P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2009 ,(3), (3) :00-00

مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (*JUAPS*)

Open Access

تنقية وتوصيف انزيم البروتييز Protease من بكتريا الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من بعض التهابات الجروح والحروق.

رنا مجاهد عبدالله الشويخ* سعود رشيد العاني** سمير فتح الله سمعان***

*جامعة بغداد – كلية التربية ابن الهيثم

**وزارة العلوم والتكنولوجيا

***الجامعة المستنصرية – كلية العلوم

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: ٢٠١٣/٠٠/٠٠
تاريخ القبول: ٢٠١٤/٥/٦
تاريخ النشر: ١٤/ ٦ / ٢٠١٢
DOI: 10.37652/juaps.2009.15593

الكلمات المفتاحية:

تنقية،
توصيف،
Protease ،
Pseudomonas aeruginosa ،
الجروح والحروق.

الخلاصة:

شخصت (24) عزلة من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*، إذ تضمنت(٨) عزلات من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* (٣٣%) من حالات التهاب الجروح، (١٦) عزلة (٦٦%) من التهابات الحروق. اختبرت حساسية بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* ضد (١٠) مضاداً حيوياً وقد أظهرت العزلات تباينا واضحا وبنسب مختلفة في مقاومتها للمضادات الحيوية. إذ أظهرت بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* نسبة المقاومة (١٠٠%) تجاه مضادات الامبسلين. بينما بلغت نسبة المقاومة لمضادات السيفاكسيم، والسفتازديم (95.8%)، (٧٩%) على التوالي. وبلغت نسبة المقاومة لمضادات التوبرامايسين، البيراسيلين، النورفلوكساسين والسبروفلوكساسين (41.6%)، (20.8%)، (20.8%) و(٤%) على التوالي. في حين أظهرت جميع العزلات لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* حساسية عالية (١٠٠%) تجاه مضادات الازترونام، امبينيم والسيفابيم. درست الظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز باستعمال وسط لوريا عند رقم هيدروجيني(٨) ولمدة(٤٨)ساعة من الحضن بدرجة حرارة(٣٥)م°. نقي إنزيم البروتييز المنتج من العزلة PsaW2 *Pseudomonas aeruginosa* باستعمال كروماتوغرافيا التبادل الايوني DEAE–cellulose وكروماتوغرافيا الترشيح الهلامي بعمود هلام سيفادكسG-100. قدر الوزن الجزيئي للإنزيم المنقى بطريقة الترشيح الهلامي بعمود هلام سيفادكسG-100 وكان (21379) دالتون، وبلغت درجة الحرارة المثلى لفعالية البروتييز(٣٥)م° والرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية وثبات الإنزيم كانت(٨). أوضحت نتائج تأثير بعض المثبطات والعوامل المختزلة والكلابية في فعالية الإنزيم، إن فعالية الإنزيم قد ازدادت عند معاملته بايونات Ca^{++} و Zn^{++} مما يدل أنها تلعب دوراً في تحفيز وثبات الإنزيم، ولم تثبط فاعلية الإنزيم بوجود العوامل المختزلة مثل السستين ، بينما تثبط فعالية الإنزيم بوجود العوامل الكلابية EDTA.

المقدمة:

تعد بكتريا *P.aeruginosa* من أنواع البكتريا المسببة للعديد من الإمراض لاسيما إصابات المستشفيات (Nosocomial infections) وذلك لانتشارها الواسع في البيئة ولاسيما بيئة المستشفيات إذ جاءت هذه البكتريا بالمرتبة الثانية بين الأنواع التي تسبب الإمراض السريرية في المملكة المتحدة لاسيما حالات ذات الرئة في وحدة العناية المركزة.

* Corresponding author at: University of Baghdad - College of Education Ibn Al-Haytham, Baghdad, Iraq;
E-mail address: *scianb@yahoo.com*

ونسبة الإصابة بهذه البكتريا حوالي (11.4%) في كل من أمريكا اللاتينية وأسيا، إما في أوربا فكانت نسبة الإصابة (9.3%)، في المملكة المتحدة (8.7%) وأخيرا في كندا كانت نسبة الإصابة(8.6%)(١). بكتريا *P.aeruginosa* تسبب أمراض الجهاز التنفسي لاسيما مرض التليف الكيسي إذ وصلت نسبة الإصابة بهذا المرض حوالي (60–90)% في مستشفى كوبنهاكن في الدنمارك(٢)، جاءت في دراسة أخرى إن (80%) من التليف الكيسي كانت هذه البكتريا المسبب لهذا المرض إضافة إلى التهابات الحويصلات الرئوية (Bronchiectasis)(٣) وفي دراسة محلية في العراق بين(٤) إن أعلى

نسبة للإصابة ببكتريا *P. aeruginosa* كانت تلك المسببة لالتهاب المجاري البولية ، في حين بينّت دراسات أخرى اجريت في احدى مستشفيات بغداد إن بكتريا *P. aeruginosa* كانت المسبب الرئيس لالتهاب الحروق كانت بكتريا *P. aeruginosa* التي بلغت نسبة الإصابة بها (48.5%). لوحظ إن الكثير من حالات الإصابة ببكتريا *P.aeruginosa* كانت عند الأطفال حديثي الولادة لاسيما في وحدة العناية المركزة (ICU) ، إذ وجد إن هذه الإصابات تنتقل عن طريق المستشفى أوالأشخاص العاملين فيها(٥).

تسبب بكتريا *P.aeruginosa* إمراض أخرى منها التهابات الجروح والتهابات الحروق والتهابات العين والتهابات الجلد وتجرثم الدم وتسبب إمراض عند الأشخاص المصابين بالسرطان والأشخاص الذين يعانون من إمراض نقص المناعة والأشخاص المصابين بالايدز (٦). وتسبب ايضا التهاب المجاري البولية والتهابات الإذن الوسطى والخارجية المزمن والتهاب العيون والتهابات المجاري التنفسية السفلى والتهاب الجهاز الهضمي وذات الرئة وتسمم الدم والتهاب شغاف القلب(Endocarditic) وإصابات الجهاز العصبي المركزي(Central Nervous system infection) وإصابات المفاصل والعظام (Bone and Joint infection) والتهابات المعدة والأمعاء(Gastrointestinal infections) فضلاً عن إصابات الأنسجة الرخوة والجلد(Skin and soft tissue) وتقيح الجلد (Pyoderma)(٧).

تمتلك بكتريا *P. aeruginosa* العديد من عوامل الضراوة والمتمثلة بالسموم والإنزيمات التي تفرزها هذه البكتريا والتي تكون لها اثرا في امراضيتها ومن هذه الانزيمات ،الإنزيمات المحللة للدهون (Lipase) والإنزيمات المحللة للدم (Hemolysin) فضلاً عن الإنزيمات المحللة للبروتين (Protease) ،والتي تعد من الإنزيمات المهمة التي تفرزها بكتريا *P. aeruginosa* (٨).جاءت هدف هذه الدراسة إلى عزل وتشخيص بكتريا *P. aeruginosa* من حالات مرضية مختلفة مع دراسة حساسية هذه العزلات للمضادات الحيوية المختلفة، وتنقية وتوصيف إنزيم البروتييزالمنتج من قبل هذه البكتريا.

المواد وطرائق العمل

عزل و تشخيص بكتريا *P. aeruginosa*:-

جمعت العينات التي تناولتها الدراسة وتحت الإشراف الطبي المختص من حالات مرضية مختلفة وتضمنت (٣٥ مسحات الجروح ،٤٧ مسحات الحروق)، وزرعت النماذج على وسطي الدم و الماكونكي، وأجريت التحليلات البايوكيمائية اللازمة لتشخيص البكتريا وحسب الطرق القياسية المتبعة لذلك (٩) .

اختبار حساسية بكتريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيويه:-

درست حساسية بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من حالات مرضية مختلفة عن طريق إجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية واعتمدت طريقة(Kirby Bauer)(١٠)وكانت المضادات ازترونام (٣٠مايكروغرام) ، السبروفلوكساسين (٥ مايكروغرام)، التوبرامايسين (١٠مايكروغرام)،السيفاتكسيم (٣٠مايكروغرام) ،السيفتازديم (٣٠ مايكروغرام) ،السيفابيم (٣٠مايكروغرام) والامبينيم (١٠مايكروغرام)،النوفلوكساسين(١٠مايكروغرام)،الامبسلين (١٠ مايكروغرام) والبيراسلين.

تعيين الظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز :-

درست درجة الحرارة المثلى وذلك باستعمال درجات حرارة مختلفة (٢٠ ، ٢٥ ، ٣٠ ، ٣٥ ، ٤٠)م°، بعدها قدرت الفعالية الانزيمية،اما تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الإنزيم فاستعمل ارقام هيدرجينية مختلفة تراوحت بين(٧-١١) بعدها قدرت الفعالية الانزيمية، ولتعين الوسط الزرعي الأمثل لإنتاج الإنزيم فاستعمل وسط الكازئين السائل والكازئين الملحي السائل ونقيع القلب والدماغ السائل ووسط لوريا السائل بعدها قدرت الفعالية الانزيمية، ولتعيين مدةالحضانةالمثلى لإنتاج الإنزيم استعملت اوقات مختلفة للحضن وهي(٢٤ ،٤٨، ٧٢، ٩٦) ساعة بعدها قدرت الفعالية الانزيمية(١١).

التحري عن العزلات البكتيرية المنتجة للإنزيم الحال للبروتين :

استعمل وسط اكارحليب الفرز ١٠% ونميت البكتريا في هذا الوسط لمدة (٢٤) ساعة بدرجة(37)م°، وقيس قطر منطقة التحلل ثم انتخبت العزلة *P. aeruginosa* PsaW2 التي أعطت أوسع قطر لمنطقة التحلل ، وكانت معزولة من التهاب الجروح (١٢).

استخلاص وتنقية الإنزيم :-

نقي إنزيم البروتييز من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* باستعمال كروماتوغرافيا التبادل الايوني DEAE – cellulose وكروماتوغرافيا الترشيح الهلامي بعمود هلام سيفادكس G-100واتبعت الخطوات كما وردت في(١٣).

توصيف انزيم البروتييز :- تم توصيف الانزيم المنقى من بكتريا *P. aeruginosa* وذلك بدراسة الصفات التالية:-

تقدير الوزن الجزيئي للإنزيم بطريقة الترشيح الهلامي:- اتبعت الطريقة المذكورة في(١٤).

تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية وثبات الإنزيم باستعمال ارقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين(٥-١١).**ولتعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية وثبات الإنزيم** استعمل درجات حرارة مختلفة تراوحت بين (٣٠-٦٠)م° ، اتبعت الطريقة المذكورة في(١١).

دراسة تأثير بعض الايونات الفلزية والمواد الكلابية في فعالية الإنزيم:-

درس تأثير بعض الايونات الفلزية والمواد الكلابية في فعالية الإنزيم التي تضمنت السستين ، أزايد الصوديوم ، SDS ، EDTA ، CaCl2، HgCl2، MgSO4، ZnCl2، NaCl اتبعت الطريقة المذكورة في(١١).

النتائج

شخصت (٢٤) عزلة تابعة لبكتريا *P. aeruginosa* من حالات التهابات الجروح والحروق حسب الطرق القياسية المتبعة لذلك. وكانت(٨) عزلات بنسبة(33.3%) من حالات التهاب الجروح و(١٦)عزلة بنسبة(66.6%) من حالات الحروق ويبين جدول(١) يمثل مصدرعزل بكتريا *P.aeruginosa* من حالات مرضية مختلفة مع النسبة المئوية للإصابة.

اختبرت حساسية بكتريا *P. aeruginosa* ضد (١٠) مضادات حيوية وقد أظهرت العزلات نسب مختلفة في مقاومتها للمضادات الحيوية. إذ أظهرت بكتريا *P. aeruginosa* نسبة المقاومة (١٠٠%) تجاه مضادات الامبسلين. بينما بلغت نسبة المقاومة لمضادي السيفاكسيم ، والسفتازديم (95.8%)،(٧٩%) على التوالي. وبلغت نسبة المقاومة لمضادات لتوبرامايسين،البيراسيلين،النورفلوكساسين والسبروفلوكساسين (41.6%)،(20.8%) ،(20.8%) و(٤%)على التوالي. في حين أظهرت جميع العزلات لبكتريا *P. aeruginosa* حساسيةعالية وبنسبة(١٠٠%) تجاه مضادات الازترونام ، امبينيم والسيفابيم يبين شكل(١) النسبة المئوية لمقاومة بكتريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية المختلفة .

درست الظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز واظهرت النتائج ان افضل انتاجية للانزيم في وسط لوريا ورقم هيدروجيني(٨) ولمدة(٤٨) ساعة من الحضن وبدرجة حرارة(٣٥)م°. نقي إنزيم البروتييز من العزلة *P. aeruginosa* بالترسيب بكبريتات الامونيوم وبنسبة اشباع ٨٠% بعدها اجري عملية الديلزة ثم الاستخلاص باستعمال كروماتوغرافيا التبادل الايوني DEAE–cellulose و تم الحصول على عدد مرات تنقية بلغت(8.83) وبحصيلة إنزيمية(23.32 %)، وفعالية إنزيمية(١٤٥)وحدة/ مل، وفعالية نوعية(659.09) وحدة/ملغم بروتين. جمعت الأجزاء الفعالة من خطوة التبادل الايوني بعد تركيزها ومررت خلال عمود هلام سيفادكس G-100 وتم الحصول على الفعالية الإنزيمية(١٧٠) وحدة/مل، وفعالية نوعية (١٠٠٠) وحدة/ملغم بروتين، وعدد مرات تنقية(13.40)، وبحصيلةإنزيمية(18.23%). يبين جدول(٢) مراحل تنقية الانزيم.

درست صفات الانزيم وذلك بتقدير الوزن الجزيئي للإنزيم المنقى بطريقة الترشيح الهلامي بعمود هلام سيفادكسG-100وكان(21379) دالتون، وبلغت درجة الحرارة المثلى لفعالية وثبات البروتييز (٣٥)م° ، والرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية وثبات الإنزيم كانت(٨) .أوضحت نتائج تأثير بعض المثبطات والعوامل المختزلة والكلابية في فعالية الإنزيم ، إن فعالية الإنزيم قد ازدادت عند معاملته بايونات الصوديوم والكالسيوم Ca^{++} والزنك Zn^{++} والمغنيسيوم مما يدل أنها تلعب دوراً في تحفيزوثبات الإنزيم، ولم تثبط فاعلية الإنزيم بوجود العوامل المختزلة مثل السستين،بينما تثبط فعالية الإنزيم بوجود العوامل الكلابيةEDTA و NaN3وSDS كلوريد الزئبق.

المناقشة

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. في أغلب الدراسات وجد إن بكتريا *P. aeruginosa* هي المسبب الرئيس لالتهابات الجروح والحروق إذ عزلت (١٤٩) عزلة من أصل (٣٦٦) عينة لمصابين بالتهاب الجروح والحروق بسبب بكتريا *P. aeruginosa* (١٥).

أظهرت نتائج الدراسة تبايناً واضحاً في تأثير المضادات الحيوية في بكتريا *P. aeruginosa* وجاءت هذه الدراسة مقاربة للعديد من الدراسات ومنها دراسة (١٦) الذين بينوا إن أعلى مقاومة لهذه البكتريا كانت لمضاد Ceftazidime إذ بلغت (٧٦%) ، ويعد هذا المضاد Ceftazidime من مضادات الجيل الثالث للسيفالوسبورينات التي تستعمل بكثرة في الدول المتقدمة و بعض الدول الأخرى منها الهند. استعملت مضادات Gentamicin , Carbenicillin و Amikacin وكذلك بعض من مضادات الجيل الثالث من السيفالوسبورينات لعلاج حالات الجروح المتسبب عن بكتريا *P. aeruginosa* وقد انحسر استخدام هذه المضادات في الوقت الحاضر بسبب زيادة مقاومة البكتريا لهذه المضادات الحيوية(١٧).بين(١٨) إن حوالي (٧٠- ٨٠%) من بكتريا *P. aeruginosa* كانت حساسة لمضادات البيتالاكتام والامينوكلايكوسايد في المملكة المتحدة وقد ارتفعت نسبة المقاومة في السنوات الأخيرة.

بيّنت نتائج الدراسة الحالية إن كل من مضاد Norfloxacin ومضاد Ciprofloxacin اظهر فعالية عالية ضد بكتريا *P. aeruginosa*. واتفقت مع (١٩) اللذين بينوا ان بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من حالات التهاب الجروح كانت حساسة و بنسبة عالية لمضادات Amikacin ، Cefepime ، Ciprofloxacin و Imipenem. إن زيادة استعمال المضادات بشكل عشوائي يؤدي إلى زيادة ظهور المقاومة ولاسيما في البكتريا السالبة لصبغة كرام ومن اجل التقليل من المقاومة يجب تحديد استعمال المضادات الحيوية(20).

إما أكثرأنواع المضادات الحيوية التي أظهرت تأثيرا في البكتريا فكانت مضادات Aztreonam،Cefepime و Imipenem جاءت هذه النتائج متفقة مع العديد من الدراسات إذ أشار(٢١) إلى الفعالية العالية لمضادي Cefepime و Imipenem على بكتريا *P. aeruginosa* . قد يعود السبب في تأثير هذه المضادات على العزلات المحلية لهذه البكتريا إلى قلة استعمال هذه المضادات في مستشفياتنا فلم تظهر مقاومة لهما. يعد مضاد Aztreonam من المضادات واسعة الطيف التي تكون فعالة ضد بكتريا *P. aeruginosa* وتعمل على تحليل الجدار الخلوي ثم موت الخلية إذ يكون عملها مشابها لعمل مضادات البيتالاكتام (٢٢).

عند دراسة الظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز فقد اتفقت النتائج مع(٢٣)اللذين بينوا إن أعلى إنتاجية لإنزيم البروتييز المعزول من بكتريا *P. aeruginosa* كان عند رقم هيدروجيني (٨.٣)ودرجة حرارة(٣٥)°م ووسط Luria broth.

تم تنقية الإنزيم باستخدام كبريتات الامونيوم وبنسبة إشباع (٨٠)% بكونه خطوةً أولى للتنقية وتستعمل هذه الخطوات ليتم معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين بفعل الملح والإخلال بطبيعة الماء المحيطة بجزيئات البروتين مما يؤدي إلى خفض ذائبية البروتين وينتج عن ذلك ترسيبه(13). وبعدها جاءت خطوة الديلزة ثم التبادل الايوني باستخدام المبادل الايوني DEAE–Cellulose. جمعت الأجزاء الفعالة من هذه الخطوة ومررت خلال عمود الترشيح الهلامي باستخدام هلام سيفادكس SephadexG100، النتائج الحالية اتفقت مع عدد من الدراسات في تنقية الانزيم باستخدام DEAE–Cellulose بكونها خطوةً ثانية للتنقية ومنها دراسة عندما فصلوا الإنزيم من بكتريا *P. aeruginosa* ، بعدها الخطوة الترشيح الهلامي باستعمال هلام سيفادكس Sephadex G100 كخطوة نهائية لعملية تنقية الانزيم (٢٤).

درست صفات الانزيم وكان الوزن الجزيئي للإنزيم المنقى(21379) دالتون، وهذه النتائج مقاربة لما توصل اليه بعض الدراسات التي ذكرت إن الوزن الجزيئي لإنزيم البروتييز المنقى من البكتريا نفسها تراوح بين(٢٠٠٠٠-٣٣٠٠٠) دالتون(٢٥).

أوضحت نتائج تأثير بعض المثبطات والعوامل المختزلة والكلابية في فعالية الإنزيم ، إن فعالية الإنزيم قد ازدادت عند معاملته بايونات Ca^{++} و Zn^{++} مما يدل أنها تلعب دوراً في تحفيز وثبات الإنزيم نلاحظ من هذه النتائج كفاءة ايونات الزنك والكالسيوم والصوديوم في زيادة الفعالية الإنزيمية. بينت الكثير من الدراسات إن ايون المغنيسيوم عند إضافته إلى الوسط يؤدي إلى زيادة ثبات الإنزيم وكذلك يحتفظ الإنزيم بفعاليته عند وجود ايونات الزنك والكالسيوم. تزداد فعالية الإنزيم بوجود أنواع معينة من الايونات التي تعد أساسا لفعالية الإنزيم وتدخل في تركيب الإنزيم لاسيما ايونات الصوديوم والكالسيوم والزنك والمغنيسيوم التي تؤدي إلى تنشيط الإنزيم وترفع قيم الفعالية

الإنزيمية(٢٦)، ولم تثبط فاعلية الإنزيم بوجود العوامل المختزلة مثل السستين،بينما تثبط فعالية الإنزيم بوجود العوامل الكلابية EDTA، إذ بينت العديد من الدراسات إن إنزيم البروتييز يفقد فعاليته ويثبط بوجود EDTA فعند إضافة العوامل الكلابية EDTA و NaN3 تؤدي ذلك إلى تكوين معقدات مع ايونات الفلز ويتم سحبها من الموقع الفعال مما يؤدي إلى تثبيط الإنزيم(٢٧). إن مادة السستين ترتبط مع الأواصرالكبريتية -SS- في الموقع الفعال أو بالقرب منه وإن دور العوامل المختزلة هو اختزال هذه الآصرة وكسرها وتحويلها إلى مجموعة-SH- التي تؤثرسلب على فعالية الإنزيم(٢٨).

الاستنتاجات

أظهرت بكتريا *P. aeruginosa* مقاومة عالية لمضادات البيتالاكتام في حين كانت هذه البكتريا حساسة لمضادات البيتالاكتام التابعة للأجيال الجديدة و منها Aztreonam ، Cefepime و Imipenem.

ان إنزيم البروتييزالمستحصل عليه في الدراسة الحالية والمنقّى من بكتريا *P. aeruginosa* يعد من الإنزيمات المعدنية.

المصادر

1. Pellegrino , F. P. C. ; Teixeira , L. M. ; Carvalho , M. G. S. ; Nouer , S.A. ; Oliveire , M. P. ; Sampaio , J. L. M. ; Freitas , A. D. ; Ferreira , A. L. P. ; Amorim , E.L.T. ; Riley , L. W. and Moreira, B. M. (2002). Occurrence of a multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. J Clin Microb. 40(7):2420-2424.

2. Song, Z.; Wu, H.; Ciofu, O.; Kong, K.; Hoiby , N.; Rygaard , J. ; Kharazmi, A. and Mathee,K. (2003) . Pseudomonas aeruginosa alginate is refractory to Th1 immune response and impedes host immune clearance in a mouse model of acute lung infection. J Med Microb. 52: 731-740.

3. Mariencheck, W.I.; Alcorn, J. F.; Palmer, S.M. and Wright, J. R. (2003). Pseudomonas aeruginosa Elastase Degrades surfactant protein A and D. Am J Res Mol Bio. 28:528–537.

4. Al-Douri, S.S. (2003). Characteristics of alkaline protease produced by Pseudomonas aerations. MSC. Thesis Al –Nahrain University. Baghdad. Iraq.

٥. المحمداوي،خوله جبر خلف.(٢٠٠٦). دراسة كيموحيوية وجزيئية للبروتين المنتج من العزلةالمحلية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* . أطروحة دكتوراه. كلية العلوم– الجامعة المستنصرية.

6. Foca, M.; Jakob , K. ; Whittier, S.; Dello-Latta , P. ; Factor, S.; Rubenstein, D. and Saiman, L.(2005). Endemic Pseudomonas aeruginosa infection in a Neonatal Intensive Care Unit. New Englan J Med. 343 (10): 695-700.

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

8. Cotter, C.S.; Avidano, M. A.; Stringer, S.P. and Schultz, G.S. (1996) .Inhibition of proteases in Pseudomonas otitis media in chinchillas. Otolaryngol Head Neck Surg. 115 (4): 342-51.

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

10. Vandepitte, J.; Verhaegen, J.; Engbaek, K.; Rohner,P.; Piot, P. and Heuck,C.C.(2003). Basic laboratory procedures in clinical Bacteriology .2nded. World Health Organization Geneva. PP. 109-120.

11. Peters, J. E. and Galloway, D. R. (1990). Purification and Characterization of an active fragment of the Las a protein from Pseudomonas aeruginosa: Enhancement of Elastase activity. J Bacter. 172 (5):2236 2240.

12. Senior, B.W. (1999). Investigation of the types and characteristics of the proteolytic enzyme formed by diverse strains of proteus species. J. Med. Microbial. 48: 623 -628.

13. Scopes, R. K. (1987). Protein purification principles and practice. 2nded. Springer Verlag, New York.

14. Andrews, P. (1964). Estimation of the Molecular Weights of proteins by sephadex Gel – filtration. Biochem. J. 91: 222-233.

15. Pirnay, J.P.; DeVos , D.; Cochez, C. ;Bilocq, F.; Pirson, J.; Struelens, M.; Duinslaeger, L.; Cornelis, P.; Zizi, M. and Vanderkelen, A.(2003). Molecular epidemiology of Pseudomonas aeruginosa colonization in a burn unit: persistence of a

of Pseudomonas aeruginosa. J. Biol. Chem. 276 (Issue 47) 23 : 43645-43652

25. Matsumoto, K. (2004). Role of bacterial protease in Pseudomonal and Serratial keratitis. Biol.Chem. 385: 1007-1016.

26. Anisia, J.; Silva, K.; Jorge, A. and Benitcz, E. (2003). Hemagglutinin/ protease expression and mucin gel penetration in Eltor biotype Vibrio cholerae. Microbiology. 149: 1883-1891.

27. Kessler , E. ; Safrin , M. ; Abrams , W.R.; Rosen bloom , J. and Ohman , D.E.(1997) . Inhibitors and Specificity of Pseudomonas aeruginosa Las A. J.B.C. 272 (15). Issue 11 :9884-9889

28. Means, G.E. and Feeny, R.E. (1971). Chemical Modification of Proteins. Holden-Day Inc., San Francisco.

جدول(١) يمثل مصدر عزل بكتريا P.aeruginosa من حالات مرضية مختلفة مع النسبة المئوية للإصابة.

مصدر العزل	العدد الكلي للعزلات	عدد ونسب الإصابة بكتريا *P.aeruginosa* (%)
جروح Wound	٣٥	٨ (33.3)
حروق Burn	٤٧	١٦ (66.6)
المجموع الكلي	٨٢	٢٤ (١٠٠)

جدول(٢)خطوات تنقية الإنزيم البروتييز من بكتريا P. aeruginosa.

خطوات التنقية Steps	الحجم Volume (مل)	الفعالية الإنزيمية Activity (وحدة / مل)	الفعالية الكلية Total activity (وحدة)	تركيز البروتين Protein concentration (ملغم / مل)	الفعالية النوعية Specific activity (وحدة / ملغم بروتين)	عدد مرات التنقية Purification Fold	الحصيلة الإنزيمية Yield %

multidrug resistant clone and a silver sulfadiazine resistant clone. J Clin Microb.41 (3): 1192-1202.

16. Kriengkaukyiat, J.; Porter, E.; Lomovskaya, O. and Wong-Beringer, A. (2005). Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother .49 (2):565-570.

17. Mansour, A. and Enayat, K. (2004). Bacteriological Monitoring of hospital borne septicemia in burn patients in Ahvaz, Iran. J. Burns and Sury Wound Care. 11: 42-51.

18. Livermore, D.M. (2002). Multiple Mechanisms of antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa: our worst Nightmare. Clin Infect Dis. 34: 634-640.

19. Flamm, R.K.; Weaver, M. K.; Thornsberry, C.; Jones, M. E.; Karlowsky, J. A. and Sahm, D.F. (2004). Factors associated with relative rates of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa Isolates tested in clinical laboratories in the United States from 1999 to 2002. Antimicrobl Agents Chemother.48 (7): 2931-2436.

20. Neuhauser, M.M.; Weinstein, R.A.; Rydman, R.; Danziger ,L. H.; Karam, G. and Quinn, J.P. (2003).Antibiotic resistance among Gram-negative Bacilli in US Intensive Care Units. JAMA. 289(7): 885-888.

21. Fluit, A.C.; Verhoef, J.; Schmitz, F. J.; European SEN TRY Participants. (2001). Frequency of isolation and antimicrobial resistance of gram negative and gram positive bacteria from patients in intensive care unite of 25 European university hospitals participating in the European arm of the SENTRY antimicrobial surveillance program 1997-1998 . Euro. J. Clin. Microbial Infect. Dis. 20 (9): 617-25.

22. Kapoor, S. and Gathwala, G. (2004). Drug Therapy Aztreonam. Indian Pediatrics. 41 (17): 359-364.

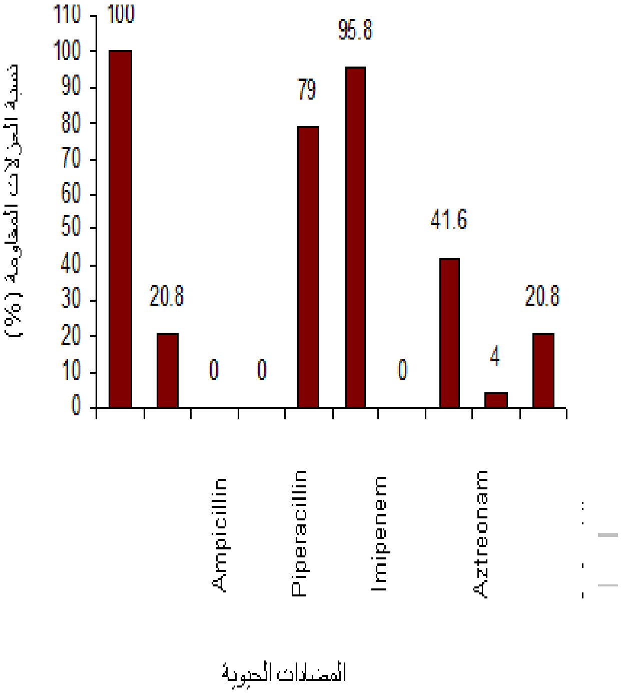
23. Barequet , I.S. ; Ben Simon , G.J. ; Safrin , M. ; Ohman, D.E., and Kessler, E. (2004). Pseudomonas aeruginosa Las A protease in treatment of experimental Staphylococcal Keratitis. Antimicro Agents Chemother .48(5): 1681-1687.

24. Cahan, R.; Axelrad, I.; Safrin, M.; Ohman, D.E. and Kessler, E. (2001). Asecreted amino peptidase

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2009 ,(3), (3) :37-44

Open Access

المستخلص الخام	٢٠٠	37.3	7460	0.5	74.6	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم مع الديلزة	١٨	125.3	2255.4	0.9	112.77	1.51	30.23
Ion-exchange chromatography DE-AE cellulose	١٢	١٤٥	1740	0.22	659.09	8.83	23.32
Gel filtration sephadex G-100	٨	١٧٠	١٣٦٠	0.17	١٠٠٠	13.40	18.23



شكل (١) النسبة المئوية لمقاومة بكتريا P. aeruginosa للمضادات الحيوية المختلفة.

جدول (٣) يمثل تأثير بعض العناصر الفلزية والمواد الكلابية والمثبطات في فعالية الإنزيم.

المادة	التركيز (mM)	الفعالية المتبقية (%)
Control	[illegible]	[illegible]
كلوريد الكالسيوم CaCl2	[illegible]	[illegible]
كلوريد الزئبق HgCl2	[illegible]	[illegible]
كلوريد الزنك ZnCl2	[illegible]	[illegible]
كلوريد الصوديوم NaCl	[illegible]	[illegible]
كبريتات المغنيسيوم MgSO4	[illegible]	[illegible]
EDTA	[illegible]	[illegible]
أزايد الصوديوم NaN3	[illegible]	[illegible]
SDS	[illegible]	[illegible]
السستين Cysteine	[illegible]	[illegible]

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEASE FROM PSEUDOMONAS AERUGINOSA ISOLATED FROM SOME WOUND AND BURN INFECTION.

RANA M. AL-SHWAIKH SOUOD R. ALANI SAMEER F. SAMAAN

E.mail: *scianb@yahoo.com*

ABSTRACT :

Twenty Four isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were identified. The isolates were 8(33%) from wound infections, 16(66%) isolates from burn infections. The sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates was been tested against (10) antibiotics showed isolates version resistance with different percentage against antibiotics. *Pseudomonas aeruginosa* exhibited (100%) resistance to Ampicillin. While percentages of resistance to Cefixime and Ceftazidime were (95.8%) and (79%) respectively. Resistance percentages to Tobramycin, Piperacillin, Norfloxacillin, Ciprofloxacin were (41.6%), (20.8%), (20.8%) and (4%) respectively. All isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were highly sensitive (100%) to Aztronam, Imipenem, Cefepime. The optimum conditions for protease production were in LB medium with a pH (8) after (48) hrs of incubation at (35) Cº. Purification of the protease was done using ion exchange chromatography DEAE-cellulose and gel filtration with sephadex G-100. Molecular weight of the purified protease was measured by sephadex G-100 and it was found to be around (21379) Dalton. The optimum temperature of enzyme activity was (35) Cº. However, the pH (8) was for activity and stability of this enzyme. Zn^{++} and Ca^{++} ions may play a role in the enhancement and stability of the enzyme. Enzyme activity was not inhibited in the presence of reducing agent such as Cysteine, but it was inhibited in the presence of EDTA.