* مولد ال-آسپاراژیناز دارویی با داشتن خصوصیت بیماری‌زایی در سیب‌زمینی (عامل پوسیدگی نرم) نیز مطرح‌اند (۱۳). ازاین‌رو، غربال‌گری برای یافتن جدایه های *اروینیای* مولد ال-آسپاراژیناز با استفاده از سیب‌زمینی انجام شد. نمونه‌های سیب‌زمینی با علائم مشخص بخش‌های تیره‌رنگ و فاسدشده از مزارع کشاورزی شهرستان جیرفت استان کرمان جمع‌آوری و در آزمایشگاه استفاده شد.

غربال‌گری اروینیا: غربال‌گری *اروینیاهای* مولد ال-آسپاراژیناز، با استفاده از بافت‌های تیره و نرم‌شدهٔ سیب زمینی‌های جمع‌آوری‌شده صورت گرفت. نمونه‌ها ابتدا در ۵۰ میلی‌لیتر محیط M9 و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۶۰rpm غنی‌سازی شدند. این محیط شامل ۲ گرم‌برلیتر پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات[۱۹]، ۳ گرم‌برلیتر گلوکز[۲۰]، ۶ گرم‌برلیتر ال-آسپاراژین، ۱ گرم‌برلیتر سولفات منیزیم[۲۱] و ۱ گرم‌برلیتر کلسیم دی‌کلرید[۲۲] بود (۱۴). پس از گذشت ۳ روز به‌میزان ۵درصد به محیط تازه تلقیح شد؛ در این محیط باکتری‌های مولد ال-آسپاراژیناز قادر به رشد خواهند بود. پس از طی‌شدن ۳ روز به‌میزان ۱درصد به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط CVP[۲۳] تلقیح شد. این محیط، یک محیط اختصاصی و انتخابی برای رشد *اروینیا*های گرم منفی است. حضور کریستال ویوله در ترکیب این محیط از رشد باکتری‌های گرم مثبت جلوگیری می‌کند. ترکیبات آن شامل ۶/۸ میلی‌لیتر کلسیم دی‌کلرید ۱۰درصد، یک گرم سدیم نیترات[۲۴]، ۹ گرم پلی‌پکتات سدیم[۲۵]، یک میلی‌لیتر کریستال ویوله[۲۶] ۰/۰۷۵درصد، ۰/۵ میلی‌لیتر سدیم دو دسیل سولفات[۲۷] ۱۰درصد، ۲/۵ گرم سدیم سیترات[۲۸]، ۰/۵ گرم تریپتون[۲۹] و ۲ گرم آگار[۳۰] (حالت‌جامد) در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر است (۱۵). پس از ۳ روز، تعویض محیط صورت گرفت. سپس به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط در پلیت‌های جامد CVP کشت داده شد و پلیت‌ها در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از طی‌شدن ۵ روز، کلنی‌های دارای فعالیت پکتولایتیکی مشاهده شد. گفتنی است *اروینیاهای* بیماری‌زا دارای فعالیت پکتولایتیکی هستند و سدیم پلی‌پکتات موجود در محیط CVP را به‌عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند (۱۶).

تست‌های بیوشیمیایی-میکروبی: باکتری‌های جداسازی‌شده تخلیص و صفات ریخت‌شناسی و برخی از تست‌های بیوشیمیایی-میکروبی آن‌ها از جمله رنگ آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، هیدرولیز ژلاتین، رشد در نمک ۵ درصد و... انجام شد (۱۷).

اثر بیماری‌زایی بر گیاه سیب‌زمینی و شمعدانی: به منظور بررسی تست لهانیدن سیب‌زمینی[۳۱]، تزریق باکتری‌های خالص به سیب‌زمینی انجام شد (۱۷). در این تست، از سوسپانسیون باکتری‌های خالص جداشده در آب مقطر استریل استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با سرنگ کاملاً استریل در شیار ایجادی در سطح ورقهٔ یک سیب‌زمینی تزریق شد. پس از جذب و نفوذ سوسپانسیون باکتری، نمونه‌ها به‌مدت یک هفته درون انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از ۷-۲ روز میزان لهیدگی، نرم شدن و تیرگی بافت سیب‌زمینی در محل تزریق هر باکتری بررسی شد. این آزمایش یکی از تست‌های

شاخص در زمینهٔ جداسازی *اروینیا*ها است.

همچنین، از جمله آزمایش‌های کاربردی دیگر در زمینهٔ شناسایی *اروینیاهای* بیماری‌زای گیاهی از انواع غیربیماری‌زا، تست واکنشی فوق حساسیت[۳۲] در گیاه حساس این گروه است (۱۸). به‌این‌ترتیب، گیاه شمعدانی[۳۳] به‌عنوان گیاه حساس، انتخاب شد و ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون هریک از باکتری‌های جداشده در محل بافت برگ‌های جوان تزریق و نتایج پس از ۲۴ ساعت مشاهده شد.

شناسایی مولکولی: جدایه‌هایی که در تمامی آزمایشات بهترین نتیجه را نشان دادند انتخاب شدند و تحت شناسایی مولکولی قرار گرفتند. به‌منظور استخراج DNA، از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن استفاده شد. برنامهٔ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[۳۴] با برنامه زمانی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه و ۳۳ سیکل شامل، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه، ۵۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و یک سیکل ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه با استفاده از پرایمرهای 16S rDNA با نام F 5′ -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′ و R 5′ -GACGGGCGGTGTGTACAA-3′ انجام شد (۱۹). پس از آنالیز کیفی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط الکتروفورز ژل آگارز (۱درصد) و اطمینان از تکثیر قطعه مدنظر در محدودهٔ موردِانتظار، محصولات برای تعیین توالی به شرکت بیونیر (کره جنوبی) فرستاده شدند و پس از دریافت نتیجهٔ تعیین توالی، در بانک ژنی[۳۵] مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی[۳۶]، شابه توالی‌ها با ابزار BLAST بررسی شد (۲۰).

مقایسهٔ میزان فعالیت ال-آسپاراژینازی جدایه‌های برتر: مقایسهٔ میزان فعالیت ال-آسپاراژیناز جدایه‌های برتر روی محیط جامد M9 حاوی ۲/۵درصد فنل‌رد[۳۷] با اندازه‌گیری قطر هالهٔ حاصل از فعالیت ال-آسپاراژینازی در بازهٔ زمانی ۳۰ ساعت صورت گرفت. فعالیت آنزیم تجزیه‌کنندهٔ ال- آسپاراژین با تهیهٔ لوله‌های نمونه، شاهد و استاندارد انجام شد. لوله‌های استاندارد حاوی غلظت‌های متفاوتی از سوبسترای استاندارد و نیز شاهد استاندارد است و برای رسم منحنی استاندارد استفاده می‌شود. لولهٔ نمونه، حاوی اسیدآمینهٔ آسپاراژین است و درصورت تولید ال-آسپاراژیناز از باکتری‌های بررسی‌شده، طبق روش فاست و اسکات[۳۸] (۱۹۶۰) و براساس واکنش فنل-هیپوکلریت[۳۹] با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر[۴۰] اندازه‌گیری می‌شود (۲۱). این روش براساس مقدار آمونیاک آزادشده از ال-آسپاراژین در هنگام فعالیت آنزیم است. به‌این‌منظور، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از فاز مایع باکتری به ۳۰۰ میکرولیتر بافر با سوبسترا اضافه می‌شود و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه می‌شود. سپس ۴۰۰ میکرولیتر محلول A (فنل[۴۱] ۰/۵۹ مولار و سدیم نیتروپروساید[۴۲] یک میلی‌مولار) و ۴۰۰ میکرولیتر محلول B (سدیم هیپوکلریت[۴۳] ۰/۱۱ مولار و سدیم هیدروکسید[۴۴] ۲ مولار) اضافه می‌شود. با پدیدارشدن رنگ آبی، جذب مخلوط ویال در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در برابر شاهد آب مقطر خوانده شد. هر واحد فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز به‌عنوان مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که یک میکرومول آمونیاک را در مدت یک دقیقه در شرایط استاندارد آزاد کند (۲۱).

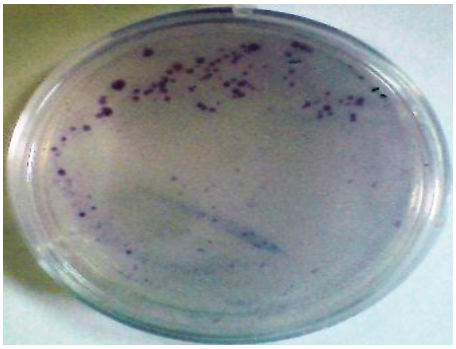
نتایج

غربال گری جدایه‌های *اروینیا*: گونه‌های مختلف این باکتری پاتوژن گیاهی هستند و باعث نکروز، گال، پلاسیده شدن یا پوسیدگی نرم در گیاهان می‌شوند و ازاین‌رو به گیاهان، سبزیجات و میوه‌ها صدمه وارد می‌کنند. *اروینیا کاروتوورا* عامل بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی است. این باکتری در سیب‌زمینی پوسیدگی سیاه ایجاد می‌کند (شکل ۱). در این پژوهش، از محیط جامد M9 حاوی آسپاراژین، برای غربال گری باکتری‌های مولد آنزیم ال-آسپاراژیناز استفاده شد. این محیط حاوی فنل‌رد است که در اثر فعالیت آنزیمی، آمونیاک آزادشده و اسیدیتهٔ محیط افزایش می یابد و منجر به تغییر رنگ محیط واکنش از زرد به صورتی می‌شود. کشت خالص *اروینیا* Er8 روی محیط CVP در شکل ۲ نشان داده شده است. ظاهرشدن کلنی در محیط CVP، فعالیت پکتولایتیک باکتری در اثر تجزیه سدیم پلی‌پکتات را نشان می‌دهد. در این پژوهش، ۱۱ جدایه با توانایی ال-آسپاراژینازی و رشد در محیط CVP جداسازی شدند که از میان آن‌ها ۲ جدایه برتر Er8 و Er11 در مطالعات شناسایی و بیماری‌زایی به‌عنوان *اروینیای* مولد ال-آسپاراژیناز انتخاب شدند.

تست های بیوشیمیایی-میکروبی: آزمایش رنگ آمیزی گرم و دیگر آزمون‌های بیوشیمیایی-میکروبی برای Er8 و Er11 انجام شد. هر دوی آن‌ها به‌صورت کوکوباسیل‌های گرم منفی منفرد یا جفت به‌صورت کوتاه زنجیره و متحرک مشاهده شدند. آن ها کاتالاز مثبت، ژلاتیناز مثبت، پکتیناز مثبت، اکسیداز منفی و قادر به رشد در نمک ۵درصد بودند.

اثر بیماری‌زایی روی گیاه سیب‌زمینی و شمعدانی: شکل ۳ نتایج حاصل از تست لهانیدن با تلقیح جدایه‌های جداسازی‌شده در سیب‌زمینی را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود جدایه‌های Er8 و Er11 بیشترین میزان نرم‌شدگی و فساد را در بافت سیب‌زمینی نشان می‌دهند. جدایهٔ ۸ در زمان ۴۸ ساعت و جدایهٔ ۱۱ در ۹۶ ساعت در مقایسه با ۹ جدایهٔ دیگر، آثار لهانیده‌شدن بافت‌های سیب‌زمینی را نشان دادند. *پکتوباکتریوم*ها یا *اروینیا*های عامل پوسیدگی نرم، متعلق به خانواده *انتروباکتریاسه*[۴۵] هستند. از ویژگی‌های اصلی این باکتری‌ها، تولید و ترشح آنزیم‌های منهدم‌کنندهٔ دیوارهٔ سلولی، به‌ویژه آنزیم‌های پکتیناز یا پکتولایتیک است که موجب لهانیده شدن بافت‌های گیاهی می‌شوند. پوسیدگی‌های نرم باکتریایی بیشتر در گیاهانی که بافت‌های ذخیره‌ای یا برگ و ساقه‌های نرم و آبدار دارند رخ می‌دهد و علائم بیماری در تمامی میزبان‌ها بسیار مشابه است؛ بافت‌های آلوده، نرم و آبکی و پوسیده‌اند (۱۶).

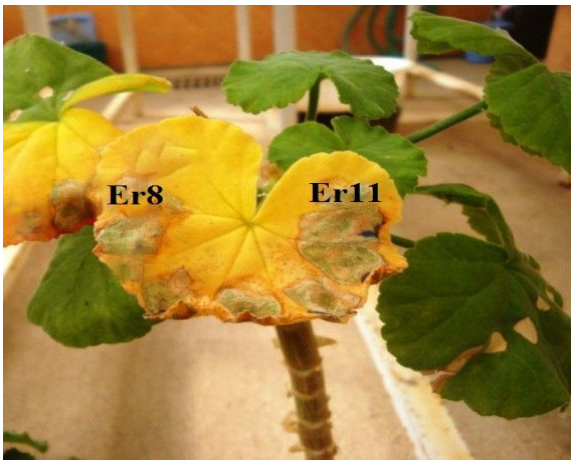
شکل ۱- تیرگی و نرم‌شدن بافت سیب‌زمینی در اثر رشد جدایه‌های *اروینیا*



شکل ۲- کشت جدایهٔ Er8 روی محیط اختصاصی CVP. رشد جدایه در این محیط معیاری از فعالیت پکتیکولایتیکی است.

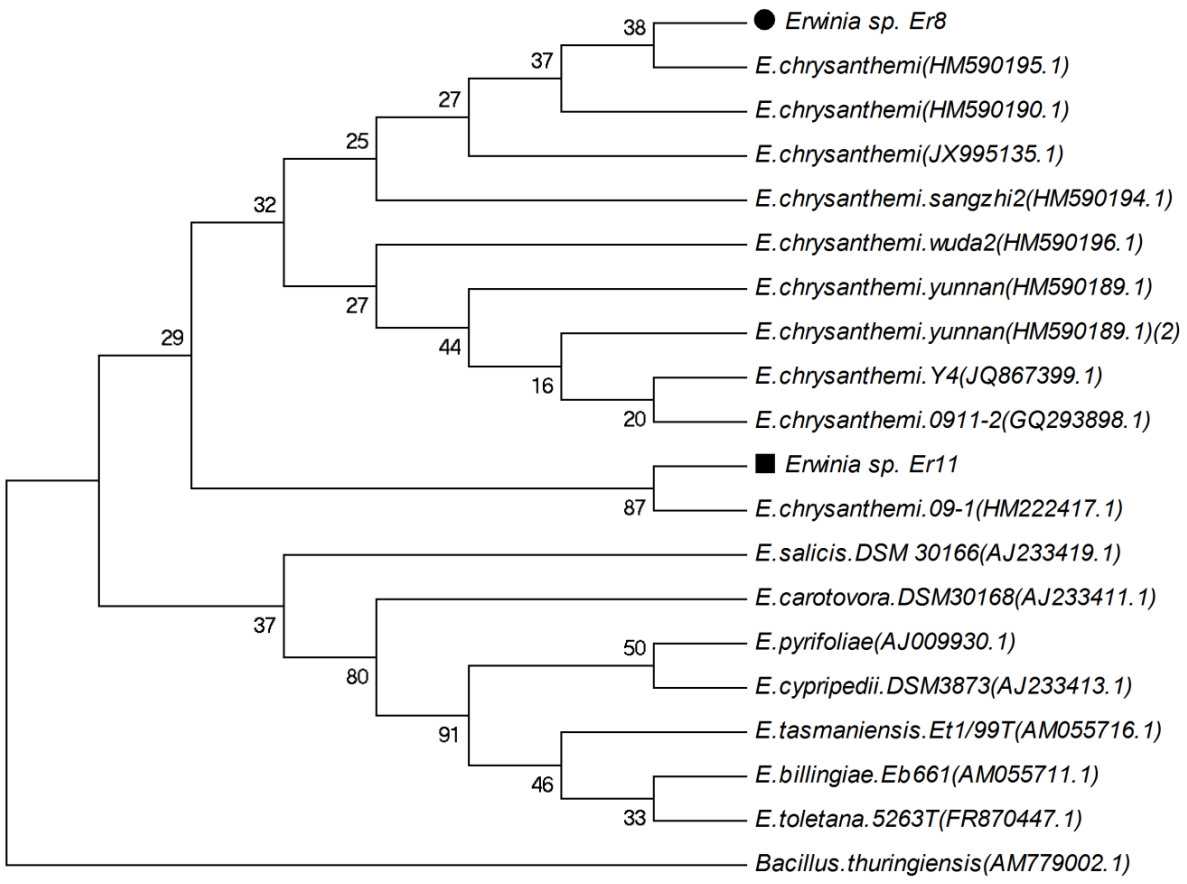
شکل ۳- تست لهانیدن سیب‌زمینی. نتایج نشان می‌دهد که بهترین جدایه‌های جداسازی‌شده، Er8 و Er11 هستند.

برای بررسی میزان بیماری‌زایی جدایه‌ها، تست واکنشی فوق حساسیت انجام شد و سوسپانسیون هریک از جدایه‌ها به گیاه شمعدانی تلقیح و نتایج پس از ۲۴ ساعت بررسی شد. نتایج در شکل ۴ نشان می‌دهد که جدایه‌های Er8 و Er11 بیشترین میزان بیماری‌زایی را به ترتیب در ۱۵ و ۲۰ ساعت پس از تلقیح در گیاه شمعدانی ایجاد کرده‌اند.



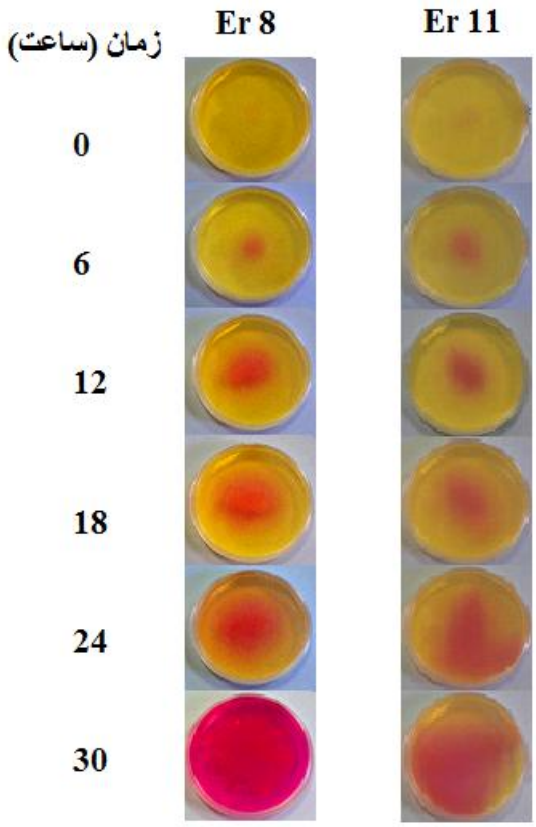
شکل ۴- تست واکنشی فوق حساسیت در گیاه شمعدانی. بیشترین میزان بیماری‌زایی در جدایه‌های Er8 و Er11 دیده می‌شود.

شناسایی مولکولی: درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های Er8 و Er11 با استفاده از سایر توالی‌های ژن 16S rDNA سویه‌های *اروینیا* موجود در NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 رسم شد (شکل ۵). نتایج حاصل از تطبیق توالی نشان داد که این توالی ژن 16S rDNA دو سویه به *اروینیا کریزانتومی* به‌میزان ۹۸درصد شباهت دارند.



شکل ۵- درخت فیلوژنی سویه‌های *اروینیا* Er8 و Er11 رسم‌شده با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5 به‌روش neighbour joining و با استفاده از معیار Boot strap.

مقایسهٔ میزان فعالیت ال-آسپاراژینازی جدایه‌های برتر: در ادامه روش جداسازی، از بین جدایه‌های جداسازی‌شده، دو جدایهٔ Er8 و Er11 با اثر بیماری‌زایی قابلِ توجه که توانایی هیدرولیز ال-آسپاراژین در محیط حاوی فنل‌رد با بیشترین قطر هالهٔ صورتی را داشتند، به عنوان جدایه‌های برتر مولد آنزیم در نظر گرفته شدند. در شکل ۶ و جدول ۱ قطر هالهٔ تشکیل‌شده و مقادیر به دست‌آمده توسط ۲ جدایه در بازهٔ زمانی ۳۰ ساعت روی محیط M9 حاوی فنل‌رد نشان داده شده است. با توجه به شکل، جدایه‌های Er8 و Er11 فعالیت آنزیمی خود را در زمان ۶ ساعت پس از انکوباسیون آغاز کرده‌اند که با گذشت زمان به‌تدریج بر میزان فعالیت، تجزیهٔ ال-آسپاراژین و اسیدیتهٔ محیط افزوده شده است. در زمان ۱۸ ساعت به‌طور تقریبی ۵۰درصد محیط در نتیجهٔ فعالیت آنزیمی دو جدایه صورتی‌رنگ شده است. زمان ۳۰ ساعت نیز به‌عنوان زمانی که جدایه‌ها به حدود ۱۰۰درصد میزان فعالیت خود رسیده‌اند به دست آمده است. با مشاهدهٔ میزان فعالیت ال-آسپاراژینازی دو جدایه در ۳۰ ساعت پس از انکوباسیون و مقایسهٔ آن مشخص شد که جدایهٔ ۸ این مراحل را با فعالیت آنزیمی بیشتری گذرانده است.



شکل ۶- تغییر رنگ محیط کشت بر اثر تولید آنزیم توسط باکتری Er8 و Er11 پس از ۳۰ ساعت انکوباسیون

جدول ۱- قطر هالهٔ ال-آسپاراژینازی تشکیل‌شده توسط سویه‌ها روی محیط M9 برحسب میلی‌متر

زمان (ساعت)/ سویه	Er8	Er11
۰	۰	۰
٦	۰/۵	۲
۱۲	۵	۷/۵
۱۸	۱۰	۱۴
۲٤	۱۶/۵	۱۹
۳۰	۲۶	۳۰

بحث و نتیجه‌گیری

آنزیم آسپاراژیناز از دیرباز به‌عنوان آنزیم دارویی در درمان لوسمی استفاده شده است. این آنزیم در رده‌های مختلف حیات موجود است، ولی آنزیم باکتریایی به علت تولید ارزان‌تر، خالص‌سازی آسان‌تر و اثرات جانبی کمتر مورد توجه ویژهٔ پژوهشگران است (۲۲). از جمله مهم‌ترین باکتری‌های مولد این آنزیم می‌توان به *اشرشیا کلای*، *اروینیا کاروتوورا* (۲۳) و جدایه‌های *باسیلوس* (۲۴) اشاره کرد. مهم‌ترین آسپاراژیناز استفاده شده در درمان آنزیمی از جدایهٔ *اروینیا کاروتوورا* به دست آمده است که اولین بار، کید در ۱۹۵۰ قابلیت دارویی آن را بررسی کرد (۲۵). از آن زمان تاکنون پژوهشگران مختلفی سویه‌های مختلف *اروینیا* مولد ال-آسپاراژیناز را غربال‌گری کرده‌اند (۲۶). به‌منظور غربال‌گری باکتری های مولد ال-آسپاراژیناز، از روش رنگ‌سنجی در پلیت با استفاده از محیط M9 حاوی فنل رد به‌عنوان شناساگر pH استفاده شد. در این روش که از سریع‌ترین روش‌های غربال‌گری باکتری‌های مولد ال-آسپاراژیناز در بازهٔ زمانی ۲۴-۱۸ ساعت است، در صورت وجود فعالیت ال-آسپاراژینازی و تولید آمونیاک، فنل‌رد از زرد به صورتی تغییر رنگ می دهد. باشا[۴۶] و همکاران (۲۷)، دارماراج[۴۷] (۲۸) و کوشواها[۴۸] و همکاران (۲۹) نیز از محیط M9 حاوی فنل رد جهت غربال‌گری اولیهٔ میکروارگانیسم‌ها استفاده کردند.

در این مطالعه با استفاده از روش ذکرشده، دو جدایهٔ بومی از جنس *اروینیا* با قطر هالهٔ ۱۰ تا ۲۰ میلی‌متر حاصل از فعالیت آنزیمی در بازهٔ زمانی ۱۸-۲۴ ساعت به دست آمد. گولاتی و همکاران در بررسی هالهٔ حاصل از فعالیت ال-آسپاراژینازی باکتری‌های مختلف در بازهٔ زمانی ۱۸ ساعت، ایجاد قطر هالهٔ ۶ میلی‌متری *Bacillus licheniformis* و ایجادنشدن هاله توسط باکتری *Erwinia herbicola* گزارش دادند (۳۰). همچنین، در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ انجام شد، پژوهشگران با استفاده از روش سنجش یاد شده به جداسازی باکتری *Erwinia aroideae* با قطر هالهٔ ۱۰ میلی‌متر در کنار

سایر باکتری‌های برتر مولد ال-آسپاراژیناز مانند *Bacillus subtilis*، *Psendomonas florescens*، *Escherichia coli* و *Proteus* vulgaris دست یافتند (۳۱ و ۳۲). در مطالعات قبلی ما، سویه های *سودوموناس* و *باسیلوس* با پتانسیل تولید مقدار قابل توجهی از آنزیم آسپارازیناز گزارش شده است (۳۳- ۳۵). در این پژوهش دو جدایهٔ *اروینیا* با قابلیت تولید ال-آسپاراژیناز جداسازی‌شده و بررسی بیماری‌زابودن آن‌ها با دو تست لهانیدن سیب‌زمینی و واکنش فوق حساسیت در دو گیاه حساس این گروه، سیب‌زمینی و شمعدانی تأیید شد. جدایه‌های وابسته به باکتری جنس *اروینیا* از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای گیاهی به‌ویژه سیب‌زمینی هستند (۱۳). علاوه‌براین، توانایی هیدرولیز سدیم پلی‌پکتات به‌عنوان منبع کربن روی محیط CVP از این جدایه‌ها نیز تأییدکنندهٔ فعالیت پکتولایتیکی آن‌ها است (۱۶).

ناوازا و همکاران، تیواری و دوآ، مالادکار و همکاران و مولا و همکاران از جمله پژوهشگرانی بودند که به مطالعه دربارهٔ جداسازی آنزیم ال-آسپاراژیناز از گونه‌های مختلف *اروینیا* پرداخته‌اند (۳۶). در ۲۰۰۶ کامبل[۴۹] و همکاران، یک گونهٔ *اروینیای* تولیدکنندهٔ ال-آسپاراژیناز را جداسازی کردند و ویژگی‌های آنزیمی آن را مطالعه کردند (۳۷). همچنین در ۲۰۰۹ وارانکار[۵۰] و همکاران، غربال‌گری باکتری *اروینیا* مولد ال-آسپاراژیناز و بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم را از این سویه انجام دادند (۳۸). نتایج حاصل از این پژوهش، فعالیت بالای این سویه‌ها نسبت به سویه‌های مشابه را نشان می‌دهد.

در حال حاضر، آنزیم ال-آسپاراژیناز با نام تجاری Elspar از دو منبع باکتریایی *اشرشیای کلای* و *اروینیا* را شرکت معتبر آلمانی مرک[۵۱] و شرکت پخش مواد دارویی فرانسیسکو آمریکا[۵۲] به بازار فروش عرضه می‌کنند (۳۹). با توجه به مصرف قابلِ‌توجه این آنزیم در کشور متأسفانه این آنزیم در داخل کشور تولید نمی‌شود. پژوهش در این زمینه می‌تواند مقدمهٔ تولید این آنزیم مهم را در کشور فراهم آورد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کمال تشکر را دارند.

References

(1) Pieters R., Hunger SP., Boos J., Rizzari C., Silverman L., Baruchel A., et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2011; 117 (2): 238- 49.

(2) Pui CH., Relling MV., Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine* 2004; 350 (15): 1535- 48.

(3) Inaba H., Greaves M., Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* 2013; 381 (9881): 1943- 55.

(4) Jabbour E., Thomas D., Cortes J., Kantarjian HM., O'Brien S. Central nervous system prophylaxis in adults with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2010; 116 (10): 2290- 300.

(5) Can G., Demir M., Erol O., Aydiner A. A comparison of men and women's experiences of chemotherapy-induced alopecia. *European Journal of Oncology Nursing* 2013; 17 (3): 255- 60.

(6) Ahmad N., Pandit NP., Maheshwari SK. L-asparaginase gene–a therapeutic approach towards drugs for cancer cell. *International Journal of Bioscience* 2012; 2 (4): 1- 11.

(7) Yadav S., Verma SK., Singh J., Kumar A. Industrial production and clinical application of L-asparaginase: A chemotherapeutic agent. *Stroke* 2014; 76 (1): 41.

(8) Kamble VP., Rao RS., Borkar PS., Khobragade CN., Dawane BS. Purification of L-asparaginase from a bacteria *Erwinia carotovora* and effect of a dihydropyrimidine derivative on some of its kinetic parameters. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 2006; 43 (6): 391.

(9) Elshafei AM., Hassan MM., Abouzeid MAE., Mahmoud DA., Elghonemy DH. Purification, characterization and antitumor activity of L-asparaginase from *Penicilliumbrevicompactum* NRC 829. *British Microbiology Research Journal* 2012; 2 (3): 158- 74.

(10) Amena S., Vishalakshi N., Prabhakar., M., Dayanand A., Lingappa K. Production., purification and characterization of L-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. *Brazilian Journal of Microbiology* 2010; 41 (1): 173- 8.

(11) Dey SK., Raha SK., Roy SK., Chakrabarty SL. Comparison of Lasparaginasea ctivity in different species of *Vibrio*. *Indian Journal of Medical Research* 1988; 88 (1): 398- 403.

(12) Kornbrust BA., Stringer MA., Lange NK., Hendriksen HV. Asparaginase- an enzyme for acrylamide reduction in food products. *Enzymes in Food Technology* 2010; 2 (1): 59- 87.

(13) Rashid M., Chowdhury MSM., Sultana N. *In-vitro* Screening of some Chemicals and Biocontrol Agents against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora,* the Causal Agent of Soft Rot of Potato (*Solanum tuberosum*). *The Agriculturists* 2013; 11 (2): 1- 9.

(14) Sarquis MIDM., Oliveira EMM., Santos AS., Costa GLD. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2004; 99 (5): 489- 92.

(15) Bdliya BS., Langerfeld E., Rudolph K. A modified crystal violet pectate (CVP) medium for detection and isolation of soft rot *Erwinia* spp. from plant materials. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 2004; 111 (5): 506- 15.

(16) Diallo S., Latour X., Groboillot A., Smadja B., Copin P., Orange N., et al. Simultaneous and selective detection of two major soft rot pathogens of potato: *Pectobacterium atrosepticum* (*Erwinia carotovora subsp. atrosepticum*) and *Dickeya spp.*(*Erwinia chrysanthemi)*. *European journal of plant pathology* 2009; 125 (2): 349- 54.

(17) Leavesley HB., Li L., Prabhakaran K., Borowitz JL., Isom GE. Interaction of cyanide and nitric oxide withcytochrome oxidase: implications for acute cyanide toxicity. *Toxicological Sciences* 2008; 101 (1): 101- 11.

(18) Schaad NW., Jones JB., ChunW. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 3rd ed. Saint Paul Minnesota United States: American Phytopathological Society; 2001.

(19) Badoei-Dalfard A., Amiri-Bahrami M., Riahi-Madvar A., Karami Z., Ebrahimi M A. Isolation, identification and characterization of organic solvent tolerant protease from *Bacillus* sp. DAF-01. *Biological Journal of Microorganism* 2012; 1 (2): 37- 48.

(20) Kim OS., Cho YJ., Lee K., Yoon SH., Kim M., Na H., et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent unculturedspecies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2012; 62 (3): 716- 21.

(21) Fawcett JK., Scott JE. A rapid and precise method for the determination of urea. *Journal of Clinical Pathology.* 1960; 13 (2): 156-159.

(22) Savitri N., Asthana N. Azmi., W. Microbial l-asparaginase a potent antitumour enzyme. *Indian Journal of Biotechnology* 2002; 2 (2): 184- 94.

(23) Deokar VD., Vetal MD., Rodrigues L. Production of intracellular l-asparaginase from *erwinia carotovora* and its statistical optimization using response surface methodology (RSM). *International Journal of Applied Chemical Sciences Research* 2010; 1 (1): 25- 36.

(24) Moorthy V., Ramalingam A., Sumantha A., Shankaranaya RT. Production., purification and characterization of extracellular l-asparaginase from a soil isolate of *bacillus* sp. *African Journal of Microbiology Research* 2010; 4 (18): 1862- 7.

(25) Kidd JG. Regression of transplanted lymphomas induced in vivoby means of normal guinea pig serum. *The Journal of Experimental Medicine* 1953; 98 (6): 565- 81.

(26) Warangkar SC., Khobragade CN. Purification, characterization, and effect of thiol compounds on activity of the *Erwinia* carotovora L-asparaginase. *Enzyme research* 2010; 10 (1): 1- 11.

(27) Basha NS., Rekha R., Komala M., Ruby S. Production of extracellular anti-leukaemic enzyme l-asparaginase from marin actinomycetes by solid-state and submerged fermentation: purification and characterization. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2009; 8 (4): 353- 60.

(28) Dharmaraj S. Study of l-asparaginase production by *stereptomyces noursei* MTCC10469, Isolated from marine sponge callyspongia diffusa. *Iranian Journal of Biotechnology* 2011; 9 (2): 102- 08.

(29) Kushwaha A., Ahmed F., Singh P. Production and purification of l-asparaginase from bacterial source. *International Journal of Pharmacy and Life Sciences* 2012; 2 (2): 39- 62.

(30) Gulati R., Saxena RK., Gupta R. A rapid plate assay for screening l-asparaginase producing micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology* 1997; 24 (1): 23- 6.

(31) Peterson R. E., Ciegler A. L-asparaginase activity by various bacteria. *Journal of Missan Researches* 1969; 17 (6): 929–930.

(32) Graham., DC. Taxonomy of the soft rot coliform bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 1964; 2 (1): 13- 42.

(33) Badoei-Dalfard A., Karami Z., Ramezani-pour N. Gene sequencing, cloning, and expression of the recombinant L-Asparaginase of *Pseudomonas aeruginosa* SN4 strain in *Escherichia coli*. *Biological Journal of Microorganism* 2016; 4 (16):11- 20.

(34) Badoei-Dalfard A. Purification and characterization of l-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* strain SN004: Production optimization by statistical methods. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2015:4 (3): 388- 97.

(35) Badoei-Dalfard A. L-asparaginase production in the *pseudomonas pseudoalcaligenes* strain JHS-71 isolated from Jooshan Hot-spring. *Molecular Biology Research Communications* 2016; 5 (1): 1- 10.

(36) Sinha R., Singh HR., Jha SK. Microbial l-asparaginase: present and future prospective. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology* 2013; 2 (11): 2319- 25.

(37) Kamble V P., Rao RS., Borkar PS., Khobragade CN., Dawane BS. Purification of L-asparaginase from a bacteria *Erwinia* carotovora and effect of a dihydropyrimidine derivative on some of its kinetic parameters. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 2006;43 (6): 391- 4.

(38) Warangkar S., Khobragade C. Screening, enrichment and media optimization for L-

asparaginase production. *Journal of Cell and Tissue Research* 2009; 9 (3): 1963-.68.

(39) Saxena S. Microbial enzymes and their industrial applications. In *Applied Microbiology*. India:Springer; 2015.

[1]- Acute Lymphoblastic Leukaemia
[2]- Cancer
[3]- Chemotherapy
[4]- Steroids
[5]- Radiation therapy
[6]- Bone marrow transplants
[7]- Prednisolone
[8]- Dexamethasone
[9]- Vincristine
[10]- L-asparaginase
[11]- Daunorubicin
[12]- Cytarabine
[13]- Etoposide
[14]- L-asparagine
[15]- Asparagine-synthetase
[16]- *Pectobacterium*
[17]- *Erwinia carotovora*
[18]- *E. coli*
[19]- KH_2PO_4
[20]- Glucose
[21]- $MgSO_4$
[22]- $CaCl_2$
[23]- Crystal Violet Pectate
[24]- $NaNO_3$
[25]- Sodium polypectate
[26]- Crystal violet
[27]- Sodium Lauryl Sulfate (=SDS)
[28]- Trisodium citrate dehydrate (=Sodium citrate)
[29]- Tryptone
[30]- Agar
[31]- Potato soft rot test
[32]- Hypersensitive reaction
[33]- Geranium
[34]- The Polymerase Chain Reaction
[35]- Gene Bank
[36]- http://www.ncbi.nlm.nih.gov (NCBI)
[37]- Phenol red
[38]- Fawcett & Scott
[39]- Phenol/hypochlorite
[40]- Spectrophotometer
[41]- Phenol
[42]- Sodium nitroprosside
[43]- Sodium hypochlorite
[44]- NaOH
[45]- *Enterobacteriaceae*
[46]- Basha
[47]- Dharmaraj
[48]- Kushwaha
[49]- Kamble
[50]- Warangkar
[51]- Merck
[52]- BioServices Pharmacy Repository, USA.

Isolation and Identification of L-asparaginase producing *Erwinia* strains which isolated from Potato Farms

Arastoo Badoei-Dalfard *
Associate Professors of Biochemistry, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, badoei@uk.ac.ir
Zahra Karami
Assistant Professors of Biophysics, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, karami@uk.ac.ir
Narjes Ramezani–pour
M.Sc of Microbiology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, ramezany22@yahoo.com

Abstract

Introduction: L-Asparaginase can be effectively used for the treatment of lymphoblastic leukemia. The rapid growth of cancer cells are needed for L-asparagine abundant storage. L-asparaginase catalyzes the hydrolysis of L-asparagine into L-aspartic acid and ammonia. The purpose of this study was to isolate and identify the L-asparaginase producing *Erwinia* strains from the potato farms of Jiroft.

Materials and methods: Pectolytic *Erwinia* species isolated from crumbling potato in M9 medium. The desired L-asparaginase producing bacteria were isolated based on the color changes. Biochemical-microbial and the plant pathogenicity tests of these strains were also investigated with potato and geranium. The L-asparaginase production and molecular detection of these *Erwinia* strains were also investigated.

Results: In this study, L-asparaginase producing *Erwinia* was isolated on the CVP and M9 mediums. The inoculation of *Erwinia* strains on the potato and geranium plants showed that Er8 and Er11 species have the ability to cause plant pathogenicity. Results showed that the maximum pathogenicity of Er8 and Er11 was observed after 48 and 15 h of inoculation in potato and geranium plants, respectively. 16S rDNA sequencing and phylogenetic analyses exhibited that Er8 and Er11 strains were similar to *Erwinia chrysanthemi* with 98% homology.

Discussion and conclusion: Because of several applications of the *Erwinia* L-asparaginase in various fields, isolated *Erwinia* and their L-asparaginase can be suitable for applied utilization.

Key words: L-asparaginase, leukemia, Screening**,** *Erwinia*, Cancer

* Corresponding author
Received: May 23, 2015 / **Accepted:** August 5, 2015