عزل أنزيم Nuclease من العزلة المحلية *Staphylococcus spp.* EH69

عصام حامد حميد

قسم علوم الحياة والأحياء المجهرية/كلية العلوم/جامعة ديالى

تاريخ استلام البحث:2011/4/7 - **تاريخ قبول النشر: 2011/4/26**

الخلاصة

جمعت 138 عينة جلدية من أشخاص أصحاء بعمر 18 – 24 سنة في مدينة بعقوبة. أظهرت النتائج ان 32 عزلة (23.1%) منها تعود لجنس المكورات العنقودية *Staphylococcus spp.* . اختبرت قابلية هذه العزلات على إنتاج أنزيم النيوكليز باستخدام وسط الدنيز الصلب بتكوينها هالة شفافة حول النمو. انتخبت العزلة EH69 *Staphylococcus spp.* كونها الأكفأ في إنتاج الأنزيم باستخدام المزارع المغمورة. أظهرت النتائج أن أفضل وسط لإنتاج الأنزيم هو وسط مرق نقيع القلب والدماغ المدعم بالكلوكوز وبيكربونات الصوديوم عند رقم هيدروجيني مقداره 8 والملقح بنسبة لقاح 3% ودرجة حرارة 35م° .

الكلمات المفتاحية: المكورات العنقودية، النيوكليز، الظروف المثلى.

المقدمة

عرف التحلل الانزيمي للأحماض النووية لأول مرة في بدايات القرن العشرين من قبل Araki سنة 1903 وأطلق Iwanoff في نفس السنة مصطلح Nucleases على الإنزيمات التي تتوسط عملية تحليل الأحماض النووية (1).

لأنزيمات النيوكليز تطبيقات مهمة في مجالات عدة منها تحديد الخرائط الكروموسومية للكائنات الحية، وتعد مؤشرات جيدة للعمل الجنائي والتنبؤ بتطور السرطان وعلاجه والسيطرة على تعبير بعض الجينات عن طريق تحطيم جزيئة الرنا المرسال mRNA وفي تنقية الأحماض النووية وإزالة الأحماض النووية من مستخلص الخلية عندما يراد تنقية بروتينات معينة وعلاج مرض Cystic fibrosis وغيرها من التطبيقات المتعددة (1، 2).

تنتج النيوكليزات من مصادر ميكروبية مختلفة من أمثلتها *Serratia marcescens* و *Streptococcus pyogenes* و *Basidiobolus haptoporus* ، علاوة على بكتريا *Staphylococcus aureus* قيد الدراسة وأجناس أخرى فضلا عن النيوكليزات المعزولة من المصادر الحيوانية والنباتية (3، 4، 5).

تنتج سلالات بكتريا *Staphylococcus aureus* عددًا من الأنزيمات الفعالة والمؤثرة خارج الخلية (Extracellular enzymes) تزيد من قدرتها على اختراق أنسجة المضيف، وتعد هذه الأنزيمات من عوامل الامراضية لوجودها في السلالات الأكثر ضراوة (6). يعد الأنزيم المحلل للحامض النووي وهو احد الأنزيمات التي تعمل على تحليل الأحماض النووية عن طريق إزالة البلمرة DNA وينتج بنوعين الأول يدعى الأنزيم المحلل للحامض النووي (Depolymerization) الحساس للحرارة والآخر مقاوم للحرارة، ويثبط نشاط هذا الأنزيم بفعل الأنزيمات المحللة للبروتين (7، 8).

اكتشف أنزيم (micrococcal nuclease) *Staphylococcus* nuclease (EC 3.1.4.7) لأول مرة من قبل Cunningham وزملاءه في مزارع لسلالات ممرضة لبكتريا *Staphylococcus aureus*، حيث لاحظو أن الأنزيم المذكور عبارة عن بروتين امتاز بالثبات الحراري العالي (9). تتكون جزيئة الأنزيم من 149 ثمالة حامض أميني ووزن جزيئي 16807 دالتون، وهي خالية من مجاميع السلفهايدرل والأواصر ثنائية الكبريتيد. يحفز الأنزيم تحلل الآصرة ثنائية الاستر للحامضين النووين DNA و RNA ومحررا نيوكليوتيدات أحادية ذات طرف 3 فوسفات (10). استغل أنزيم Staphylococcal nuclease لعدة سنوات كنظام نموذجي لدراسات حول عملية انطواء البروتين، الثباتية، التغايرية heterogeneity، الحركيات فضلا عن علاقات التركيب-الوظيفة للبروتين (11).

تعد عملية تهيئة الوسط الغذائي مرحلة أساسية لنجاح العملية الإنتاجية، إذ أن مكونات الوسط يجب أن تفي بالمتطلبات الأساسية لإنتاج كتلة الخلية والايض فضلا عن كونها يجب أن تكون مناسبة لتجهيز طاقة التخليق الحيوي وبقاء الخلية (12). تحتوي بيئة الوسط المركبات الكربونية والنتروجينية والأملاح العضوية، والماء، والفيتامينات، وعوامل النمو الأخرى، ومولدات Precursors نواتج التخمر، وأوكسجين مذاب وغازات أخرى، ومنظمات الحموضة، ومضادات الرغاوي، ومتحلل Lysate الخلايا الميتة، ونواتج التخمر (13). هدفت هذه الدراسة الى دراسة ظروف الإنتاج المثلى لأنزيم الدنيز من عزلة محلية لبكتريا *Staphylococcus aureus*.

المواد وطرائق العمل

العزل والتشخيص:

تم عزل بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus spp.* من مجموعة من العينات التي جمعت من مسحات جلدية لأشخاص أصحاء بعمر 18 – 24 سنة في مدينة بعقوبة وتضمنت 138 عينة بواقع 4 مسحات من كل متبرع من مناطق (الجبهة والوجنة والرقبة والذراع) باستخدام مسحات قطنية معقمة ومرطبة بالمنظف (0.1%) Triton x-100 في محلول الفوسفات الدارىء ذي الرقم الهيدروجيني 7.9 وزرعت على وسط البيتون الصلب (14). تم تشخيص العزلات قيد الدراسة وفقا لما ورد في (15).

اختبار قدرة العزلات في تحليل الدنا على الوسط الصلب:

اختبرت قابلية العزلات على إنتاج الأنزيم بزرعها على وسط اختبار الدنيز الصلب المحضر وفقا لتعليمات الشركة المجهزة بطريقة Spotting وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37م^0 لمدة 24 ساعة. غمر سطع الوسط الصلب بمحلول 1 عياري حامض الهيدروكلوريك المبرد (16). قيس قطر الهالة الشفافة المتكونة حول النمو البكتيري بالمليمتر.

تحديد العزلة الأكفأ على إنتاج الأنزيم في الوسط السائل:

اختيرت العزلات التي أعطت اكبر قطر هالة حيث نشطت في وسط نقيع القلب والدماغ السائل في حاضنة هزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 37م^o لمدة 24 ساعة بواقع 50 مللتر لكل دورق. لقح وسط الغربلة بحجم لقاح 1% وحضنت الدوارق في حاضنة هزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 37م^o لمدة 24 ساعة. بعد انتهاء مدة الحضن قيست الفعالية الإنزيمية للطافي حسب (17) مع بعض التحوير وقدر تركيز البروتين بإتباع طريقة برادفورد (18) .

تقدير فعالية أنزيم النيوكليز:

قدرت فعالية النيوكليز المنتج في راشح المزرعة وفق الطريقة الموصوفة من قبل (17) مع بعض التحوير باستعمال الدنا المحضر من غدة ثايموس العجل في قسم علوم الحياة والأحياء المجهرية/جامعة ديالى كمادة أساس بنقاوة مقدارها 1.6 وتركيز 500 مايكروغرام/مللتر (19). تعرف وحدة الفعالية للأنزيم (مقدار التغير في الامتصاصية عن 1.00 للنيوكليوتيدات الذائبة في الحامض على الطول الموجي 260 نانوميتر بعد مدة حضن مقدارها 20 دقيقة بدرجة حرارة 37م^o).

تقدير تركيز البروتين:

اتبعت طريقة برادفورد (18) لتقدير تركيز البروتين في راشح المزرعة البكتيرية وباستعمال المنحنى القياسي لألبومين مصل الدم البقري (Bovine serum albumen).

دراسة بعض ظروف إنتاج الأنزيم في الوسط السائل:

تحديد الوسط الامثل لإنتاج الأنزيم:

لغرض تحديد الوسط الامثل لانتاج الانزيم اختبرت أوساط زرعية مختلفة شملت وسط المرق المغذي Nutrient Broth-NB، وسط التربتكاز السائل Trypticase Soy Broth-TSB، وسط نقيع القلب والدماغ السائل Brain Heart Infusion-BHI ، حضرت وفقا لتعليمات الشركة المجهزة، وسط نقيع القلب والدماغ السائل المدعم بـ 0.8 غرام % كلوكوز و 4.2 ملغم% بيكربونات الصوديوم BHI-GN حضر وفقا للطريقة الموصوفة من قبل (20)، وسط التربتون السائل Tryptone Broth-TB حضر وفق الطريقة الموصوفة من قبل (21)، وسط الببتون السائل Peptone Broth-PB حضر وفقا للطريقة الموصوفة من قبل (14). لقحت الأوساط الزرعية بحجم لقاح 1% وبواقع 50 مللتر لكل وسط في دورق سعة 250 مللتر. حضنت الدوارق في حاضنة هزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة. بعد انتهاء مدة الحضن قدرت الفعالية الإنزيمية وتركيز البروتين للطافي.

تأثير حجم اللقاح الامثل للإنتاج:

نميت العزلة المحلية *Staphylococcus spp.* EH69 في وسط نقيع القلب والدماغ السائل وحضنت بحاضنة هزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 37م° لمدة 18 ساعة ثم قيست العكارة للمزروع البكتيري على طول موجي 600 نانوميتر فكانت الكثافة الضوئية 1.422 واستعمل لتلقيح الوسط الإنتاجي بحجوم لقاح تراوحت بين (1-10)% ثم حضنت بحاضنة هزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة. بعد انتهاء مدة الحضن قدرت الفعالية الإنزيمية وتركيز البروتين للطافي.

تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل للإنتاج:

حضر الوسط الإنتاجي الامثل BHI-GN بأرقام هيدروجينية تراوحت بين (5–9) وحضنت بحاضنة هزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة، ثم قدرت الفعالية الإنزيمية وتركيز البروتين للطافي.

تحديد درجة الحرارة المثلى للإنتاج:

حضن وسط الإنتاج المعتمد بدرجات حرارية مختلفة تراوحت بين (25-50)م° لتحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج الأنزيم وتم الحضن لمدة 24 ساعة، ثم قدرت الفعالية الإنزيمية وتركيز البروتين للطافي.

النتائج والمناقشة

العزل والتشخيص: جمعت 138 عينة من أشخاص أصحاء بعمر 18 – 24 سنة من مدينة بعقوبة لمناطق مختلفة من الجلد (الرقبة، الجبهة، الذراع، والوجنة). تم تشخيص 32 عزلة تعود لجنس المكورات العنقودية بنسبة 23.1% اعتمادا على الصفات المظهرية والكيموحيوية والفسلجية جدول (1)، حيث ظهرت بشكل مستعمرات دائرية ملساء الحواف مرتفعة قليلا على سطح وسط البيتون الصلب، واظهر الفحص المجهري أن الخلايا ذات شكل كروي موجبة لصبغة كرام متجمعة بصورة ثنائية أو رباعية أو على هيئة عناقيد وهذا يتفق مع ما ذكره (22).

تحديد العزلة الأكفأ لإنتاج النيوكليز:

الغربلة الأولية: أخضعت عزلات *Staphylococcus spp.* جميعها إلى الغربلة الأولية وذلك بتنميتها على وسط DNase Test agar الذي يحتوي على DNA بتركيز 0.2% ، إذ قيست قابلية العزلات على تحليل DNA بقياس قطر الهالة الشفافة حول مستعمراتها بعد 24 ساعة بعد غمر سطح الوسط بمحلول 1 عياري حامض الهيدروكلوريك. أظهرت النتائج وكما موضح في الشكل(2) وجود تباين في قابلية العزلات على إنتاج الأنزيم، حيث تراوح قطر الهالة الشفافة بين 10-30 ملم، وقد امتازت العزلة المحلية EH69 بفعالية عالية في إنتاج النيوكليز على الوسط الصلب إذ أعطت هالة شفافة بقطر 30 مليمتر شكل (1) تلتها العزلة EH70 بقطر 26 مليمتر.

الغربلة الثانوية: انتخبت العزلات EH46 و EH67 و EH69 و EH70 و EH119 التي أعطت أعلى فعالية أنزيمية على الوسط الصلب لغرض تحديد العزلة الأكفأ في إنتاجه في المزارع المغمورة. نميت العزلات المذكورة باستعمال وسط نقيع القلب والدماغ السائل ثم قيست الفعالية وتركيز البروتين لكل عزلة وبموجب النتائج الموضحة في الجدول (2) أظهرت العزلة EH69 تفوقا على باقي العزلات إذ بلغت فعالية الأنزيم النوعية المنتج منها 92.67 وحدة/ملغم بروتين، فيما تراوحت الفعالية النوعية لباقي العزلات بين 58.65 و 63.7 وحدة/ملغم بروتين.

تعيين الظروف المثلى لإنتاج الأنزيم:

تحديد الوسط الامثل للإنتاج:

بينت النتائج ان أفضل وسط لإنتاج النيوكليز من العزلة المحلية *Staphylococcus spp.* EH69 هو وسط نقيع القلب والدماغ المدعم بالكلوكوز وبيكربونات الصوديوم بفعالية نوعية بلغت 137.68 وحدة/ملغم بروتين يليه وسط نقيع القلب والدماغ بفعالية نوعية 105.95 وحدة/ملغم بروتين، وجاء وسط التربتون السائل بمقدار 107.5 وحدة/ملغم بروتين وهي قريبة جدا من الفعالية النوعية لوسط نقيع القلب والدماغ، وبلغت الفعالية النوعية أدناها في وسط البيتون السائل بمقدار 81.15 وحدة/ملغم بروتين الشكل (3). بناء على ذلك يكون وسط نقيع القلب والدماغ المضاف له كلوكوز وبيكربونات الصوديوم هو الوسط الإنتاجي الأنسب لإنتاج الأنزيم. ان وجود سكر الكلوكوز في الوسط يؤدي الى زيادة كبيرة في النمو يقابله انخفاض مطرد في الرقم الهيدروجيني للوسط، وتتم المحافظة على الرقم الهيدروجيني في هذه الحالة بوجود

بيكربونات الصوديوم (23). تتباين الأحياء الدقيقة في نموها على الأوساط الزرعية من أحياء قادرة على النمو بصورة جيدة على أوساط الأملاح المعدنية البسيطة إلى العديد من الأحياء الدقيقة التي تتطلب واحداً أو أكثر من المركبات الكيموحيوية الخاصة لنموها، ويعود ذلك إلى ان بعض تلك الأحياء غير قادرة على تخليق المركبات الكيموحيوية الخاصة بها خصوصاً الفيتامينات والأحماض الامينية، كما ان هناك مجموعة أخرى من الأحياء الدقيقة التي تتصف بكونها شرهة إلى حد بعيد quitefastidious وتتطلب 2-10 مركبات كيموحيوية مصنّعة لنموها (24).

تأثير حجم اللقاح:

يظهر الشكل (4) ان استعمال لقاح بحجم 3% قد أعطى أعلى فعالية نوعية بلغت 154.84 وحدة/ملغم بروتين ثم انخفضت بعد ذلك تباعا مع زيادة حجم اللقاح لتصل إلى 81.23 وحدة/ملغم بروتين بنسبة لقاح 10%. إن الهدف الرئيس من تحضير اللقاح للتخمرات البكتيرية هو إنتاج لقاح نشط active يعطي بعد استعماله أقصر طور تطبع، إذ يتأثر طول طور النمو هذا بحجم اللقاح وحالته الفسلجية. يستعمل اللقاح غالباً بحجم يتراوح بين (3-10)% من حجم الوسط الإنتاجي، وتتأثر كمية اللقاح كذلك بنوع الأحياء المستعملة، ففي حالة استعمال الخلايا البكتيرية سريعة النمو يضاف لقاح بنسبة (0.1-3)% واعتماداً على نوع المواد المراد إنتاجها (25 ، 26).

تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لإنتاج الأنزيم:

تبين النتائج شكل (5) وجود ارتفاع ملحوظ في الفعالية النوعية للأنزيم مع ارتفاع قيمة الرقم الهيدروجيني نحو القاعدية حيث وصلت أقصاها عند الرقم 8 بفعالية نوعية بلغت 165.06 وحدة/ملغم بروتين، كما يلاحظ من الشكل نفسه ان الفعالية النوعية عند الرقم الهيدروجيني 7.5 وهو الرقم الهيدروجيني الامثل لنمو بكتريا المكورات كانت منخفضة وبفارق كبير حيث كانت 120.54 وحدة/ملغم بروتين. عليه فان الرقم الهيدروجيني 8 هو الامثل لإنتاج الانزيم من العزلة المحلية *Staphylococcus spp.* EH69. تقترب هذه النتائج مع ما توصل إليه (27 ، 28) من ان الرقم الهيدروجيني لإنتاج الأنزيم تراوح بين 7.8 to 7.6 . ان القيمة المثلى للرقم الهيدروجيني لإنتاج الأنزيمات قد تختلف عن الرقم الهيدروجيني للنمو (29). يعد الرقم الهيدروجيني احد العوامل البيئية التي ينبغي التحكم به لتحقيق الإنتاج وعلى مستويات عالية من الأنزيمات الميكروبية، وليس بالضرورة ان يتوافق الرقم الهيدروجيني الامثل لإنتاج أنزيم معين من الأحياء المجهرية مع الرقم الهيدروجيني الامثل لنمو تلك الأحياء توافقاً تاماً، فقد يكون هذا مختلفا عن ذلك لأسباب تتعلق بالعوامل الداخل خلوية والخاصة بالتعبير عن الصفات الوراثية عن الأنزيم المراد إنتاجه (30). ويأتي دور الرقم الهيدروجيني الابتدائي للوسط الإنتاجي للأنزيم إلى تأثيره في ذائبية مكونات الوسط الغذائية وجاهزية هذه المكونات للبكتريا فضلا عن تأثيره في تأين وثبوتية المركبات الحيوية الناتجة خلال عمليات التخمر (31).

تحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج الأنزيم:

درس تأثير درجة الحرارة في إنتاج انزيم النيوكليز حيث أظهرت النتائج وكما موضح في الشكل (6) ان الفعالية النوعية للإنزيم وصلت أقصاها عند درجة الحرارة 35م° بفعالية نوعية قدرها 176.33 وحدة/ملغم بروتين، ثم انخفضت مع استمرار ارتفاع درجة الحرارة إلى 50 وبلغت 32.28 وحدة/ملغم بروتين، بهذا عدت درجة الحرارة 35م° هي الدرجة الحرارية المثلى لإنتاج الإنزيم من العزلة المحلية *Staphylococcus spp.* EH69 ، وتتفق هذه النتيجة مع ما أشار اليه (26 ، 27 ، 31) من ان إنتاج النيوكليز من جنس المكورات العنقودية يكون بين 35-37م° . ان لدرجة الحرارة تأثير مهم في إنتاج الأنزيم من الأحياء المجهرية عن طريق تأثيره في ذائبية الأوكسجين بالوسط الغذائي والطاقة الحركية للجزيئات وسرعة التفاعلات الإنزيمية في الخلية. وينعكس ذلك سلبًا أو إيجابا في إنتاج الأنزيم (32).

References

1. Nawin C. Mishra (2002). Nucleases: Molecular Biology and Applications. Wiley-Liss.
2. Kishi, K.; Yasuda, T. & Takeshita, H. (2001). DNase I: Structure, Function, and use in medicine and forensic science. Legal Medicine, 3: 69-83.
3. Desai, N. A. & Shankar, V. (2000). Purification and characterization of the single-strand-specific and guanylic-acid-preferential Deoxyribonuclease activity of the extracellular nuclease from *Basidiobolus haptosporus*. Eur. J. Biochem. 267: 5123-5135.
4. Meiss, G.; Gast, F. & Pingoud, A. M. (1999). The DNA/RNA non-specific *Serraia* nuclease prefers double-stranded A-form nucleic acids as substrates. J. Mol. Biol. 288: 377-390.
5. Higerd, T. B.; & Fowler, S. (1997). Gram Positive Cocci: Staphylococci and Streptococci. In: Virella, G. (edt.). Microbiology and Infectious Diseases. 3rd ed., Williams & Wilkins. Baltimor, Maryland, USA.
6. Ziebandt, A.; Weber, H.; Rudolph, J.; Schmid, R.; Hoper, D.; Engelmann, S. & Hecker, M. (2001). Extra cellular proteins of *Staphylococcus aureus* and the role of Sar A and Sigma B. Proteomics, 1:480–493.
7. Cohen, J.O. (1991). *Staphylococcus* . In Baron, S. (ed.): Medical Microbiology. 3rd ed., pp. 203 – 313. Churchill livingstone, London.
8. Collee, J. G.; Marimun, B.P.; Fraser, A. G. and Simmons, A. (1996). Mackie & Mc Cartne Practical Medical Microbiology.

9. Cunningham, L., B. W. Catlin, and M. Privat de Garilhe (1956). A nuclease of *Micrococcus pyogenes*. J. Am. Chem. Soc. 78: 4642-4645.
10. YE Sheng, WAN Zhuli, ZHOU Bo, JlNG Guozhong and LlANG Dongcai (1997). Crystallization and preliminary X-ray analysis of SNR 141-An N-terminal fragment of staphylococcal nuclease R. Chinese Science Bulletin Vol. 42 No. 11.
11. Wang, J.; Truckses, M. D.; Abildgaard, F.; Džakula, Ž.; Zolnai, Z. and Markley, J. L. (1997). Solution structures of staphylococcal nuclease from multidimensional, multinuclear NMR: Nuclease-H124L and its ternary complex with Ca^{2+} and thymidine-3',5'-bisphosphate. *Journal of Biomolecular NMR*, 10: 143–164.
12. Stanbury, P. F.; Whitaker, A. and Hall, S. J. (2003). Principles of Fermentation Technology. 2ed ed. Butterworth-Heinemann.
13. ساجدي، عادل جورج وعلي، علاء يحيى محمد (1987). الميكروبيولوجي الصناعي، الجزء الأول، أساسيات التخمرات الصناعية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة البصرة.
14. Kloos, W.E.; Tornabene, T.G. and Schleifer, K.H. (1974). Isolation and Characterization of Micrococci from human skin, including two species: microccus lyla and Micrococcus Kristinae. Inter. J. Syst. Bacteriol., 24: 79-101.
15. Colle, J. G.; Marimun, B. P.; Fraser, A. G. and Simmons, A. (1996). Mackie and McCartne: Practical Medical Microbiology. The Churchill Livingstone Inc., USA.
16. Jeffries, C. D., D. F. Holtman, and D. G. Guse. 1957. Rapid method of determining the activity of microorganisms on nucleic acid. J. Bacteriol. 73:590-591.
17. Marker, S. C. & Gray, E. D. (1972). Simple method for the purification of streptococcal nucleases. Appl. Microbiol. 23(2): 368-371.
18. Bradford, M. M. (1976). A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
19. Sambrook, J. and Russell, D. W. (2000). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
20. Fox J. B. and Holtman D. F. (1968). Effect of Anaerobiosis on Staphylococcal Nuclease Production. Journal of Bacteriology. Vol. 95, No. 5. pp. 1548-1550.

21. Weihua, C. & Chengping, P. (2003). Purification of protease from Aeromonas and Using as Immunization factor. HTM. 24. 5. Internt.

22. Holt, J. G.; Krieg, N.R.; Sneath, H.A.; Staley, J.T. and Williams, S.T. (1994). Berge's manual of determinative bacteriology. (9th ed.). Williams and Wilkins, USA.

23. Hardie, J. M. (1986). Gram Positive Cocci. *In*: Sneath, P. A.; Mair, N. S.; Sharpe, M. E. & Holt, J. G. (eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. pp. 1043-1054. Williams & Welkins. USA.

24. Wang, D. I. C.; Cooney, C. L.; Demain, A. L.; Dunnill, P.; Humphrey, A. E. & Lilly, M. D. (1979). Fermentation and Enzyme Technology. John Wiley & Sons.

25. Stanbury, P. F. & Whitaker, A. (1984). Principles of Fermentation Technology. Pergamon Press Ltd.

26. الخفاجي، زهرة محمود (1990). التقنية الحيوية. مطابع دار الحكمة للطباعة والنشر. جامعة بغداد.

27. Moravek L., Anfinsen, C. B., Cone J. L., and Taniuchi H. (1969). The Large Scale Preparation of an Extracellular Nuclease of Staphylococcus aureus. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 244, No. 2, pp. 497-499.

28. Quirk, A. V. and Plank, R. W. H. (1983). The Effect of Carbon Dioxide on the Production of an Extracellular Nuclease of *Staphylococcus aureus.* Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXV, pp. 1083-1093.

29. سميث، جون (1987). أساسيات التقنية الحيوية. ترجمة عبد العزيز حامد ابو زنادة. عمارة شؤون المكتبات، جامعة الملك سعود. الرياض.

30. Reed, G. (1975). Carbohydrates. In: Enzymes in Food processing, 2nd, Academic press. New York.

31. Bull, A. T. and Bushnell, M. E. (1976). Environmental control of fungal growth. *In*: The filamentous fungi. (eds. J. E. Smith and D. R. Berry) Vol. 2: 1-26.

32. Erickson, A. and Deibel, R. H. (1973). Production and Heat Stability of Staphylococcal Nuclease. Applied Microbiology. Vol. 25, No. 3, pp. 332-336

Isolation of Nuclease from Local Isolate *Staphylococcus spp.* EH69

Esam Hamid Hameed

Department of Biology and Microbiology/College of Science/ Diyala University

Abstract

One hundred thirty eight samples were collected from human skin. Thirty two isolates (23.1%) were found to be *Staphylococcus*. The isolates were subjected to primary and secondary screening for nuclease production. The isolate *Staphylococcus* EH69 was found to be an efficient nuclease producer in submerged culture. The optimum environmental conditions for enzyme production were found to be using Brain Heart Infusion supplement with glucose and sodium bicarbonate medium at optimum pH 8 and inoculum size 3% at 35C°.

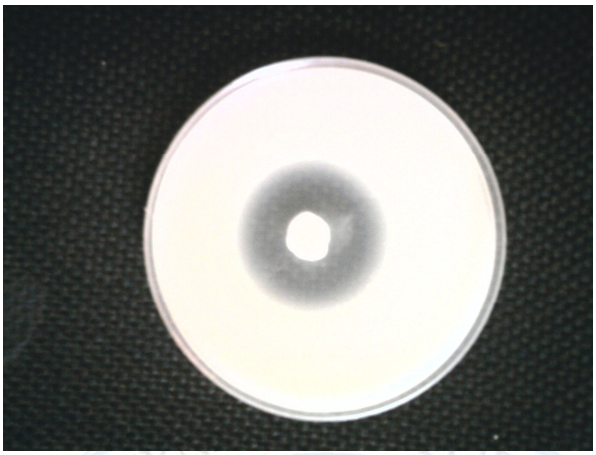
Keywords: *Staphylococcus*, Nuclease Optimization.

جدول (1) تفريق جنس المكورات العنقودية عن باقي الأجناس.

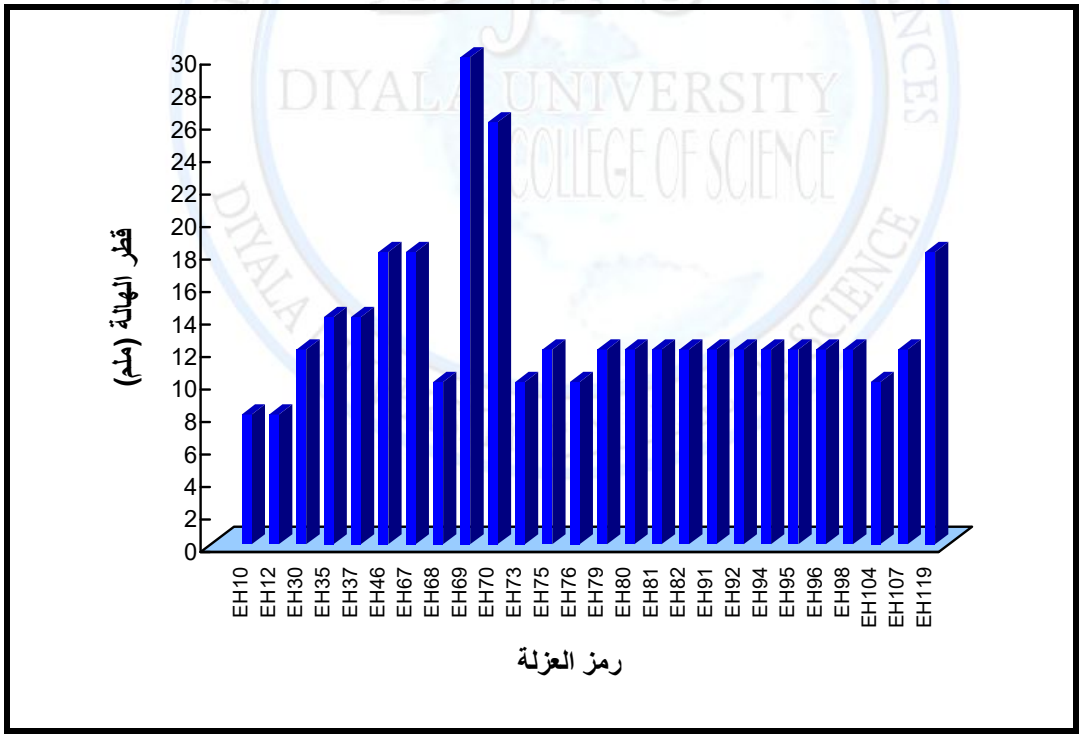
نوع الفحص	النتيجة
النمو لا هوائيا	+
طبيعة استهلاك الكاربوهيدرات	تخمير
إنتاج الكاتليز	+
إنتاج الاوكسيديز	-
مقاومة الباستراسين	+

جدول (2) الغربلة الاولية لعزلات بكتريا *Staphylococcus* spp.

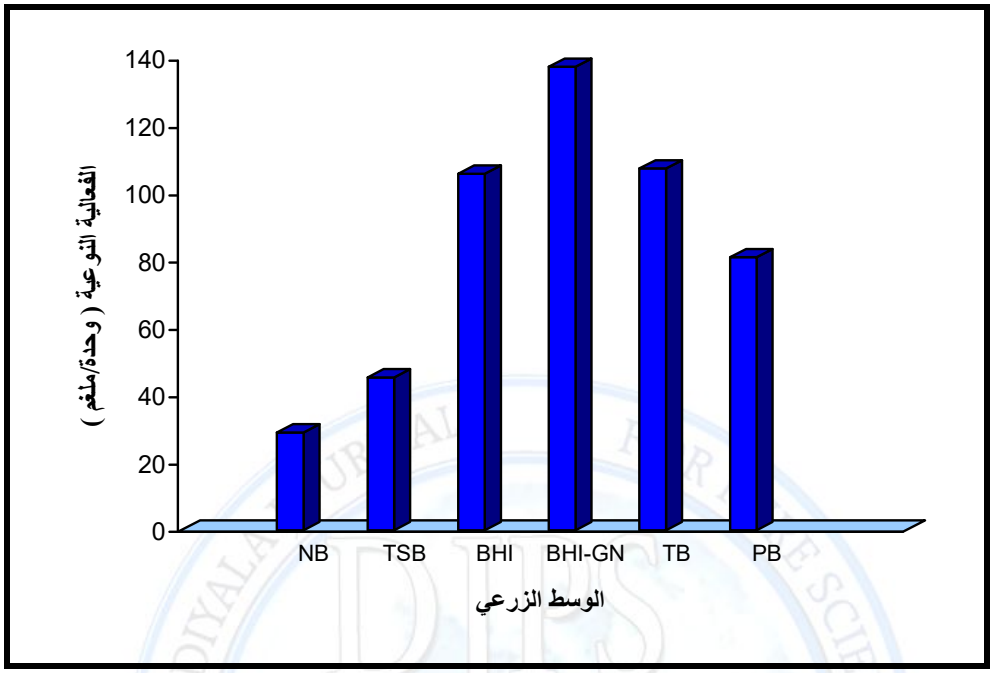
رمز العزلة	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم بروتين)
EH119	58.65
EH70	59.76
EH69	92.67
EH67	60.32
EH46	63.7



شكل (1) انتاج انزيم النيوكليز من العزلة المحلية *Staphylococcus spp.* EH69 على وسط الدنيز الصلب.

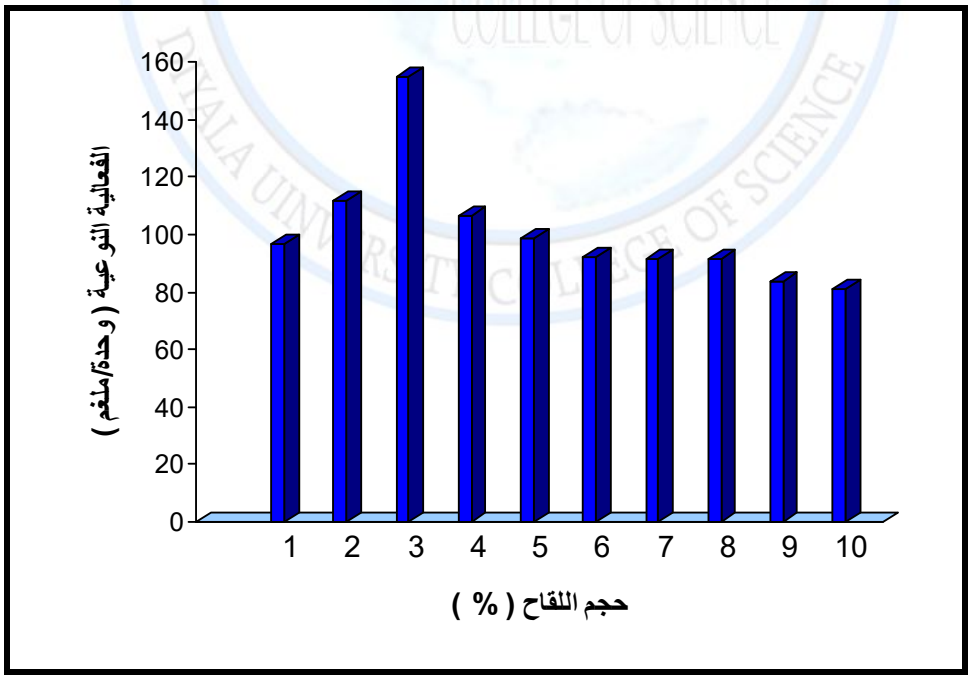


شكل (2) الغربلة الاولية لعزلات المكورات العنقودية المنتجة لانزيم النيوكليز.

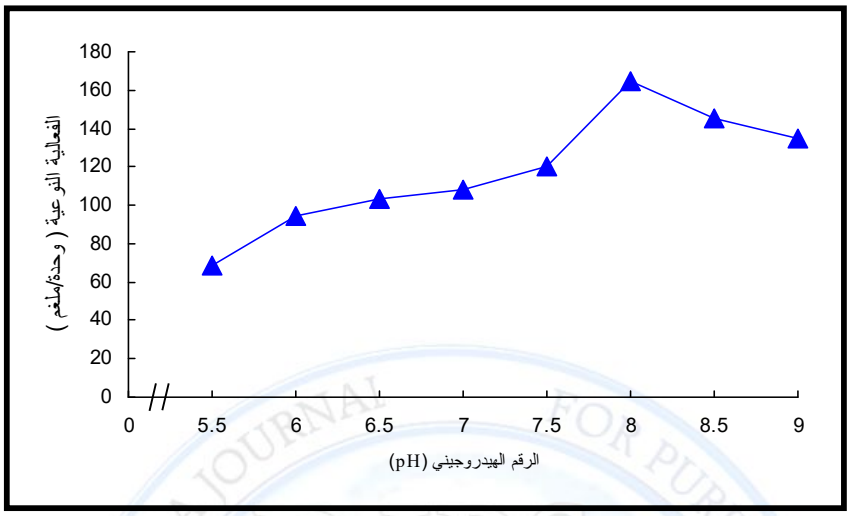


شكل (3) كفاءة أوساط زرعية مختلفة في إنتاج النيوكليز من العزلة المحلية Staphylococcus spp. EH69.

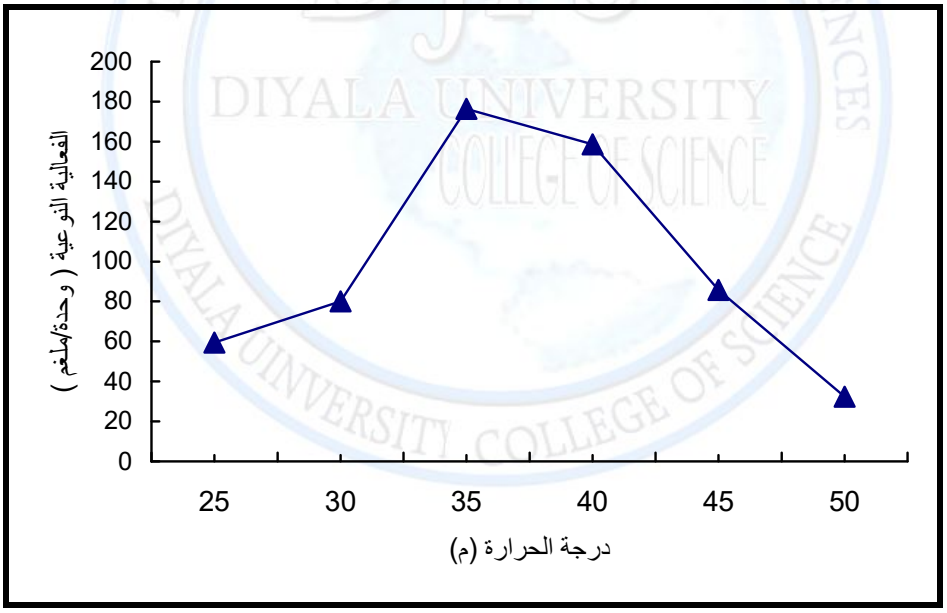
NB: وسط المرق المغذي، TSB: وسط تربتكاز الصويا السائل، BHI: وسط نقيع القلب والدماغ، BH-GN: وسط نقيع القلب والدماغ المضاف له كلوكوز وبيكربونات الصوديوم، TB: وسط التربتون السائل، ، PB: وسط البيتون السائل.



***شكل (4) تأثير حجم اللقاح في إنتاج إنزيم النيوكليز من العزلة المحلية* Staphylococcus spp. EH69**



***شكل (5) تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج إنزيم النيوكليز من العزلة المحلية* Staphylococcus spp. EH69**



شكل (6) تحديد درجة الحرارة المثلى لانتاج إنزيم النيوكليز من العزلة المحلية *Staphylococcus spp.* EH69