دراسة انزيم الحال للبروتين المنتج من *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من حالات سريرية

سمير فتح الله سمعان ،سعود رشيد العاني و رنا مجاهد عبد الله
قسم علوم الحياة ،كلية العلوم ،الجامعة المستنصرية
وزارة العلوم والتكنولوجيا
قسم علوم الحياة ،كلية التربية –ابن الهيثم ،جامعة بغداد

الخلاصة

تم الحصول على (50) عزلة تابعة لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من مجموع (170) عينة معزولة من حالات مرضية مختلفة ، وقد درست حساسية هذه العزلات لبعض المضادات الحيوية فكانت اغلبها مقاومة لمضادات السيفاتكسيم، والسيفتازديم، والجنتاميسين والتوبرمايسين . بينما اظهرت اغلب العزلات حساسية لمضادات الاميكاسين والسبروفلوكساسين في حين كانت جميعها حساسة لمضادات السيفابيم والامبينيم .

أظهرت (86%) من عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* قابليتها على إنتاج إنزيم البروتييز ، وقد تميزت العزلة (2) من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* بانتاجها العالي لهذا الانزيم وقد اختيرت هذه العزلة لتنقية الانزيم الحال للبروتين بوساطة الترسيب بكبريتات الامونيوم والتبادل الايوني – DEAE celluloseوكروماتوغرافيا الترشيح الهلامي بعمود هلام سيفادكسG-100 .

أظهرت النتائج تأثر إنزيم البروتييز الخام ببعض المضادات الحيوية التي أدت إلى انخفاض في فعالية الإنزيم عند زيادة تركيز هذه المضادات .

المقدمة

تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من البكتريا الواسعة الانتشار، إذ تتواجد في التربة، و المياه، و على الفواكه، و الخضر و تتواجد على سطح الجلد للإنسان و الحيوان و على سطح النباتات (1) . تأتي خطورة هذه البكتريا بسبب انتشارها الواسع في المستشفيات و محيطها و تسبب العديد من الإمراض لاسيما الإمراض المكتسبة من المستشفيات (Nosocomial infection) أو الإمراض الحاصلة بعد العمليات الجراحية أو في وحدة العناية المركزة (Intensive care units) (ICUs) (2) .

تعد بكتريا *P. aeruginosa* من اكثر أنواع البكتريا السالبة لصبغة كرام مسببة للإمراض في تاريخ البشرية بسبب مقاومة هذه البكتريا العالية للمضادات الحيوية المختلفة (3). إن استعمال المضادات الحيوية بشكل واسع في علاج هذه البكتريا أدى إلى إحداث المقاومة للمضادات الحيوية . إن امتلاك هذه البكتريا للبلازميدات جعل منها أكثر مقاومة بسبب جينات المقاومة المحمولة على البلازميدات ، و إن هذه الجينات تسبب في حصول و تطور مقاومة للمضادات الحيوية فضلاً عن حصول المقاومة المشتركة للمضادات الحيوية (4) . تعمل بكتريا *P.aeruginosa* على إنتاج العديد من السموم والانزيمات منها (exotoxin A)، (exoenzymes U)،(exoenzymes T) و(exoenzymes S) . تنتج بكتريا *P.aeruginosa* إنزيمات خارج خلوية (Exoenzymes) منها (Phospholipase C) والإنزيمات المحللة للدهون (Lipase S) (5).أما أهم أنواع الإنزيمات التي تفرزها بكتريا *P.aeruginosa* فهو إنزيم (Alkaline protease) . اكتشف هذا الإنزيم لأول مرة عام 1963 و ينتج من العديد من البكتريا منها *Erwinia* و *Serratia* فضلاً عن بكتريا *Pseudomonas*. زيادة على هذا الإنزيم هنالك أنواع أخرى من الإنزيمات لأتقل أهمية في دورها عواملا" ضراوة لهذه البكتريا منها إنزيم (Elastase) المفرزمن البكتريا التي عزلت من حالات التهاب العيون والجروح (6) و (7).

ولغرض دراسة الانزيم الحال للبروتين المنتج من بكتريا *P.aeruginosa* ومقاومتها للمضادات الحيوية جاءت هذه الدراسة تهدف الى عزل وتشخيص بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من حالات مرضية مختلفة والتحري على انتاجها

للانزيم الحال للبروتين وتنقية هذا الانزيم ودراسة فعاليته . فضلا عن ذلك دراسة تأثير بعض المضادات الحيوية في فعالية الإنزيم المحلل للبروتين .

المواد و طرائق العمل

عزل و تشخيص بكتريا *P. aeruginosa*

جمعت (170) عينة من حالات مرضية مختلفة التي تضمنت التهابات الجروح والحروق والاذن الوسطى والمجاري البولية بعد ان شخصوا سريريا من الطبيب المختص وتم جمعها من مستشفى الكاظمية التعليمي في الكاظمية لمدة من 1-5-2005 والى غاية 1-8-2005 وزرعت النماذج على اوساط الزرع الاولي (اكار الدم و الماكونكي). أجريت التحليلات اللازمة لتشخيص البكتريا وحسب الطرائق القياسية المتبعة لذلك. (8) و(9).

اختبار حساسية بكتريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية

اختبرت حساسية عزلات الدراسة للمضادات الحيوية الآتية الاميكاسين (30 مايكروغرام) ، السبروفلوكساسين (5 مايكروغرام)، التوبرامايسين (10 مايكروغرام) ، السيفاتكسيم (30 مايكروغرام) ، السيفتازديم (30 مايكروغرام) ،الجنتاميسين (10 مايكروغرام)،السيفابيم (30 مايكروغرام) والامبينيم (10 مايكروغرام) .استعمل وسط اكار مولر- هنتن لاجراء فحص الحساسية لهذه العزلات .

التحري عن العزلات البكتيرية المنتجة للإنزيم الحال للبروتين

استعمل وسط اكار حليب الفرز (10) 10% من حليب الفرز ونقلت مستعمرات نقية الى وسط الحليب وحضنت مدة (24) ساعة بدرجة(37) م° وقيس قطر منطقة التحلل ثم انتخبت العزلات التي أعطت أوسع قطر لمنطقة التحلل .

استخلاص و تنقية الإنزيم الحال للبروتين(11)

نميت العزلة المنتجة للانزيم على الاوساط السائلة(Luria broth) وحضن بدرجة حرارة (35)م° مدة (48) ساعة في حاضنة هزازة بسرعة (130 دورة / الدقيقة) ، نبذ العالق البكتيري بجهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة (6000) دورة / دقيقة مدة (20) دقيقة وتم ترشيح المستخلص بمرشحات خاصة Ultra filtration اهمل الراسب

واستعمل الرائق مستخلصا إنزيميا .اجري عليه ترسيب الانزيم باضافة كبريتات الامونيوم بتشبع (80 %) . اخذ الراسب واهمل الراشح وتم ديلزة الراسب باستعمال أكياس الديلزة مدة (24) ساعة ضد محلول الترس HCl (0.2) مولاري ثم اضيف الانزيم الخام الناتج من عملية الترسيب بمقدار (5 مليليتر) الى عمود التبادل الايوني DEAE-cellulose بطول (30 × 1.5) سم وباضافة التـــرس HCl (0.2) مـــولاري وجمـــع محلـــول والاسترداد المار خلال عمود الترشيح في انابيب الجمع وبمعدل (3) مليليتـــر / انبـــوب .قيست الامتصاصية لكل جزء مسترد عند طول موجي (280) نانوميتر ورسم المنحني الذي يظهر قيم الامتصاصية . ثم اجري الترشيح الهلامي باستعمال هلام السيفادكس -G . 100

تقدير فعالية الإنزيم

تم تقدير الفعالية الانزيمية (10) وذلك بإضافة (0.1) مل من محلول الإنزيم الخام إلى أنبوبة حاوية على (0.8) مل من (0.2) مولا ري من Tris – HCl برقم هيدروجيني (8) و(0.5) مل من محلول الكازين (0.5) % . حضنت أنابيب التفاعل بدرجة(37) م° مدة (20) دقيقة ثم أوقف التفاعل بإضافة (3) مل من محلول (5%) TCA وقدرت الفعالية الانزيمية اعتمادا على المعادلة الاتية :

فعالية الإنزيم (وحدة / مل) = الامتصاص عند طول موجي (280 نانوميتر) / حجم المحلول الإنزيمي (0.2) × زمن التفاعل(20 دقيقة) × مقدار الزيادة في الامتصاص لكل وحدة انزيمية (0.001)

تقدير تركيز البروتين

تم تقدير تركيز البروتين حسب ماذكر(Whitaker and Granum, 1980)(12) وذلك بتطبيق القانون الآتي :

تركيز البروتين (ملغم / مليليتر) =(امتصاص عند طـــول مـــوجي 253 نـــانوميتر – امتصاص عند طول موجي 280 نانوميتر) / 2.51

درسة تأثير بعض المضادات الحيوية في فعالية الإنزيم الحال للبروتين الخام

نميت البكتريا في وسط نقيع القلب والدماغ السائل والحاوي على تراكيز مختلفـــة (0.05 ,0.1 , 0.2) ملغم / مل لكل من مضادات السبروفلوكساسين Ciprofloxacin ،

التوبراماسين Tobramycin و السيفتازديم Ceftazidime . بعدها حضنت بدرجة حرارة (37) م° مدة (24) ساعة في حاضنة هزازة بعدها نبذت المزارع البكتيرية بعد انتهاء مدة الحضن و قدرت الفعالية الإنزيمية في الراشح (13) .

النتائج

تم الحصول على (50) عزلة تابعة لبكتريا *P. aeruginosa* من اصل (170) عينة من حالات مرضية مختلفة وقد تم شخيصت العزلات حسب ما أشار إليه كل من (8) ،(9) . اظهرت بعض العزلات مقاومتها لمضادات Cefotaxime(80%)، ولمضاد Ceftazidime(78%) ولمضاد Gentamicin (52%) . إما لمضاد Tobramycin فكانت نسبة المقاومة (26%) فيما كانت المقاومة قليلة جدا لكل من مضادي Amikacin(6%) و Ciprofloxacin(4%) في حين لم تظهر اي مقاومة لكل من مضادي imipenem و cefepime ويمكن ملاحظة النسب المئوية لمقاومة البكتريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية المختلفة في شكل (1).

اظهرت نتائج هذه الدراسة ان هناك تباينا" في قدرة بكتريا *P. aeruginosa* على انتاج انزيم الحال للبروتين اذا بلغت (86%) وكانت اقطار منطقة التحلل الشفافة حول المستعمرات البكتيرية المنتجة للانزيم الحال للبروتين تتراوح بين (6–20) ملم واختيرت العزلة (2) *P. aeruginosa* لاستخلاص وتنقية هذا الانزيم لانها اعطت اعلى انتاجية من بين العزلات .

ركزّ الإنزيم باستعمال كبريتات الامونيوم و بنسبة إشباع (80)% بكونه خطوةً أولى للتنقية وتم الحصول على فعالية إنزيمية (125.3)وحدة/ مل وبفعالية نوعية(112.77) وحدة / ملغم بروتين وعدد مرات تنقية (1.51) و بحصيلة إنزيمية (30.23) . مرر محلول الإنزيم الناتج من الخطوة السابقة بعد الديلزة خلال عمود التبادل الايوني باستعمال المبادل الايوني DEAE – Cellulose وتم الحصول على ثلاث قمم وظهور فعالية إنزيمية عند الأجزاء المحصورة بين (31–44) و تم الحصول على عدد مرات تنقية بلغت (8.83) وبحصيلة إنزيمية (23.32 %) ، وفعالية إنزيمية

(145) وحدة / مل ، وفعالية نوعية (659.09) وحدة / ملغم بروتين ، ويبين الشكل (2) كروماتوكرافيا التبادل الايوني باستعمال DEAE – Cellulose .

جمعت الأجزاء الفعالة من خطوة التبادل الايوني بعد تركيزها ومررت خلال عمود الترشيح الهلامي باستعمال هلام سيفادكس Sephadex G100 تم الحصول على ثلاث قمم للبروتين و قمة واحدة للفعالية تركيز ضمن القمة الثالثة و المحصورة بين الأجزاء (28-30) وتم الحصول على الفعالية الإنزيمية (170) وحدة / مل ، وفعالية نوعية (1000) وحدة / ملغم بروتين ، وعدد مرات تنقية (13.40)، و بحصيلة إنزيمية (18.23 %) . يبين الشكل (3) كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام Sephadex G100 .

لإيجاد العلاقة بين تأثير المضادات الحيوية وفعالية الإنزيم الخام المحلل للبروتين المفروز من بكتريا *P .aeruginosa* فقد درس تأثير كل من مضادات Ceftazidime ، Tobramycin و Ciprofloxacin وبتراكيز مختلفة (0.05 ، 0.1 و 0.2) مايكرو غرام / مل و لكل مضاد على فعالية الإنزيم وجد أن فعالية الإنزيم الخام تقل بازدياد تراكيز المضادات ويمكن ملاحظة تاثير المضادات الحيوية في فعالية انزيم الحال للبروتين الخام في الجدول (1) .

المناقشة

تم الحصول على (50) عزلة تابعة لبكتريا *P .aeruginosa* المعزولة من حالات مرضية مختلفة . تعد بكتريا *P. aeruginosa* من أكثر أنواع البكتريا المسببة لإصابات المستشفيات (Nosocomial infection) وقد عزلت من حالات مرضية مختلفة و لاسيما من التهابات ما بعد العمليات الجراحية (14). في أغلب الدراسات وجد أن بكتريا *P. aeruginosa* هي المسبب الرئيس لالتهابات الجروح والحروق إذ عزلت (149) عزلة من أصل (366) عينة لمصابين بالتهاب الجروح و الحروق بسبب بكتريا *P. aeruginosa* (15)، في حين بينت دراسة اخرى (16) إن أعلى نسبة لبكتريا *P. aeruginosa* كانت معزولة من حالات التهاب المجاري البولية تليها من حالات التهاب الجروح بيّنت الدراسات إن هذه البكتريا تسبب بالدرجة الأولى التهاب الإذن الوسطى

وبعدها التهاب المجاري البولية وأخيرا التهاب الجروح (17) تسبب هذه البكتريا العديد من الالتهابات ولاسيما التهاب الجروح والحروق ولاسيما في المرضى الراقدين في غرف العناية المركزة (18)،(19) .

أظهرت نتائج الدراسة تبايناً واضحاً في تأثير المضادات الحيوية في بكتريا *P. aeruginosa* لمضادات Cefotaxime و Ceftazidime وجاءت متفقة مع العديد من الدراسات (20) اذ بينوا إن أعلى مقاومة لهذه البكتريا كانت لمضاد Ceftazidime إذ بلغت (76%) و يعد هذا المضاد Ceftazidime من مضادات الجيل الثالث للسيفالوسبورينات التي تستعمل بكثرة في الدول المتقدمة و بعض الدول الأخرى منها الهند (21). إن من أهم أسباب المقاومة للمضادات الحيوية يعود السبب إلى امتلاك البكتريا لآليات المقاومة التي تضمنت تغيير في نفاذية الغشاء الخارجي وإنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز التي تعمل على مقاومة مضادات البيتالاكتام (22)،(23) . فضلاً عن امتلاك البكتريا لنظام الدفق الذي يجعلها مقاومة للعديد من المضادات الحيوية (24) . وبينت دراسة ان نسبة المقاومة لمضاد Gentamicin كانت (58%) و Tobramycin (48%) واقل مقاومة وجدت لمضاد Amikacin إذ بلغت (23%) (16) اما بالنسبة لمضاد Ciprofloxacin فقد اتفقت النتائج الحالية مع دراسات سابقة (25) الذي بيّنت إن أعلى حساسية لبكتريا *P. aeruginosa* كانت لمضاد Amikacin (90%) و Ciprofloxacin كانت (76%). أمافي دراسة اخرى فبينوا إن حساسية بكتريا *P.aeruginosa* كانت لمضاد Ciprofloxacin (95.8 %) (26) ، أما لمضاد Amikacin (83%) وهذا المضادان فعالان المضادين فعالين عند إعطائهما لحالات التهاب الإذن الوسطى المزمن . اما بالنسبة لمضادي imipenem و cefepime فكانت نسبة الحساسية (100%) واتفقت النتائج مع دراسة التي بينت ان اعلى حساسية كانت لمضادي imipene و cefepime (27) .

تم نقي الإنزيم بخطوات عديدة التي شملت الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة تشبع (80) % وتستعمل هذه الخطوات ليتم معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين بفعل الملح والإخلال بطبيعة الماء المحيطة بجزيئات البروتين مما يؤدي إلى خفض ذائبية البروتين و ينتج عن ذلك ترسيبه (28) . وأعقبها استعمال كروماتوغرافيا

التبادل الايوني باستعمال DEAE–Cellulose والنتائج الحالية اتفقت مع عـدد مـن الدراسات في تنقية الانزيم باستعمال DEAE–Cellulose بكونها خطوةً ثانيـة للتنقيـة ومنها دراسة عندما فصلوا الإنزيم من بكتريـا *P. aeruginosa* بعـدها الخطـوة الترشيح الهلامي باستعمال هلام سيفادكس Sephadex G100 خطوة نهائية لعملية تنقية الانزيم (29).

لإيجاد العلاقة بين تأثير المضادات الحيوية وفعالية الإنزيم الخام المحلل للبروتين المفروز من بكتريا *P .aeruginosa* فقد وجد أن فعالية الإنزيم الخام تقل بازدياد تراكيز المضادات وجاءت هذه النتائج متفقة مع دراسة بينت إن بعض المضادات، مثل مـضاد Tobramycin ، Ceftazidime و Ciprofloxacin تعمـل علـى تثبـيط فعاليـة الإنزيمات خارج خلوية و من ضمنها إنزيم البروتييز عند معاملتها بهـذه المـضادات . (13)

المصادر

1.Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.(2004).Todar 's online Textbook of Bacteriology

2. Olayinka, A. T.; Onile, B. A. and Olayinka, B.O. (2004). Annals of African Medicine. 3 (1):13-16.

3. Obritsch, M.D.; Fish, D.N.; Maclaren, R. and Jung, R. (2004). Antimicrobial Agent and Chemotherapy. 48 (12): 4606-4610.

4. Marthez, J. L. and Baquero, F. (2002). Clinical Microbiology Reviews. 15 (4): 647-679.

5.Folders, J.; Thomason, J.; Van -Loon, L.C. And Bitter, W. (2000). . Journal of Bacteriology. 182 (5): 1257-1263.

6.Lomholt, J. A.; Poulsen, K. and Kilian, M. (2001). Infection and Immunity. 69 (10): 6284-6295.

7.Feltzer, R.E.; Trent, J.O. and Gray, R.D. (2003). J. Biol. Chem. 278 (Issue 28): 25952-25957.

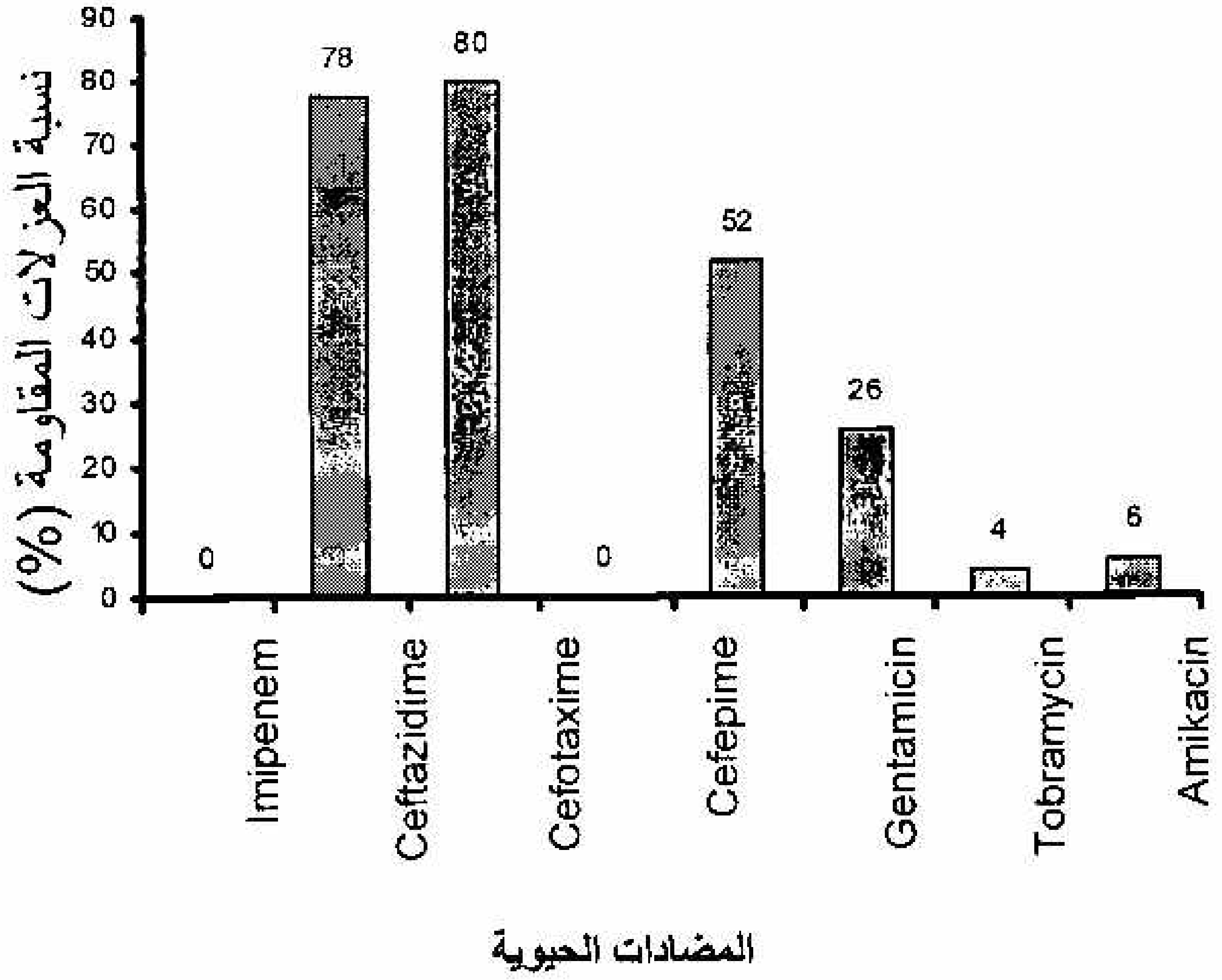
8.Baron, E. J.; Finegold, S. M. and Peterson, I. L. R. (1994). Bailey and Scott's diagnostic microbiology 9th ed. Mosby Company. Missouri.

9.Holt , J. G. ; Krieg , N. R. ; Sheath , P. H. A. ; Staley , J. A. and Williams , S. T. (1994) . Bergy's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins.
10. Senior, B.W. (1999). J. Med. Microbial. 48: 623 -628.
11. Barequet , I.S. ; Ben Simon , G.J. ; Safrin , M. ; Ohman , D.E., and Kessler , E. (2004a) . Antimicrobial Agents and Chemotherapy .48(5): 1681-1687.
12. Whitaker, J. R. and Granum, P. E. (1980). Anal. Biochem. 109: 156-159.
13. Grimwood, K.; To, M.; Rabin, H. R. and Woods, D. E. (1989). Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 33: 41 -47.
14. Van-Delden, C. and Iglewski, B.H. (1998). Emerging infectious Diseases. 4(4):1-13.
15. Pirnay , J.P. ; DeVos , D.; Cochez , C. ;Bilocq , F. ; Pirson , J. ; Struelens , M. ; Duinslaeger , L. ; Cornelis , P. ; Zizi , M. and Vanderkelen , A. (2003) . Journal of Clinical Microbiology. 41(3): 1192-1202.
16. Hsu, D.I.; Okamoto, M.P.; Murthy, R. and Wong-Beringer, A. (2005). Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 22 :1-7
17.Henwood, C. J.; Livermore, D. M.; James, D.; Warner, M. and the *Pseudomonas* study group. (2001). Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 47: 789-799.
18.Farjadian, S.; Kaviani, M. J.; Ghaderi, A. (1996). Irn. J. Med. Sci. 21 (3 and 4):118.
19.Carmeli, Y.; Troillet, N.; Eliopoulos, G. M. and Samore, M. H. (1999).Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 43(6): 1379-1382.
20.Kriengkauykiat, J.; Porter, E.; Lomovskaya, O. and Wong-Beringer, A. (2005). Antimicrobial Agent and Chemotherapy .49 (2):565-570.
21.Puri, J.; Revathi, G.; Kundra, P. and Talwar, V. (1996).. Indian Journal of Medical Sciences. 50 (Issue 7): 239-43.
22.Chanal , C. ; Bonnet , R. ; Champs , C.D. ; Sirot , D. ; Labia , R. and Sirot , J. (2000). Antimicrobial Agents and Chemotherapy.44 (7): 1930-1935.
23.Khurshid, R; Sheikh, M. A.; Karim, S.; Munnawar, F. and Wyne, H. (2002). J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad. 14 (1): 13-15.

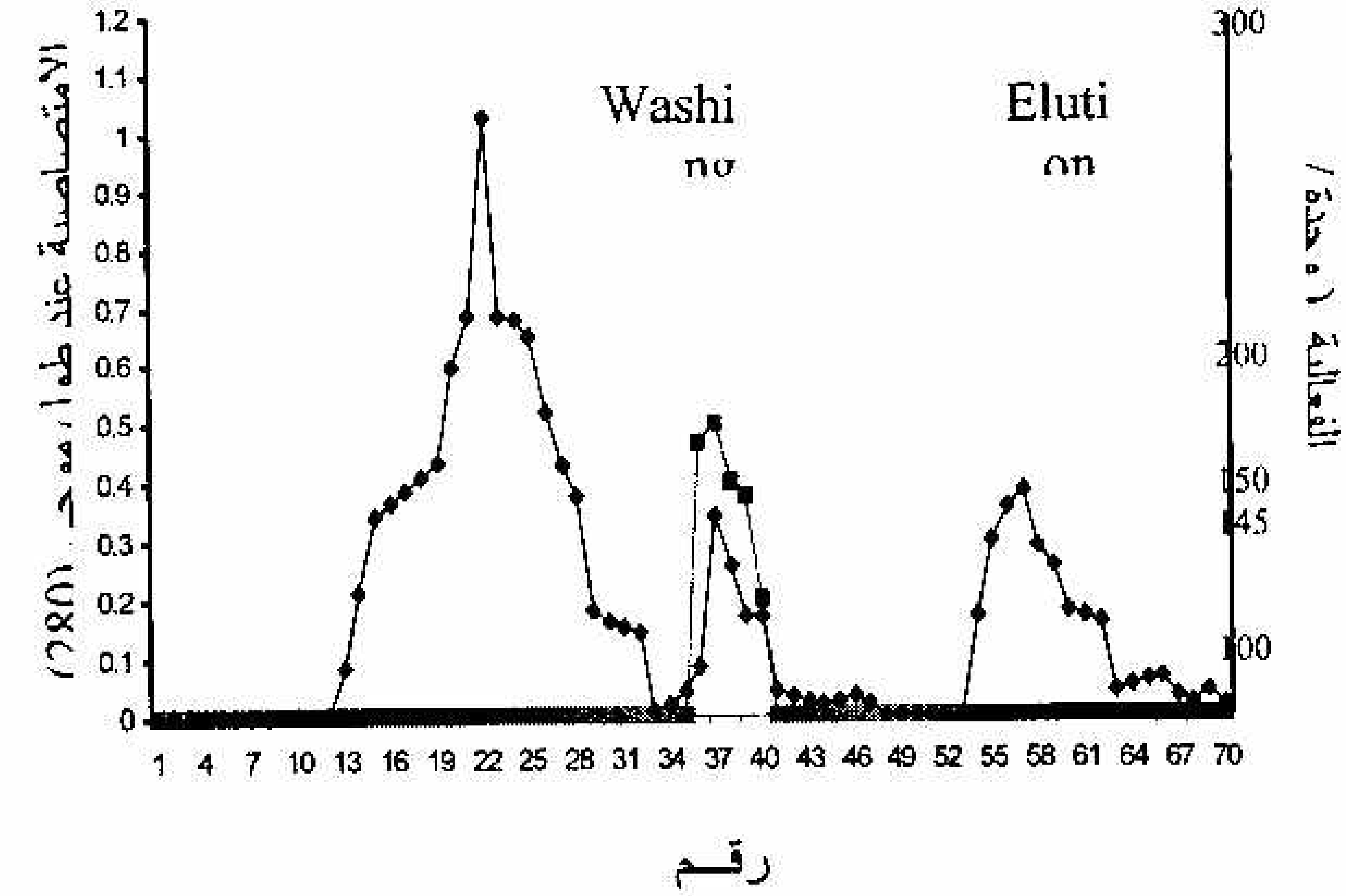
24.DeKievit , J.R. ; Parkins , M. D. ; Gillis , R.J. ; Srikumar , R. ; Ceri , H. ; Poole, K.; Iglewski, B. H. and Storey, D. G. (2001). Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45 (6): 1761-1770.
25.Quinn, J. P. (2003). Seminare in Respiratory and Critical Care Medicine. 24 (1): 61-68.
26.Aslam, M.A.; Ahmed, Z. and Azim, R. (2004). Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan. 20: 459.
27.Flamm , R.K. ; Weaver , M. K. ; Thornsberry , C. ; Jones , M. E. ; Karlowsky , J. A. and Sahm , D.F. (2004) .Antimicrobial Agent and Chemotherapy .48 (7): 2931-2436.
28.Scopes, R. K. (1987). Protein purification principles and practice. 2nd ed. Springer Verlag, New York.
29.Cahan , R. ;Axelrad , I. ; Safrin , M.; Ohman ,D.E. and Kessler , E.(2001). J. Biol. Chem. 276 (Issue 47) 23: 43645-43652.

جدول (1) يبين تأثير بعض المضادات الحيوية على فعالية إنزيم البروتييز الخام .

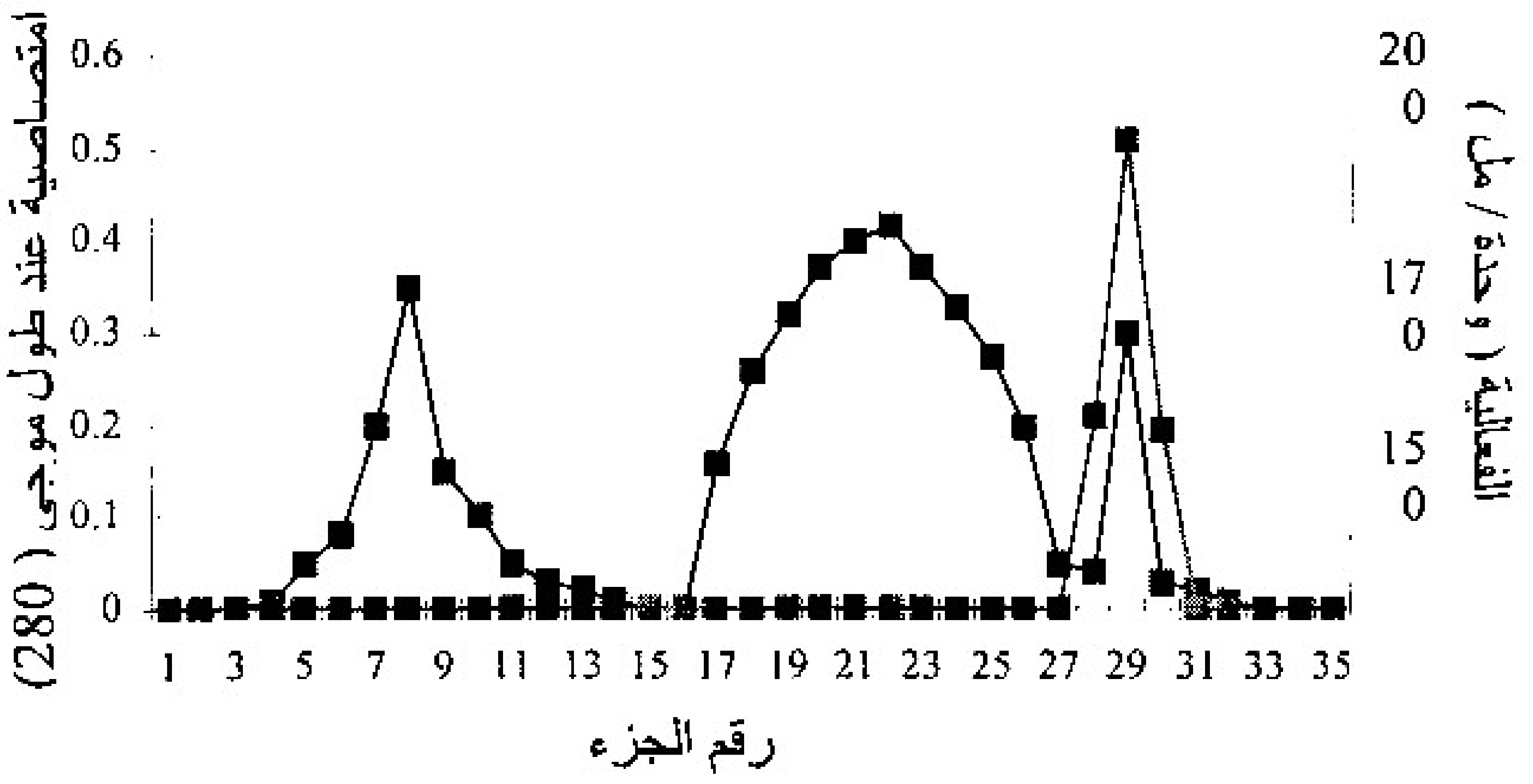
الفعالية الإنزيمية (وحدة / مليليتر)			قيم التركيز المثبط الأدنى MIC(µg/ml)	
Ceftazidime	Tobramycin	Ciprofloxacin		
32.5	28.5	13	0.2	Total proteases
62.5	34	28.5	0.1	
75	64.25	39.25	0.05	
125	125	125	Control	



شكل (1) النسبة المئوية لمقاومة بكتريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية المختلفة



شكل (2) كروماتوغرافيا التبادل الايوني باستعمال DEAE –cellulose



شكل(3) كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستعمال هلام سيفادكس G-100

Study on Protease Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Clinical Cases

S. F. Samaan, S. R. AL-Ani, R. M. Abdullah
Department of Biology, College of Science , University of AL-Mustansiria,
Ministry of Sciences and Technology,
Department of Biology ,College of Education Ibn- Al Haitham , University of Baghdad.

Abstract

Fifty isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were obtained from (170) isolates of clinical cases. Sensitivity of the isolates to antibiotic leveled showed a high resistance to cefotaxime, ceftazidime, gentamicin and tobramycin. To less extent was the resistance to amikacin and ciprofloxacine. All isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were highly sensitive to cefepime and imipenem.

Eighty six percent of the isolates of *Pseudomonas aeruginosa* produced protease enzyme .The isolate Number (2) of *Pseudomonas aeruginosa* gave the highest production of this enzyme. This isolate was selected for protease purification, using ammonium sulfate precipitation and ion exchange DEAE-cellulose and gel filtration with sephadex G-100.

Enzyme activity was affected by some antibiotics. The activity was reduced with increasing concentrations of these antibiotics.