

تأثیر غلظت‌های تحت مهاری عصاره الکلی بابونه آلمانی بر روی فعالیت آنزیم کاتالاز استافیلوکوکوس اورئوس

غلامرضا گودرزی^۱، مرتضی ستاری^۲، سعید امیر اصلان زاده^۳، منصور گودرزی^۴، محسن بیگدلی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد باکتری شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس.

۲- دکترای تخصصی میکروب شناسی پزشکی، استادیار گروه باکتری شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس.

۳- دانشجوی دکتری تخصصی شیمی آلی، دانشگاه تربیت مدرس.

۴- دکترای تخصصی شیمی گیاهان دارویی، استادیار و رئیس مرکز تحقیقات منابع طبیعی جهاد کشاورزی استان تهران

یافته / دوره هفتم / شماره ۱۳ و ۱۴ / پاییز و زمستان ۱۴ / مسلسل ۲۶

چکیده

دریافت مقاله: ۸۳/۱۲/۲۲، پذیرش مقاله: ۸۴/۳/۸

*** مقدمه:** بابونه آلمانی گیاهی است داروئی که خواص درمانی متعددی دارد. به دلیل وجود مقدار زیادی تریپنویئید α - بیزابولول در عصاره این گیاه خواص ضد میکروبی آن قابل توجه است.

استافیلوکوکوس اورئوس باکتری بیماری‌زائی است که نقش مهمی در پزشکی و بهداشت مواد غذایی دارد. از آنجائیکه کاتالاز به عنوان آنزیم تجزیه کننده آب اکسیژنه نقش مهم و حیاتی در فیزیولوژی، تعیین هویت و بیماری‌زائی بسیاری از باکتری‌ها از جمله استافیلوکوکوس اورئوس دارد، لذا بررسی تأثیر غلظت‌های تحت مهاری عصاره الکلی گیاه بابونه آلمانی بر روی فعالیت این آنزیم هدف از اجرای تحقیق می باشد.

*** مواد و روش‌ها:** در این تحقیق بنیادی - کاربردی گیاه بابونه آلمانی از باغ مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان تهران تهیه و به وسیله اتانول ۸۵ درجه عصاره گیری شد. حداقل غلظت‌های مهاری و کشندگی عصاره بر روی سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس به روش رقت در برات تعیین و سپس تأثیر غلظت‌های تحت مهاری عصاره بر فعالیت آنزیم کاتالاز باکتری به صورت نیمه کمی و کمی با استفاده از روش تیتراسیون با پرمنگنات پتاسیم ارزیابی شد.

*** یافته‌ها:** رقت‌های ۱:۳۲ و ۱:۱۶ به ترتیب به عنوان حداقل غلظت‌های مهاری و کشندگی عصاره تعیین شد. عصاره در غلظت‌های تحت مهاری ۱:۶۴ و ۱:۱۲۸ توانست به ترتیب ۸/۸۲٪ و ۸/۳۲٪ فعالیت آنزیم کاتالاز باکتری را نسبت به شاهد کاهش دهد.

*** نتیجه گیری:** افت شدید و چشم‌گیر فعالیت آنزیم مذکور در غلظت‌های کمتر از مهار کنندگی عصاره، نسبت به شاهد بدون عصاره احتمالاً نمایانگر تأثیر بر روی یک یا چند مرحله از فرایندهای تولید این آنزیم در سطح ژنوم، رونویسی، ترجمه، انتقال و... می باشد؛ لذا لازم است در این زمینه مطالعات تکمیلی بیشتری انجام گیرد. این آنزیم می‌تواند به عنوان هدفی جدید در طراحی و دستیابی به برخی از مواد ضدباکتریایی باشد.

واژه‌های کلیدی: بابونه آلمانی، کاتالاز، استافیلوکوکوس اورئوس

آدرس مکاتبه: تهران، بزرگراه جلال آل احمد، پل نصر، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه باکتری شناسی

پست الکترونیک: Gh_mic2004@yahoo.com

مقدمه

بابونه از گیاهان داروئی متعلق به خانواده کامپوزیته است که دو گونه آلمانی و رومی آن معروفند. به دلیل حضور برخی ترکیبات خاص در گونه آلمانی بر روی آن مطالعات علمی بیشتری انجام گرفته و نسبت به گونه رومی سطح کشت وسیع تری را به خود اختصاص داده است و معتقدند که دارای خواص متنوعی چون ضدالتهاب، ضد میکروب، آرامبخش، ضد اسپاسم و غیره می باشد (۱).

α - بیزابولول به عنوان مهمترین ترکیب شیمیائی در عصاره این گیاه دارای اثرات ضد میکروبی است (۲،۱).

آنزیم کاتالاز نقش مهمی در فیزیولوژی، بیماریزائی و تعیین هویت باکتری ها دارد (۳). باکتری های هوازی و بی هوازی اختیاری، در تنفس هوازی خود به دلیل داشتن دو آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز می توانند فشارهای اکسیژن را تحمل کرده و آب اکسیژنه ناشی از زنجیره انتقال الکترون و ناشی از سلول های فاگوسیتیک را تجزیه نمایند (۵،۴). این آنزیم نه تنها در سم زدایی آب اکسیژنه نقش دارد بلکه امروزه به عنوان یک مارکر اولیه در کنترل آلودگی محیطی، در صنایع غذایی به عنوان یک شاخص حضور باکتری ها در مواد غذایی و حتی به عنوان مدرکی دال بر حیات در کره ماه می باشد (۶).

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از باکتری های بیماریزایی است که تولید کاتالاز می کند. این باکتری نقش مهمی در بروز مسمومیت های غذایی، عفونت های چرکی، سیستمیک و بیمارستانی دارد (۳). علی رغم وسعت تحقیقاتی که در چند دهه اخیر بر روی گیاهان داروئی صورت گرفته است اما در ارتباط با چگونگی مکانیسم عمل آنها بحث زیادی نشده است لذا در مطالعه حاضر تاثیر غلظت های تحت مهاری عصاره الکلی بابونه بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز این باکتری مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع بنیادی - کاربردی می باشد.

عصاره گیری:

گیاه بابونه آلمانی پس از تهیه از باغ کشاورزی مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان تهران به محل انجام تحقیق در گروه باکتری شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انتقال داده شد و پس از خشک کردن کامل گیاه در محل تاریک و بدون رطوبت، گل های گیاه از سایر قسمت ها جدا و خرد شدند.

برای تهیه عصاره الکلی، ۱۰ گرم از گل های خرد شده گیاه به ۱۰۰ میلی لیتر هیدروآتانول ۸۵ درجه اضافه گردید و عصاره گیری به روش ماسراسیون^۱ ادامه یافت (۷). سپس هیدروآتانول عصاره اولیه توسط دستگاه تقطیر در خلأ در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت تبخیر و عصاره تغلیظ شده بدست آمد (۷،۸).

تهیه سوپه استاندارد

برای تعیین حداقل غلظت های مهاری و کشندگی عصاره، از سوپه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۹۲۱۳ تهیه شده از مرکز رفرانس بیمارستان بوعلی تهران استفاده شد.

تعیین هویت سوپه مورد آزمایش

در تعیین هویت سوپه مورد نظر از تست های بیوشیمیایی کاتالاز، کواگولاز (اسلایدی و لوله ای)، *DNAase* و تخمیر مانیتول استفاده شد (۹،۳).

بررسی کمی حساسیت به روش سریال های رقتی

در این روش جهت تعیین حداقل غلظتی که باعث مهار رشد باکتری ها (*MIC*) و حداقل غلظتی که باعث مرگ باکتری ها (*MBC*) شد از عصاره الکلی تغلیظ شده سریال های رقتی (۱:۲، ۱:۴، ۱:۸، ۱:۱۶ و ...) در محیط مولر- هینتون برآش^۲ تهیه شد. سپس به هر کدام از رقت ها به ازای هر

1. Maceration method

2. Mueller- Hinton Broth

هر ۴ لوله به مدت ۱۸-۱۲ ساعت در دمای $C 37^{\circ}$ انکوبه شدند تا سوسپانسیون های نسبتاً غلیظی در لوله ها ایجاد گردد. سپس جذب نوری لوله های تیمار شده و شاهد بدون عصاره در طول موج ۶۲۵ نانومتر کاملاً یکسان گردید. همچنین برای بدست آوردن تعداد باکتری های زنده و فعال در هر کدام از سوسپانسیون های تیمار شده و شاهد، از هر کدام از لوله ها حجم مشخص و یکسانی بر روی سه محیط آگار کشت داده شد؛ تا نتایج حاصل از بررسی فعالیت های باکتریایی، بر حسب تعداد باکتری های زنده موجود در سوسپانسیون ها محاسبه و تعدیل گردد (۱۲، ۱۱).

بررسی نیمه کمی فعالیت آنزیم کاتالاز

در این آزمایش، ۰/۵ میلی لیتر از هر یک از سوسپانسیون های باکتریایی تیمار شده و شاهد بدون عصاره به طور جداگانه به لوله های همولیز استریل انتقال داده شد. سپس به هر کدام از لوله ها ۰/۵ میلی لیتر آب اکسیژنه ۳٪ اضافه گردید و پس از ۳۰ ثانیه مخلوط کردن، میزان تشکیل و بالا آمدن حباب های اکسیژن با هم مقایسه شد (۹).

بررسی کمی فعالیت آنزیم کاتالاز به روش تیتراسیون

با توجه به اینکه آب اکسیژنه یک ماده اکسید کننده است می توان غلظت آن را در محلول ها به روش تیتراسیون با واسطه مواد احیاء کننده تعیین کرد.

در این آزمایش از سوسپانسیون های باکتریایی تیمار شده با غلظت های $\frac{1}{2}$ و $\frac{1}{4}$ غلظت مهاری عصاره و شاهد بدون عصاره کدورت های نسبتاً غلیظ و کاملاً یکسانی تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

برای انجام آزمایش، ابتدا ۴ ارلن کوچک و تمیز شماره گذاری و به هر کدام مقدار ۱ میلی لیتر آب اکسیژنه ۰/۹۷ مولار (۳٪ شرکت مرک آلمان) اضافه گردید. سپس به منظور بررسی فعالیت کاتالازی عصاره مورد آزمایش به ارلن شماره ۱ به عنوان شاهد منفی، ۰/۵ میلی لیتر از رقتی معادل با $\frac{1}{2}$

میلی لیتر محیط مایع 5×10^5 باکتری فعال اضافه شد، در کنار لوله ها از شاهد مثبت (محیط کشت حاوی باکتری، بدون عصاره) و شاهد منفی (محیط کشت) استفاده گردید. همچنین برای تعیین تعداد باکتری های زنده تلقیح شده به لوله ها، از لوله شاهد مثبت حجم مشخصی بر روی محیط مغذی کشت داده شد. در نهایت پلیت و لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در $C 37^{\circ}$ درجه سانتی گراد انکوبه و سپس نتایج قرائت گردید. آخرین رقتی که در آن هیچگونه کدورت ناشی از رشدی مشاهده نگردید به عنوان MIC در نظر گرفته شد واز تمام لوله های بدون کدورت روی محیط مولر- هینتون آگار کشت داده شد. آخرین رقتی از عصاره که قادر به مرگ ۹۹/۹٪ درصد از تعداد باکتری های زنده تلقیح شده بود به عنوان MBC عصاره در نظر گرفته شد (۱۰، ۹).

تهیه سوسپانسیون های باکتریایی تیمار شده با غلظت های تحت مهاری و شاهد بدون عصاره.

ابتدا ۲-۱ کلنی از سویه مورد آزمایش به لوله ای حاوی محیط مولر- هینتون برات اضافه شد و پس از انکوباسیون در $C 37^{\circ}$ کدورت سوسپانسیون فوق با ۰/۵ مک فارلند یکسان گردید.

به ۴ لوله آزمایش ۱ میلی لیتر محیط مولر - هینتون برات اضافه شد؛ در لوله های اول و دوم غلظت هایی معادل با غلظت مهاری (MIC) و $\frac{1}{2}$ غلظت مهاری عصاره تهیه شد و به لوله سوم به عنوان شاهد بدون عصاره، هیچگونه عصاره ای اضافه نشد. سپس به لوله های اول، دوم و سوم ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده اضافه گردید. در نتیجه، لوله های اول و دوم حاوی سوسپانسیون های باکتریایی تیمار شده با غلظت های $\frac{1}{2}$ و $\frac{1}{4}$ غلظت مهاری عصاره بودند. لوله چهارم به عنوان شاهد منفی، فقط حاوی محیط مولر- هینتون برات بود.

مصرفی پرمنگنات برای هر کدام از ارلن‌های شماره ۲، ۳ و ۴ می‌توان مولاریته و سپس تعداد میلی‌مول‌های مصرف شده H_2O_2 توسط باکتری‌های تیمار شده را نسبت به ارلن شماره یک (شاهد منفی) و یا نسبت به ارلن شماره ۲ (شاهد مثبت) محاسبه و با توجه به تعداد باکتری‌های موجود در هر یک از سوسپانسیون‌ها مقایسه و از نظر آماری تعدیل کرد (۱۳).

کلیه آزمایشات فوق سه بار تکرار و نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS آنالیز شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تعیین هویت سویه مورد آزمایش:

در رنگ‌آمیزی گرم، سویه مورد آزمایش (استافیلوکوکوس اورئوس ۲۹۲۱۳ ATCC) به صورت کوکسی‌های گرم مثبت با آرایش‌های متنوعی مشاهده شد.

در آزمایشات بیوشیمیایی تعیین هویت، واکنش‌های کاتالاز، کوکولاز و DNA'ase سویه مورد آزمایش مثبت و با تخمیر قند مانیتول بر روی محیط مانیتول - سالت آگار همراه بود.

نتایج حاصل از تعیین MIC و MBC عصاره به روش سریال‌های رقتی:

در تعیین MIC و MBC به روش سریال‌های رقتی، عصاره در رقت ۱:۳۲ باعث مهار رشد (MIC) و در رقت ۱:۱۶ باعث مرگ باکتری (MBC) مورد آزمایش شد.

نتایج حاصل از بررسی تأثیر غلظت‌های تحت مهاری عصاره بر

فعالیت آنزیم کاتالاز:

الف) نتایج نیمه کمی

نتایج حاصل از بررسی نیمه کمی فعالیت آنزیم نشان داد که در غلظت‌های ۱:۶۴ و ۱:۱۲۸ عصاره، میزان تشکیل حباب‌های اکسیژن و فعالیت آنزیم نسبت به شاهد بدون عصاره کاهش یافته است (جدول شماره ۱)

جدول شماره ۱- نتایج حاصل از بررسی نیمه کمی فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت‌های تحت مهاری عصاره

عصاره	شاهد بدون عصاره	۱:۱۲۸	۱:۶۴	رقت	فعالیت
-	++++	+++	+		فعالیت کاتالازی

غلظت مهاری از عصاره (بدون باکتری) اضافه شد همچنین به ارلن شماره ۲، ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی شاهد بدون عصاره، به ارلن شماره ۳، ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی تیمار شده با غلظت $\frac{1}{4}$ غلظت مهاری عصاره و به ارلن شماره ۴، ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی تیمار شده با غلظت $\frac{1}{4}$ غلظت مهاری عصاره اضافه شد.

سپس هر ۴ ارلن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند، تا زمانی که حباب‌های اکسیژن ناشی از تأثیر آنزیم کاتالاز باکتریایی بر روی آب اکسیژنه مشاهده نگردد. در مدت انکوباسیون گاهی ارلن‌ها را تکان داده تا تأثیر آنزیم بر سوبسترای خود به خوبی صورت گیرد.

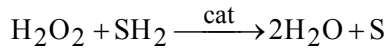
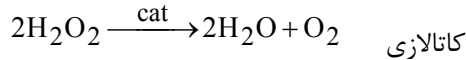
در این فاصله بورت تیتراسیون نصب و از پرمنگنات پتاسیم ($KMnO_4$) ۰/۰۵ مولار (۰/۲۵ نرمال) پر گردید.

پس از مدت انکوباسیون به هر کدام از ارلن‌ها حجم ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۲ مولار (۴ نرمال) اضافه گردید تا محیط واکنش کاملاً اسیدی و برهم‌کنش آنزیم بر سوبسترا متوقف گردد. در مرحله بعد عمل تیتراسیون به طور جداگانه بر روی ارلن‌ها صورت پذیرفت. بدین صورت که به هر کدام از ارلن‌ها قطره قطره محلول پرمنگنات پتاسیم اضافه و مخلوط گردید تا زمانی که کل H_2O_2 موجود در ارلن احیاء شده؛ به طوریکه با اضافه کردن یک قطره پرمنگنات پتاسیم محلول درون ارلن به رنگ صورتی درآید. سپس حجم پرمنگنات مصرف شده برای هر ارلن به طور دقیق ثبت گردید. این عمل بر روی هر کدام از ارلن‌ها انجام و حجم‌های مصرفی پرمنگنات یادداشت شد.

با داشتن حجم مصرفی پرمنگنات پتاسیم برای ارلن شماره ۱ (شاهد منفی) می‌توان با استفاده از فرمول $V2 * Cm1 = Cm2$ (مولاریته = Cm) مولاریته آب اکسیژنه را به دست آورده و در نتیجه تعداد میلی‌مول‌های (mmol) H_2O_2 موجود در ۱ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۰/۳٪ مورد استفاده در آزمایش را به دست آورد. بدیهی است با داشتن حجم

ب) نتایج کمی

دیگر خانواده پراکسیداز، یک آنزیم منحصر به فرد است چون هر دو فعالیت کاتالازی و سوپراکسیدازی را از خود نشان می‌دهد (۶).

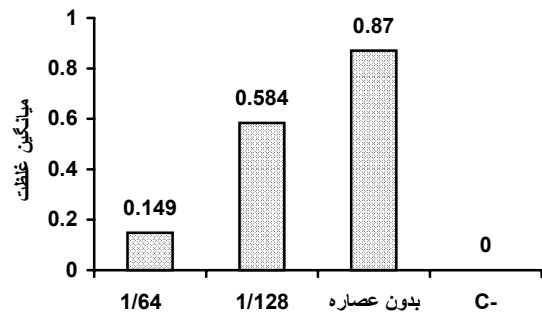


پراکسیدازی

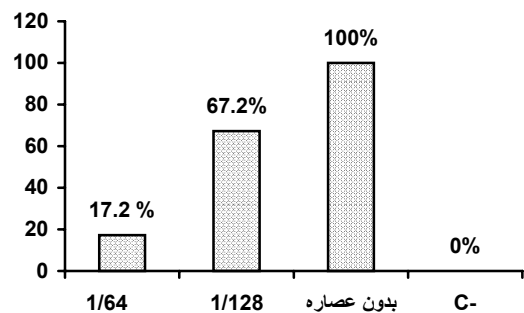
استافیلوکوکوس اورئوس دارای شاخص های بیماری زایی و فیزیولوژیک متعددی است که می تواند هدف مواد ضد میکروبی مختلفی قرار گیرند. آنزیم کاتالاز به همراه سوپراکسید دیسموتاز در این باکتری یکی از شاخص های مهم فیزیولوژیک است که هم در شناسائی و هم در بروز بیماریزائی و فرار از سیستم ایمنی نقش دارد (۳) به طور اختصاصی نوتروفیل ها و ماکروفاژ ها در برهم کنش با پاتوژن ها اکسیژن را مصرف کرده و تولید یون سوپراکسید می کنند. سپس این یون در PH پائین درون واکوئل فاگوسیتی توسط آنزیم دیسموتاز به H_2O_2 تبدیل می شود. H_2O_2 یک ملکول کوچک است که برخلاف یون سوپراکسید، قادر به عبور از غشاء سیتوپلاسمی باکتری بوده و در واکنش با یون آهن، رادیکال سمی هیدروکسیل (OH) ایجاد می کند (واکنش فنتون) و یا می تواند در برهم کنش با پراکسیدازها زنجیره ای از واکنش ها را راه اندازی کند که در طی آنها اکسیژن های نوزاد تولید می شود (۱۴). این رادیکال های آزاد اکسیژن، اثرات سمی خود را بر روی DNA ، پروتئین ها و چربی ها اعمال می کنند (۱۵).

مطالعات مختلف نقش این آنزیم را در بیماری زایی برخی از باکتری ها به اثبات رسانده است (۱۶، ۱۵). در سال ۲۰۰۴ جی و همکارانش^۱ نشان دادند که کاتالاز نقش بسیار مهمی در بقای درون سلولی باکتری بروسلا ملیتنسیس در برابر عوامل فاگوسیتیک دارد و این آنزیم با تجزیه آب اکسیژنه تولید شده توسط این سلول ها باعث بقای بیشتر باکتری می گردد (۱۶).

همچنان که در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده میانگین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و در نتیجه غلظت آب اکسیژنه مصرفی توسط باکتری های تیمار شده با غلظت های ۱:۶۴ و ۱:۱۲۸ عصاره نسبت به شاهد بدون عصاره شدیداً کاهش یافته است. همچنین مشخص شد که عصاره به تنهایی هیچگونه فعالیت کاتالازی ندارد.



نمودار شماره ۱- میانگین غلظت آب اکسیژنه مصرفی (mmol/ml) توسط باکتری های تیمار شده با غلظت های تحت مهاری عصاره نسبت به شاهد بدون عصاره



نمودار شماره ۲- میانگین درصد فعالیت آنزیم کاتالاز در باکتری های تیمار شده با غلظت های تحت مهاری عصاره نسبت به مشاهده بدون عصاره

بحث

در تنفس هوازی باکتری ها، آنزیم کاتالاز قادر است پراکسید هیدروژن تولید شده از زنجیره انتقال الکترون را بدون ایجاد رادیکال های آزاد تجزیه کند. کاتالاز در مقایسه با اعضای

بسیاری از ترکیبات شیمیائی می توانند به عنوان مهار کننده فعالیت این آنزیم بکار گرفته شوند (۱۷)

نتیجه گیری

در مطالعه ما نیز تأثیر این عصاره بر روی میزان فعالیت کاتالازی استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که غلظت های تحت مهاری عصاره می توانند فعالیت آنزیم مذکور را به طور چشمگیری کاهش دهند. افت شدید و چشمگیر فعالیت آنزیم مذکور در غلظت های کمتر از مهار کنندگی عصاره نسبت به شاهد بدون عصاره احتمالا نمایانگر تأثیر بر روی یک یا چند مرحله از فرایندهای تولید در سطح ژنوم، رونویسی، ترجمه، انتقال و... می باشد لذا لازم است در این زمینه مطالعات تکمیلی بیشتری انجام گیرد. با توجه به نقش مهم و اساسی کاتالاز در فعالیت های فیزیولوژیک و پاتولوژیک باکتری ها، این آنزیم می تواند به عنوان هدفی جدید در طراحی و دستیابی به برخی از مواد ضدباکتریایی باشد.

در تحقیقی که توسط سولر - گارسیا^۱ و جرس^۲ در سال ۲۰۰۴ بر روی نایسریا گنوره انجام گرفت ثابت شد که موتانت های کاتالاز این باکتری نسبت به اثرات سمی H_2O_2 بسیار حساس و در مواجهه با سلول های فاگوسیک بقای کمتری دارند (۱۵).

در سال ۲۰۰۳ محققینی به نام های والقبیس^۳ و وو^۴ فعالیت آنزیم کاتالاز را بر اساس روش فلورومتری تعیین کردند. در این روش که سیستم آئروپیوم III - تتراسایکلین - هیدروژن پراکسید (EUTE-HP) نامیده می شود با اضافه کردن آنزیم کاتالاز به سیستم مذکور پراکسید هیدروژن تجزیه شده و فعالیت فلورسنسی کمپلکس آئروپیوم - تتراسایکلین شدیداً کاهش می یابد در نتیجه می توان به طور کمی میزان فعالیت آنزیم مذکور را سنجید (۶). در تحقیق حاضر روش به کار رفته برای ارزیابی فعالیت آنزیم کاتالاز، بر اساس میزان آب اکسیژنه باقی مانده در محیط بود که توسط روش تیتراسیون با مواد احیاء کننده مورد سنجش قرار گرفت (۱۳).

1. Soler-Garcia
2. Jerse
3. Wolfbeis
4. Wu

References

1. Gardiner P. Chamomile. Longwood Herbal Task. 1999; 30: 1-15
2. Balazs T, Tisserand R. German chamomile. Int. J. of Aromatherapy. 1998; 1: 15-21
3. Kloos W.E. Staphylococcus. In: Topley & Wilson's Microbiology & Microbial infections. Collier L., Balows A., Sussman M., 9th ed; Vol 2. Arnold Co; USA. 1998: 577- 617
4. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnik, Adelberg's Medical microbiology. 22ed, Lange Medical Books, McGraw-Hill, New York, 2001: 197-202
5. Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM. Zinsser microbiology. 19 ed, Prentice-Hall International Inc, USA, 1988: 343-356
6. Zhihong In MW, Wolfbeis OS. Determination of the activity of catalase using a europium(III)-tetracycline-derived fluorescent substrate. Analytical Biochemistry, 2003; 320: 129-135
- ۷- صمصام شریعت هـ عصاره گیری واستخراج مواد موثره گیاهان داروئی و روش های شناسایی و ارزشیابی آنها. چاپ اول. انتشارات مانی. ۱۳۷۱. صص: ۸-۲۰
- ۸- خسروی آ، ملکان م ع. اثر عصاره الکلی و آبی لاوندولاستوکاس بر روی استافیلوکوکوس اورئوس وسایر باکتری های گرم منفی. مجله دانشگاه علوم پزشکی قزوین. ۱۳۸۲. شماره ۲۹. صص: ۳-۹
9. Baron E, Finegold S. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 8th ed. Mosby Co. USA. 1990: 171-194
10. Shryock TR, Apley M, Jones RN, Lein DH. Performance Standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved Standar – Second edition NCCLS document M31-A2 (ISBN 156238-000-0). NCCLS, USA, 2002: 1-31
11. Nostro A, Bisignano G, Cannatelli MA. Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2001; 17: 517-520
12. Nostro A, Cannatelli MA, Crisafi G. The effect of *Nepeta cataria* extract on adherence and enzyme production of *Staphylococcus aureus*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2001; 18: 583-585
13. Gray D. Analytical chemistry. 5ed; John Wiley & Sons Co., USA, 1994: 349-366
14. Repine JE, Fox RB. Hydrogen peroxide kills *S.aureus* by reacting with Staphylococcal iron to form hydroxyl radical. The Journal of Biological Chemistry 1981; 14: 7094-7096
15. Soler-Garci'a A, Jerse AE. A *Neisseria gonorrhoeae* catalase mutant is more sensitive to hydrogen peroxide and parquet, an inducer of toxic oxygen radicals. Microbial Pathogenesis, 2004; 37: 55-63
16. Gee JM, Kovach ME, Grippe VK. Role of catalase in the virulence of *Brucella melitensis* in pregnant goats. Veterinary Microbiology. 2004; 102: 111-115
17. Liu X, Roe F, Jesaitis A. Resistance of Biofilm to the catalase inhibitor 3-amino-1,2,4- triazole. Biotechnol Bioengrg. 1998; 59(2): 156-162