

بررسی اثر ضد میکروبی اسانس گیاه مورد بر روی سویه استاندارد H37Rv و ایزوله های بالینی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

مهديه شفقت*^۱، ناهید سپهری راد^۲، ملیحه متانت^۳، حسین ذاتی کیخا^۴

*۱- کارشناس ارشد زیست شناسی گیاهی، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، پژوهشکده علوم سلولی، مولکولی در بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، پژوهشکده علوم سلولی، مولکولی در بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

۳- متخصص بیماری های عفونی و طب گرمسیری، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، پژوهشکده علوم سلولی، مولکولی در بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

۴- کارشناس ارشد آنالیز عددی، دانشگاه فنی و حرفه ای، دانشکده فنی و حرفه ای دختران زاهدان

نشانی برای مکاتبه: Shafaghat.m@gmail.com

چکیده

چکیده سابقه و هدف: مورد یا (*Myrtus Communis*)، گیاهی درختچه ای و همیشه سبز است که به صورت خودرو در دشت های کشور های آسیایی از جمله ایران و کشورهای مدیترانه ای رشد می کند. از زمانهای قدیم، از اسانس این گیاه به عنوان ماده ضد عفونی کننده استفاده می شود. علاوه بر اثر ضد عفونی کنندگی به عنوان تقویت کننده معده و همچنین جهت رفع بیماریهای تنفسی و مجاری ادراری استفاده می شود. هدف این مطالعه تعیین اثر اسانس گیاه مورد بر روی سویه استاندارد H37Rv و ایزوله های بالینی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بود.

روش کار: فعالیت ضد میکروبی اسانس گیاه مورد در برابر ۲۵ سویه مختلف از گونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تحت بررسی قرار گرفت.

یافته ها: در این مطالعه نشان داده شد که بین غلظت های مختلف تعیین شده جهت کشت میکروب اختلاف قابل توجهی مشاهده شد، بطوریکه اسانس گیاه مورد در غلظت های بالا (۷/۵، ۱۵) میلی گرم در هر میلی لیتر تاثیر محسوسی بر عدم رشد سویه های مختلف باکتری داشته است و سبب ممانعت از رشد باکتری مورد مطالعه ایجاد نموده است که این نشان دهنده تاثیر فاحش خاصیت آنتی میکروبیال اسانس گیاه مورد در کاهش رشد باکتری است.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این پژوهش نشان دهنده تاثیر مثبت اسانس گیاه مورد، در جهت درمان بیماری عفونی سل باشد. که به عنوان عامل آنتی باکتریال در جهت توسعه و تولید داروهای جدید در این زمینه موثر واقع شود. ترکیبات موجود در گیاهان دارویی و فرآوری آنها با توجه به خواص ضد باکتریایی، آنتی اکسیدانی (ناشی از وجود عوامل حذف کننده رادیکالهای آزاد) و ضد سرطانی آنها در زمینه تولید داروهای جدید و با کمترین عوارض در مقایسه با داروهای شیمیایی می تواند از اهمیت خاصی برخوردار باشند.

واژگان کلیدی: گیاهان دارویی، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، میکروارگانیسم ها، گیاه مورد

مقدمه

بیماری سل (Tuber culosis) یک بیماری عفونی ناشی از سویه های مختلف باکتری است که معمولا Myco bacterium نامیده می شود، سل یک بیماری عفونی و مزمن و از علل عمده مرگ و میر در سطح جهان است. در سرتاسر جهان، سل یکی از ۱۰ علت اصلی مرگ و میر می باشد. بیماری سل بر اساس معیار جهانی رتبه هفتم جهان در بیماریهای خطرناک را داراست و پیش بینی شده تا سال ۲۰۲۰ جایگاه کنونی را حفظ خواهد کرد (۱) در سال ۲۰۱۱، ۸/۷ میلیون نفر مبتلا به سل شدند که ۱/۱ میلیون مورد در میان افراد مبتلا به HIV بود. تخمین زده می شود که ۱/۴ میلیون نفر در این سال بر اثر سل جان خود را از دست داده اند (۲). هیچ بیماری دیگری همانند سل به اقتصاد جامعه لطفه وارد نمی کند. زیرا ۷۵ درصد مرگ و میر در بیماران مبتلا به سل مربوط به گروههای سنی می باشد که از نظر اقتصادی فعال هستند. همچنین بر اساس اعلام سازمان بهداشت جهانی کشورها تا سال ۲۰۳۰ باید از ۸۰٪ از بروز

بیماری سل (Tuber culosis) یک بیماری عفونی ناشی از سویه های مختلف باکتری است که معمولا Myco bacterium نامیده می شود، سل یک بیماری عفونی و مزمن و از علل عمده مرگ و میر در سطح جهان است. در سرتاسر جهان، سل یکی از ۱۰ علت اصلی مرگ و میر می باشد. بیماری سل بر اساس معیار جهانی رتبه هفتم جهان در بیماریهای خطرناک را داراست و پیش بینی شده تا سال ۲۰۲۰ جایگاه کنونی را حفظ خواهد کرد (۱) در سال ۲۰۱۱، ۸/۷

به منظور بررسی اثر ضد میکروبی اسانس استخراج شده گیاه مورد ، از سویه استاندارد H37RV و ایزوله های بالینی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که هر دو آنها به دو آنتی بیوتیک رایج ایزونیزید و ریفامپین حساس بودند استفاده شد. سویه استاندارد از شرکت پادتن طب ایران و ایزوله های بالینی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از مرجع سل زاهدان از بیمارستان بوعلی زاهدان جمع آوری گردید .

تهیه اسانس:

گیاه مورد در تیرماه از منطقه جیرفت واقع در استان کرمان جمع آوری و سپس در هرابرئوم دانشکده علوم دانشگاه زابل شناسایی گردید. عمل استخراج اسانس از برگ گیاه مورد به روش Hydrodistillation انجام شد. ۲۰۰ گرم از پودر برگ گیاه خشک شده در یک بالن دو لیتری ریخته و حدود دو سوم بالن آب اضافه گردید و بالن ها به دستگاه کلونجر متصل شد تا عمل تقطیر به مدت ۴ ساعت انجام شود. پس از استخراج اسانس، عمل اِگیری انجام شد و نهایتاً اسانس به دست آمده در در یک ظرف در بسته تیره رنگ یخچال نگهداری گردید.

سویه های باکتری:

جهت تایید گونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تست های رشد در حضور پارانیترئوبنزوتیک اسید، تست نیاسین و بررسی فعالیت کاتالاز در ۶۸ درجه سانتی گراد، انجام گردید.

سویه های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد استفاده در این تحقیق از بیماران مبتلا به سل مرجع سل بیمارستان بوعلی شهرستان زاهدان جدا سازی و بر روی محیط کشت اختصاصی نمونه های بالینی اسمیر مثبت، بر روی محیط لونشتاین جانسون آگار کشت داده شد و در انکوباتور CO₂ با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴ هفته نگهداری شد.

تهیه سوسپانسیون میکروبی ۰.۵ مک فارلند

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، در ابتدا ۲۴ ساعت قبل از آزمایش، از کشت ذخیره به محیط کشت لونشتاین جانسون آگار (مرک آلمان) تلقیح شد. پس از رشد کلنی های باکتری، سطح محیط کشت با محلول نرمال سالین شسته و سوسپانسیون غلیظ میکروبی حاصل شد. مقداری از سوسپانسیون باکتری، داخل لوله استریل درب دار حاوی نرمال سالین ریخته شد و کدورت آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه گیری شد و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت محلول 0.5 مک فارلند، با نرمال سالین و سوسپانسیون باکتری غلظت تهیه گردید (۲۸).

آزمون حساسیت میکروبی به آنتی بیوتیک ها

حساسیت

سوسپانسیون میکروبی معادل کدورت نیم مک فارلند و نیز رقت های ۱۵، ۱/۸۷، ۷.۵ و ۳/۷۵ میکرولیتر بر میلی لیتر از اسانس گیاه تهیه شد. رقت های نهایی ۷۸۰۰ میکرولیتر بر میلی لیتر از آنتی

مورد جدید سل و ۹۰٪ از مرگ و میر ناشی از آن جلوگیری کنند. این در حالی است که ایران به دلیل رشد بیماری سل در کشورهای همسایه خود در معرض خطر سیر صعودی قرار دارد. (۳، ۴). امروزه ظهور مقاومت در برابر عوامل آنتی مایکوباکتریایی به یک موضوع مهم بهداشت عمومی در بسیاری از کشورهای در حال توسعه تبدیل شده است. افزایش بروز سل مقاوم به دارو در سراسر جهان، نیاز فوری به جستجوی ترکیبات ضد سل جدیدتر را برجسته می کند (۵). افراد بیشتری در کشورهای در حال توسعه از طب سنتی برای نیازهای اصلی مراقبت های بهداشتی اولیه خود استفاده می کنند (۶). گیاهان دارویی امید زیادی برای برآوردن این نیازها دارند و قرن هاست که برای درمان بیماری ها مورد استفاده قرار می گیرند (۷). آزمایش های علمی که بر روی خواص ضد میکروبی اجزای گیاهی انجام شده است برای اولین بار در اواخر قرن نوزدهم ثبت شد (۸). گیاهان منبعی از عوامل شیمی درمانی موثر برای بیماری های عفونی مختلف بوده اند و علاقه روزافزونی به توسعه داروهای با منشأ گیاهی وجود دارد. تعدادی از گیاهان در شرایط آزمایشگاهی فعالیت ضد قارچی قابل توجهی نشان داده اند. بنابراین، این یافته ها تحقیقات بیشتری را برای جداسازی عوامل ضد قارچی جدید از محصولات طبیعی تحریک کرده است (۹). در دهه های اخیر استفاده از گیاهان دارویی مورد توجه قرار گرفته که به طوری که ۲۵٪ کل داروهای موجود در آمریکا مشتق از گیاهان دارویی است (۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳). یکی از گیاهان دارویی که از قدیم الایام مورد شناسایی ایرانیان بوده و از آن به عنوان ماده ضد عفونی کننده ، قابض ، ضد التهاب ، ضد درد ، ضد ویروس و ضد باکتری استفاده شده گیاه مورد بوده است (۱۴). گیاه مورد با نام علمی *Myrtus Communis* از خانواده Myrtaceae می باشد که خصوصیات مورفولوژیکی آن به صورت درختچه کوچکی با ارتفاع ۱-۳ متر است که در نقاط خشک و استپی ایران می روید و داروهای متعددی از اسانس و عصاره آن تهیه می شود (۱۲). سابقه طولانی در استفاده از اسانس ها به عنوان ضد میکروب وجود دارد که از اوایل سال ۱۹۱۰ خاصیت ضد میکروبی اسانس ها مطرح شد. شدت و قدرت اسانس در تاثیر گذاری بر روی میکروبهایی مختلف از جمله میکروب مایکوباکتریوم که میکروب بسیار کند رشد و مقاومی است، بسته به ترکیبات ضد میکروبی آنها دارد (۱۵). با توجه به اثرات بارز درمانی اسانس و عصاره مورد و با این که گیاه مورد جز فلور گیاهی ایران است ولی تا کنون اثرات آن روی درمان بیماری سل ارزیابی نشده است و با در نظر گرفتن موارد مزمن و عودکننده بیماری سل و تلاش جهت یافتن داروی موثرتر و با عوارض کمتر، این تحقیق جهت بررسی تعیین تاثیر اسانس برگ مورد بر سویه های باکتریایی جدا شده از مبتلایان بیماری سل در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است.

روش کار

سازی اند. مطالعات مولکولی نشان داده اند که مایکوباکتریوم های کند رشد حاوی یک مجموعه از ژنهای کد کننده RNA ریبوزومی (16S rRNA) هستند؛ در حالی که مایکوباکتریوم های سریع رشد بیش از یک مجموعه از ژنهای کد کننده RNA ریبوزومی را دارند (۲۰). مایکوباکتریوم باسیل های پلئومورفیک هوازی، غیر متحرک، غیر اسپورساز، گرم مثبت و اسیدی هستند که باعث عفونت های مزمن در انسان و حیوانات می شوند. مایکوباکتریوم دارای محتوای اسید مایکولیک دیواره سلولی بالایی هستند که باعث می شود هنگام رنگ آمیزی با لکه های اسید و بررسی زیر میکروسکوپ، رنگ صورتی را حفظ کنند (۲۱). دیواره سلولی مایکوباکتریوم غنی از لیپید است و دارای خواص فیزیکی و شیمیایی استثنایی به عنوان نفوذ ناپذیری قوی است. و حتی روی آن پپتیدوگلیکان نیز وجود دارد، مایکوباکتریوم ها به دلیل مقدار زیاد لیپید، موجودات اسیدی هستند (۲۲). بیماری سل و عامل ایجاد کننده آن، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، بعنوان یکی از معضلات پیچیده سلامت، محققین را وادار به انجام تحقیقات گسترده ای در زمینه پیشگیری و درمان این بیماری کرده است (۲۳) این باکتری همچنین دارای لیپیدها و گلیکولیپیدهای خاص خود می باشد این ترکیبات منحصر به فرد شامل: مایکولیک اسید، لیپوآرابینومانان، تری هالوز دی مایکولات و فیوسرول دی مایکوسروزات هستند (۲۴، ۲۵، ۲۶). ظهور سویه های مقاوم به داروهای شیمیایی، تلاش برای یافتن عوامل ضد میکروبی جدید را ضروری می نماید. گیاهان و ترکیبات آنها شامل اسانس ها و عصاره های مختلف دارای توان بالقوه جهت جایگزینی با داروهای شیمیایی هستند (۲۷). که دارای عوارض جانبی کمتری در مقایسه با داروهای شیمیایی هستند (۲۸). مشخص شده که اغلب اسانس های گیاهی استخراج شده از گیاهان دارای خواص حشره کشی، ضد قارچی، ضد انگل، ضد باکتری، ضد ویروس، آنتی اکسیدان و سیتوتوکسیک می باشند (۲۹). برخی از محققین ارتباط بین ساختارهای شیمیایی برخی از اجزای غالب موجود در اسانس ها را با فعالیت ضد میکروبی آنها گزارش نمودند. اسانس هایی که دارای ترکیب های کریزانتیل استات، پار-سیمن و آلفا بیزابولول اکسید هستند، خاصیت ضد میکروبی شدید آنها گزارش شده است (۳۰). Saharkhiz و همکاران (2008) خاصیت ضد میکروبی بابونه کبیر را علیه برخی از باکتریها گزارش نمودند (۳۱). Rani و همکاران (2011) اثر ضد میکروبی اسانس بابونه آلمانی را علیه ۳ سوش میکروبی بررسی کردند و اظهار نمودند که این گیاه اثر ضد میکروبی داشته و می تواند برای مقابله با میکروب های بیماری زای خاص مورد استفاده قرار گیرد (۳۲). در بررسی اثرات ضد باکتریایی سیر بر روی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، پس از مجاورت عصاره سیر با مایکوباکتریوم ها در طی ۲۴ ساعت و مجاورت سویه استاندارد H37RV با چهار آنتی بیوتیک در غلظت های مختلف عصاره سیر، این باکتری نسبت به تمامی آنها حساسیت نشان داد (۳۳). در

بیوتیک ایزونیاژید و از آنتی بیوتیک ریفامپین در محیط کشت لئونشتاین جانسون آگار به صورت SLANT آماده گردید. جهت بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی هر ایزوله بالینی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، یک لوپ از سوسپانسیون اولیه با غلظت نیم مک فارلند بر روی محیط لئونشتاین جانسون آگار فاقد آنتی بیوتیک کشت داده شد. رقت سازی اسانس مورد با کمک دو حلال اتانول مطلق و بنزن انجام گردید و رقت های ۱/۸۷ و ۷/۵ و ۳/۷۵. ۱۵ ترکیب مورد نظر، در حضور باکتری با کدورت نیم مک فارلند کشت در محیط لئونشتاین جانسون آگار انجام شد. همچنین کشت باکتری در محیط فاقد اسانس، یک کشت بر روی محیط حاوی ایزونیاژید و یک کشت نیز روی محیط حاوی ریفامپین انجام شد. سپس محیط ها در انکوباتور CO2 با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت شش هفته نگهداری شد. پس از مدت زمان ۲۸ روز اولین بررسی و در روز ۴۲ نیز بررسی نهایی انجام و نتیجه گزارش شد.

یافته ها «

در بین سری های رقتی ساخته شده اسانس گیاه مورد از رقت های ۱/۸۷، ۳/۷۵، ۷/۵ و ۱۵ در دو حلال اتانول و بنزن، پس از حدود ۶ هفته انکوباسیون، غلظت های بالا (۷/۵، ۱۵) میلی گرم در هر میلی لیتر تاثیر محسوسی بر عدم رشد سویه های مختلف باکتری داشته است و سبب ممانعت از رشد باکتری مورد مطالعه ایجاد نموده است.

بحث و نتیجه گیری

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (*M. Tuberculosis*) یک پاتوژن درون سلولی بوده که اولین بار توسط Robert Koch در سال ۱۸۸۲ شناسایی شد و تا به امروز نیز بیش از هر عامل عفونی دیگر موجب مرگ انسانها شده است (۱۶). مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، باکتری میله ای شکل و از خانواده مایکوباکتریاسه می باشد، این باکتری عامل بیماری سل بوده که به دلیل وجود مقدار زیادی مواد چربی در دیواره آن، به سادگی به وسیله روش رنگ آمیزی گرم رنگ نمی گیرد (۱۷) این باکتری همانند سایر اعضای خانواده مایکوباکتریوم، بسیار کند رشد بوده و زمان تکثیر آن بین ۲۰-۲۱ ساعت است. (۱۸) جنس مایکوباکتریوم معمولاً بر اساس سرعت رشد به دو گروه عمده تقسیم می شود. یک گروه شامل گونه های با رشد آهسته مانند پاتوژن های معروف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم بوویس و مایکوباکتریوم لپره. گروه دیگر گونه های سریع رشد مانند مایکوباکتریوم اسمگماتیس که به طور کلی باکتری های فرصت طلب یا غیر بیماری زا هستند (۱۹). مایکوباکتریوم ها بطور معمول در منابع محیطی نظیر آب، خاک، حیوانات و گیاهان در حال فساد زندگی می کنند؛ بطوریکه حتی گونه های پاتوژن اجباری این خانواده نظیر مایکوباکتریوم نوبرکلوزیس نیز منشاء محیطی دارند و از منابع محیطی قابل جدا

بررسی مطالعه رنجبر و همکاران با استفاده از درمانهای گیاهی از جمله اکالیپتوس، بارهنگ، دم اسب، برگ درخت گردو، بادام زمینی و سیر جهت جلوگیری از تکثیر باکتری مولد سل و درمان آن موثر واقع شدند. با توجه به نتایج بدست آمده در مطالعه رفیعی و همکاران، مشخص گردید عصاره گیاه رازک نیز دارای قابلیت ضد میکروبی خوبی علیه هر دو سویه باکتری استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می باشد (۳۴). شواهدی وجود دارد که نشان می دهد اسانس ها اثر ضد میکروبی خود را از طریق تغییر ساختار و عمل غشای سلولی اعمال می کنند. بررسی های صورت گرفته در خصوص مکانیسم عمل اسانس ها اثبات می کند که این ترکیب ها نفوذ پذیری غشاء را افزایش می دهند. اجزای اسانس با نفوذ در غشاء منجر به متورم شدن غشاء شده و فعالیت آنرا کاهش می دهد و در نهایت منجر به مرگ سلول می شود (۳۵). Mahbobi گزارش داد که روغن گل *P. abrotanoides* فعالیت ضد قارچی در برابر آسپرژیلوس فلاووس، کاندیدا آلبیکنس و تریکوفیتون منتاگروفیت ها نشان می دهد (۳۶). نتایج مطالعه Hozoorbakhsh و همکارانش (۲۰۱۸) نشان داد که عصاره اسانس *P. gnaphalodes* و *P. abrotanoides* دارای اثرات بازدارنده قوی بر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس هستند. این اثر بازدارندگی برای *P. gnaphalodes* ۷۰/۹٪ و برای *P. abrotanoides* تا ۸۶٪ در برابر مایکوباکتریوم مشاهده شد (۳۷).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان دهنده تاثیر مثبت اسانس گیاه مورد، در جهت درمان بیماری عفونی سل باشد. که به عنوان عامل آنتی باکتریال در جهت توسعه و تولید داروهای جدید در این زمینه موثر واقع شود. ترکیبات موجود در گیاهان دارویی و فرآوری آنها با توجه به خواص ضد باکتریایی، آنتی اکسیدانی (ناشی از وجود عوامل حذف کننده رادیکالهای آزاد) و ضد سرطانی آنها در زمینه تولید داروهای جدید و با کمترین عوارض در مقایسه با داروهای شیمیایی می تواند از اهمیت خاصی برخوردار باشند. این نتایج نشان می دهد گیاه مورد دارای فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی بوده و قابلیت استفاده در صنایع دارویی را دارد.

تشکر و قدردانی

از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی زاهدان جهت انجام این پروژه تحقیقاتی مصوب با کد کمیته اخلاق IR.ZAUMS.IRC.1392.6469 تشکر و قدردانی می گردد.

REFERENCE

- 1.Mirhaghani, L. Nasehi,M. Country Guide to Fighting Tuberculosis. Pulmonary and Pulmonary Diseases Research Center Publications. Disease Management Center. Deputy of Health. Ministry of Health and Medical Education. 2009
- 2.WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Global tuberculosis controls. WHO report; 2011.
- 3.Domagala TB, Lacinski M, Trzeciak WH. The correlation of homocysteine-thiolactonase activity of the paraoxonase(PON1) protein with coronary heart disease status. Journal Cell Mol Biol 2006; 52(5): 4-10.
- 4.Khazaei HA, Rezaei N, Bagheri GR. Epidemiology of tuberculosis in the southeastern Iran. Eur Journal Epidemiol 2005; 20(10): 879-83.
- 5.Serkani JE, Isfahani BN, Safaei HG, Kermanshahi RK, Asghari G. Evaluation of the effect of Humulus lupulus alcoholic extract on rifampin-sensitive and resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis. Res Pharm Sci 2012;7:235-42.
- 6.Houghton PJ. The role of plants in traditional medicine and current therapy. J Altern Complement Med 1995;1:131-43.
- 7.Heinrich M, Gibbons S. Ethnopharmacology in drug discovery: An analysis of its role and potential contribution. J Pharm Pharmacol 2001;53:425-32.
- 8.Zaika LL. Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination. J Food Safety 1975;9:97-118.
- 9.Newton SM, Lau C, Gurcha SS, Besra GS, Wright CW. The evaluation of forty-three plant species for *in vitro* antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. J Ethnopharmacol 2002;79:57-67.
- 10.Gharineh. M. Investigation of antimicrobial effects of traditional plants. PhD Thesis in Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences,1994.
- 11.Mirheydar,H. Plant knowledge. . Tehran: Islamic Culture Publishing, 1995. Pages: 310-315.
- 12.Grag SC, Denger SL. Antifungal Activity of the Essential Oil of Myrtus Communis var. Microphylla Habra Hungarica 1988;27(2-3):123-124
- 13.Hines T, Hill T. Encyclopedia of Medicinal plants. 15 th ed.London: Dorsley Kinderseleley ,1996 -2360.
- 14.Salehniya, A. Extraction and identification of active ingredients (green case) and its investigation against pathogenic microbes. PhD Thesis in Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, 1990.
- 15.Wong, S., Grant, I., Friedman, M., Elliott, C., Situ, C. Antibacterial Activities of Naturally Occurring Compounds against *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. Applied and environmental microbiology, Oct. 2008, p. 5986–5990.
- 16.Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Pub; 2009.
- 17.Mortal M, Rep W, Rep R. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. Am J Respir Crit Care Med 2000;161(4 Pt 2):S221-47.
- 18.Kerr J. Manual of clinical Micobiology. 8th ed. Washington D.C: ASM press; 2003. p. 532-59. (Vol 1).
- 19.Forrellad, M., Klepp, L., Gioffré, A., García, J., Morbidoni, H., Santangelo, M., Cataldi, A., Bigi, F. Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. Virulence 4:1, 3–66; January 1, 2013.
- 20.Kaykha, M, Karamizarandi, M, Rahdar,H., Taki, A. Infections, identification tests and new treatments for non-tuberculous Mycobacterium. Scientific-Research Journal of Sabzevar University of Medical Sciences. Pages 627-640. 2018.
- 21.Gunn-Moore, D., Sykes, J. Mycobacterial Infections. Chaper 44. 2014.
- 22.Valencia, G., Villalva, S and Espitia, C. Virulence Factors and Pathogenicity of Mycobacterium. Virulence Factors and Pathogenicity of Mycobacterium 2018.

23. Aghababa, H., Mohebati, A., Bahmanesh, M., Khoramabadi, N., Nejati, M. Cloning, expression and purification of Mycobacterium transferase c Mycobacterium tuberculosis in eukaryotic hosts. *Modares Journal of Medical Sciences: Biopathology*. Pages 12-1. 2011.
24. Killian JA. Synthetic peptides as models for intrinsic membrane proteins. *FEBS Lett* 2003;555(1):134-38.
25. Renshaw PS, Lightbody V, Veverka FW, Muskett FW, Kelly G, Frenkiel TA, et al. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. *EMBO J* 2005;24(14):2491-8.
26. Seelig J. Thermodynamics of lipid-peptide interactions. *Biochim Biophys Acta* 2004;1666(1-2):40-50.
27. Tepe B, Donmaz E, Unlu M, Candan F, Vadar-Unlu G. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* and *Salvia multicaulis*. *Food Chem* 2004; 84: 519-25.
28. Kotze M, Eloff JN. Extraction of antibacterial compound from *Combretum microphyllum*. *S Afr J Bot* 2002; 68: 62-7.
29. Kordali S, Kotan R, Mavi A, Cakir A, Ala A, Yildirim A. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculoides* and the antifungal and antibacterial activities of *Artemisia absinthium* and *Artemisia spicigera* essential oils. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 9452-8.
30. Fabry W, Hames E, Locatelli J. Antimicrobial activities of methanol extracts of *Matricaria chamomilla*, depending on location and seasonal variation. *Food Chem* 2007; 100: 559-64.
31. Saharkhiz M, Sattari M, Goodarzi GH, Omidbaigi R. Assessment of antibacterial properties of *Tanacetum parthenium* L. essential oil. *J Med Aromatic Plants* 2008; 24(1): 47-55.
32. Rani M, Ozguven M, Kirici A. The effects of some Herb's essential oils on some microbes. *J Med Plants* 2011; 6(20): 3525-9.
33. Imani Fouladi AA, Sattari M, Ghazi Saeedi K. Morphologic changes of *Mycobacterium tuberculosis* after exposure with cholorformic garlic extract. *J Gorgan Univ Med Sci* 2008;10(3):11-18. [Full Text in Persian].
34. Rafiee B, Sadeghi D, Ghani S, Mosavari N, Dashtipour Sh, Hosseini SA. Antibacterial effect of aqueous and ethanolic extracts of *Humulus lupulus* on *Mycobacterium tuberculosis*. *Qom Univ Med Sci J* 2017;11(8):22-28. [Full Text in Persian].
35. Bezic N, Skobibunic V. Composition and antimicrobial activity of *Tanacetum parthenium* L. essential oil. *J Ethnopharmacol* 2002; 74(1): 123-34.
36. Mahboubi M. Iranian medicinal plants as antimicrobial agents. *J Microbiology, Biotech Food Sci* 2013;2:2388-405.27.
37. Hozoorbakhsh F, Esfahani B, Moghim S, Asghari G. Evaluation of the effect of *Pulicaria gnaphalodes* and *Perovskia abrotanoides* essential oil extracts against *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Adv Biomed Res* 2016;5:79.