دو فصلنامه علوم تکثیر و آبزی‌پروری/ سال سوم/ شماره ششم/ بهار و تابستان۹۴ / صفحات۱۸-۱۱

بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره سداب (*Ruta graveolens*) بر سویه‌های بیماری‌زای لاکتوکوکوس گارویه (*Lactococcus garvieae*) و آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*)

سهراب احمدی وند [*۱]، مهدی سلطانی [۱]، مهران احمد پور [۱]، سهیل ایگدری [۲]

چکیده

سُداب (*Ruta graveolens*) از جمله گیاهان دارویی در طب سنتی است که دارای خواص دارویی متعددی ازجمله ضد سرطانی، انتی اکسیدان، ضد التهاب، ضد میکروبی، ضد تشنج و کاهنده فشار خون می‌باشد. در مطالعه کنونی اثرات ضد باکتریایی عصاره اتانولی این گیاه بر دو جدایه بیماری زای لاکتوکوکوس گارویه (*Lactococcus garvieae*) و آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) جداسازی شده از مزارع قزل آلای کشور که به ترتیب گرم مثبت و منفی می‌باشند تعیین و با آنتی بیوتیک‌های اریترومایسین و انروفلوکساسین، تتراسایکلین و سولفامتوکسازول با روش دیسک کاغذی مقایسه شد. همچنین حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) و حداقل غلظت مهار رشد (MIC) عصاره آن با استفاده از روش میکرو دایلوشن تعیین گردید. بر اساس نتایج عصاره اتانولی سداب اثر ممانعت کنندگی رشد بر دو جدایه بیماری‌زای شایع در مزارع قزل آلای کشور را ندارند که ممکن است به دلیل مقاوم بودن سویه‌های باکتریایی بررسی شده، فقدان یا پایین بودن مواد ضد میکروبی خود گیاه و یا ناشی از شیوه استخراج عصاره باشد.

کلید واژه: سداب، خاصیت ضد باکتریایی، MIC، MBC، *Aeromonas hydrophila*، *Lactacoccus garvieae*.

۱- گروه بهداشت و بیماری های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
s_ahmadivand@ut.ac.ir
۲- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۱- مقدمه

امروزه پاتوژن‌های باکتریایی رایج‌ترین عوامل بیماری‌زا در آبزی‌پروری می‌باشند که موجب بروز مشکلات و خسارات فراوان می‌شوند. به‌طورکلی بیماری‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی شایع بوده و از جمله آنها می‌توان به بیماری‌های فرونکلوزیس(*Aeromonas salmonicida*) ، آنتریک دهان قرمز(*Yersinia ruckerii*) ، ویبریوزیس (*Vibrio spp*) و سایر بیماری‌هایی که توسط باکتری‌هایی همچون*A. hydrophila* ، *Pseudomonas spp*، *Flavobacterium sp*و *Pasteurella sp* ایجاد می شوند، اشاره نمود. با این وجود فقط تعداد کمی از باکتری‌های گرم مثبت سبب بروز بیماری در ماهی می‌شوند که از بین آنها می‌توان به باکتری‌های عامل لاکتوکوزیس/استرپتوکوکوزیس که به ترتیب توسط باکتری‌های لاکتوکوکوس گارویه (*L.garvieae*) و استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*) ایجاد می‌شوند، اشاره نمود(Austin and Austin, 2007).

این بیماری‌ها با انتقال به صورت افقی هر ساله تلفات زیادی را در مزارع پرورش ماهی قزل آلای کشور ایجاد می‌نماید. در حال حاضر از جمله روش‌های مرسوم مقابله با این بیماری‌ها استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و در برخی موارد استفاده از واکسن ها می‌باشد. از مهمترین عوامل محدود کننده استفاده از آنتی بیوتیک‌ها، ظهور پاتوژن‌های مقاوم به آنها در ماهی و انسان است. علاوه بر این آنتی‌بیوتیک‌ها سبب کشته شدن باکتری‌های مفید در لوله گوارش میزبان شده و همچنین به خاطر تجمع در محصول نهایی سبب بروز مشکلات سلامتی در مصرف کننده نهایی می گردند (Aoki et al., 1990).

بنابراین یافتن روش‌های پیشگیری و درمان مناسب برای به حداقل رساندن خسارات اقتصادی ناشی از تلفات این بیماری در مزارع پرورش ماهی و نیز کاهش مشکلات ناشی از مصرف گسترده آنتی بیوتیک‌ها ضروری به نظر می‌رسد. در سال های اخیر استفاده از گیاهان دارویی مورد توجه قرار گرفته است زیرا مواد مؤثر موجود در داروهای گیاهی به دلیل همراه بودن آنها با مواد دیگر پیوسته از یک حالت تعادل بیولوژیک برخوردار می‌باشد، بنابراین در بدن انباشته نشده و اثرات جانبی به بار نمی‌آورند. از اینرو برتری قابل ملاحظه‌ای نسبت به داروهای شیمیایی دارند(Velag, 2005).

سداب(*R. graveolens*) ، درختچه‌ای همیشه سبز متعلق به خانوادهRutaceae و از راسته Sapindalesاست که بیش از ۱۶۰جنس و ۱۶۰۰ گونه را شامل می‌شود (Miguel, 2003). این گیاه از کهن ترین گیاهان مورد استفاده در طب سنتی ایران و ملل مختلف بوده که دانشمندان قدیم اروپایی با توجه خواص دارویی متعددی که دارد آن را داروی جمیع بیماری‌ها می‌دانستند و از عصاره و اسانس آن برای موارد مختلف همچون تسکین درد، مشکلات چشم، روماتیسم و التهاب پوست استفاده می-کردند (Ratheesh et al., 2011).

همچنین خواص دارویی متعدد این گیاه از جمله ضدتشنج، التیام دهنده زخم، ضدسرفه و کاهش

فشارخون، ضدانگل، ضد کرم، کاهنده برخی از فعالیت‌های سیستم عصبی، ضدبارداری و سقط کننده جنین نشان داده شده است (Miguel, 2003). اخیرا خواص ضد سرطانی (Preethi et al., 2006)، آنتی اکسیدان و ضد التهابی(Ratheesh et al., 2011)، ضد دیابتی(Toserkani et al., 2011) ، ضد میکروبی (Meepagala et al., 2005; Orlanda and Nascimento, 2015) ، ضد آندروژنی (Khouri and El-Akawi, 2005)، حشره کشی (Barbosa et al., 2011) این گیاه نیز گزارش شده است.

با توجه به مطالب ذکر شده مطالعه کنونی جهت ارزیابی اثرات ضد باکتریایی سداب بر دو جدایه بیماری‌زای لاکتوکوکوس گارویه (*L. garvieae*) و آئروموناس هیدروفیلا (*A. hydrophila*) جداسازی شده از مزارع قزل آلای کشور انجام شد. بدین منظور حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) و حداقل غلظت مهار رشد (MIC) با استفاده از روش میکرو دایلوشن همچنین اثر باکتری کشی این اسانس در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های اریترومایسین و انروفلوکساسین، تتراسایکلین و سولفامتوکسازول با روش دیسک کاغذی مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ تهیه عصاره

بخش هوایی گیاه سبز سداب از هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه تهران تهیه و پس از انتقال به آزمایشگاه، برگ‌های آن به خوبی از قسمت‌های چوبی جدا شده و در انکوباتور با دمای ۴۹ درجه سانتیگراد به مدت چهار روز خشک شدند. سپس، ۳۳ گرم ماده خشک شده در ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ٪۹۷ به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق و محیط تاریک نگهداری شد. مخلوط نهایی توسط یک فیلتر کاغذی، صاف شده و به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه فریز درایر قرار داده شده و مقدار ۱/۷ گرم محصول نهایی به دست آمد.

۲-۲ باکتری

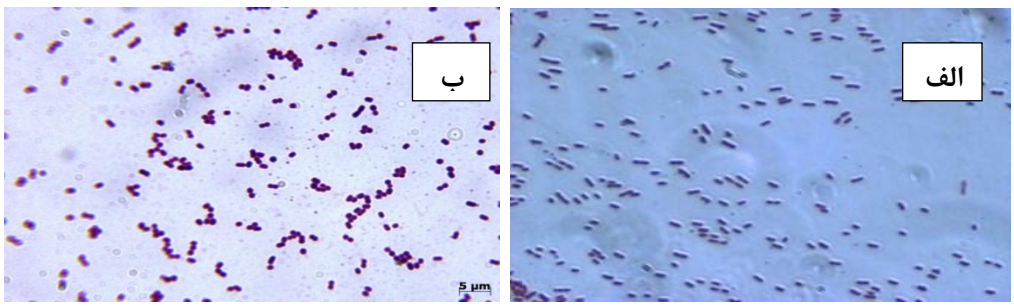
ابتداء دو جدایه بیماری زای لاکتوکوکوس گارویه و آئروموناس هیدروفیلا که به ترتیب گرم مثبت و منفی می باشند و قبلاً از مزارع قزل آلای کشور جداسازی و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) شناسایی شده بودند از قطب بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شدند. سپس در شرایط استریل باکتری‌ها برروی محیط ژلوز خون‌دار کشت داده شده و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. در مرحله بعد، از کلنی‌های رشد یافته، ابتداء رنگ آمیزی گرم تهیه و پس از اطمینان از خلوص پرگنه و تعیین مورفولوژی و نوع رنگ آمیزی (گرم منفی و یا گرم مثبت) پاساژ ثانویه بعمل آمد. سپس آزمایش کاتالاز و تعیین نوع

همولیز در پاساژ ثانوی جهت تأیید بیشتر روی نمونه‌ها انجام شد.

۲-۳ بررسی خاصیت ضد باکتریایی

به دلیل رفتار متفاوت جدایه‌های مختلف باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها استفاده شده، در این بررسی به‌منظور سنجش خاصیت ضد باکتریایی عصاره سداب و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی دو باکتری لاکتوکوکوس گارویه و آئروموناس هیدروفیلا یافتن مؤثرترین و ضعیف ترین نوع آنتی بیوتیک مؤثر بر هر جدایه، از روش دیسک کاغذی استفاده گردید. ابتداء سرم فیزیولوژی (۹ گرم در لیتر) تهیه گردیده و به وسیله اتوکلاو استریل شد. سپس از هر باکتری که به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شده بودند. برای تهیه مک فارلند شماره یک برای هر جدایه استفاده شد. پس از تهیه مک فارلند شماره یک، با استفاده از سمپلر، مقدار ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون معادل مک فارلند شماره یک (3×10^8cfu/ml) بر روی محیط ژلوز خون ریخته شد و به وسیله پیپت پاستور خم شده کشت چمنی داده شد. در ادامه ۱۰ میکرولیتر از عصاره رقیق نشده به دیسک‌های فیلتر استریل (قطر ۶ میلیمتر) اضافه شد و دیسک‌ها بر روی کشت‌های باکتری قرار داده شدند. برای ارزیابی کارآیی عصاره سداب در مقابل تأثیر سایر آنتی-بیوتیک‌ها بر روی جدایه‌های مختلف باکتری‌ها از دیسک‌های استانداردErythromycin15 ، sulfamethoxazole5، Enrofloxacin5 و Tetracycline30 استفاده شد. سپس در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون شدند. پس از گذشت ۲۴ساعت هاله منطقه مهار رشد به وسیله کولیس اندازه‌گیری شد. آزمایش در ۳ تکرار انجام گرفت و قطر هاله‌های بدست آمده از دیسک‌های آنتی بیوتیکی مورده استفاده با قطر هاله عصاره مورد مقایسه قرار گرفت.

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)عصاره سداب علیه باکتری *L. garvieae* و *A .hydrophila* با استفاده از روش ماکرودایلوشن توصیه شده (Clinical and Laboratory Standard Institute CLSI2000) با اندکی تغییرات با سه بار تکرار تعیین شد. بدین منظور رقت‌های متوالی از عصاره تهیه شده در محیط TSB و در محدود µl/ml ۰/۱-۱۲/۸ تهیه و سپس ۱۰ میکرولیتراز سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده با غلظت نهایی (3×10^8cfu/ml) به‌صورت جداگانه به محیط اضافه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون در دمای ۲۵درجه سانتیگراد، کمترین رقتی که در آن هیچ باکتری رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) در نظر گرفته شد. در این آزمایش یک نمونه نیز به‌عنوان نمونه شاهد که در معرض عصاره قرار نگرفته بود مورد مطالعه قرار گرفت. به‌منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) نیز، در شرایط کاملاً استریل از همه لوله‌های فاقد کدورت ۱۰ میکرولیتر از لوله‌های حاوی محیط کشت برداشته و روی محیط ژلوز خون کشت داده شد، پس از گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون، MBC، با مشاهده تعداد کلنی‌ها بدست آمد.



شکل ۱. جدایه‌های باکتری که در این مطالعه استفاده شده‌اند. الف: باکتری *L. garvieae* و ب: باکتری *A. hydrophila* (رنگ آمیزی گرم)

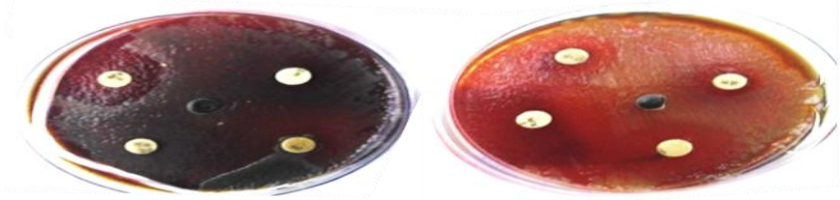
۳- نتایج

بر اساس نتایج حاصل از قطر هاله عدم رشد در روش دیسک کاغذی عصاره سداب و آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در این آزمایش در جدول ۱ و شکل ۲ ارائه شده است. براساس نتایج عصاره اتانولی سداب در مقایسه با دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی اریترومایسین و انروفلوکساسین، تتراسایکلین و سولفامتوکسازول تأثیری بر رشد هیچ یک از باکتری‌ها نشان نداد. در حالی که تمامی آنتی¬بیوتیک¬های مزبور اثر ممانعت کنندگی رشد بر باکتری *A. hydrophila* نشان دادند، تنها آنتی¬بیوتیک انروفلوکساسین بر باکتری *L. garvieae* اثر ممانعت کنندگی نشان داد.

همچنین به علت وجود کدورت عصاره در لوله‌های اولیه میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) قابل تشخیص نبود و در تمام لوله ها به جز لوله شاهد کدورت مشهود دیده شد که حاکی از رشد بارز باکتری و عدم اثر مقادیر ذکر شده بود. به‌علاوه حداقل غلظت کشندگی (MBC) به‌دلیل زیاد بودن تعداد کلنی‌ها قابل محاسبه نبود. در نتیجه عصاره سداب خاصیت ضد باکتریایی نداشته و نمی-توان آن را برای درمان و کنترل عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها استفاده نمود.

جدول ۱. قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) باکتری‌های آئروموناس هیدروفیلا و لاکتوکوکوس گارویه در حضور عصاره سداب و برخی آنتی‌بیوتیک‌های تجاری با روش دیسک کاغذی بر روی محیط بلاد آگار.

گونه باکتری	آنتی بیوتیک				عصاره
	Erythromycin15	sulfamethoxazole	Enrofloxacin5	Tetracycline30	*R. graveolens*
A. hydrophila	۸	۱۵	۳۵	۱۴	۰
L. garvieae	۰	۰	۲۵	۰	۰



شکل ۲. اثر ممانعت کنندگی رشد عصاره سداب و چهار آنتی‌بیوتیک‌های تجاری (اریترومایسین و انروفلوکساسین، تتراسایکلین و سولفامتوکسازول) بر باکتریهای آئروموناس هیدروفیلا (راست) و لاکتوکوکوس گارویه(چپ) بر روی محیط بلاد آگار

۴- بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه اثرات ضد باکتریایی عصاره سداب بر دو جدایه بیماری‌زای لاکتوکوکوس گارویه (*L. garvieae*) و آئروموناس هیدروفیلا (*A. hydrophila*) جداسازی شده از مزارع قزل‌آلای کشور بررسی و همچنین با چهار آنتی‌بیوتیک انتخابی مقایسه شد. با توجه به نتایج، عصاره اتانولی گیاه سداب اثر ممانعت کنندگی رشد علیه باکتری‌های مورد مطالعه را نشان نداد. بعلاوه انتی‌بیوتیک انروفلوکساسین بیشترین اثر ممانعت کنندگی رشد را نسبت به هر دو باکتری بررسی شده نشان داد. خاصیت ضد باکتریایی و سیتوتوکسیک سداب علیه گونه‌های مختلف باکتریایی گرم مثبت از جمله باسیلوس سابتیلیس(*Bacillus subtilis*) ، باسیلوس سرئوس (*B. cereus*) استافیلوکوکوس آرئوس (*Staphylococcus aureus*)، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (*S. epidermidis*) میکروکوکوس فلاووس (*Micrococcus flavus*) ، میکروکوکوس لوتوس (*M. luteus*) لیستریا منوسیتوژن (*Lysteria monocytogen*) و استرپتوکوکوس پیوژن (*Streptococcus pyogenes*) اثبات شده است (Ivanova et al., 2005; Orlanda and Nascimento, 2015) . همچنین اثر ممانعت کنندگی از رشد عصاره هیدرو الکلی این گیاه بر باکتری گرم منفی اشریشیا کولای (*Escherichia coli*)و همچنین بر سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) نیز نشان داده شده که با اثر جنتامایسین برابری داشته است (Olia et al., 2004; Orlanda and Nascimento, 2015). به‌علاوه مشخص شده است که باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی به عصاره آن حساس هستند (Alzoreky et al., 2003; Ivanova et al., 2005). با این وجود در مطالعه حاضر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی سداب خاصیت ضد باکتریایی بر هیچ یک از باکتری های گرم مثبت و منفی بررسی شده نشان نداد که با نتایج احمدی جلالی مقدم و همکاران (۲۰۱۲) همخوانی دارد که اثر ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و هیدروالکلی برگ و ساقه گیاه سداب بر هشت سویه باکتری بیماری‌زای شایع انسانی شامل انتروکوکوس فکالیس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس، استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پنومونیا، کلبسیلا پنومونیه، اشریشیا کولی، سالمونلا تیفی و

انتروباکترکلواکه بررسی نمودند ولی عصاره ها حتی با غلظت بالا (۳ میلی‌گرم بر میلی لیتر) اثر ممانعت کنندگی رشد علیه باکتری‌های مورد مطالعه را نشان ندادند. علیرغم اینکه در بیشتر منابع فعالیت‌های ضد میکروبی بیشتر به ترکیبات فنولی همچون اوژنول، تیمول، کارواکرل و اتانول نسبت داده شده است (Burt, 2004; Bakkali et al., 2008)، اما اخیراً مشخص شده که اسانس سداب از این ترکیبات زیاد غنی نیست و بیشتر فعالیت‌های بیولوژیک آن مربوط به ترکیبات متیل کتون می‌باشد (Orlanda and Nascimento, 2015). با این وجود ترکیبات فنلی، آلکالوییدها و ترپنوییدهای موجود در این گیاه خاصیت ضد باکتریایی از خود نشان داده‌اند (Al-Bakri and Afifi, 2007). میزان فعالیت ضد میکروبی بستگی به‌وجود یا فقدان برخی ترکیبات و میزان آنها در گیاه دارد(Belletti et al., 2004) ، که می‌تواند تحت تاثیر عوامل زیادی از جمله منطقه جغرافیایی رویش گیاه، واریته گیاهی، سن گیاه در هنگام تهیه اسانس و یا عصاره متغییر باشد(Bagamboula et al., 2004). به‌علاوه سویه‌های باکتری مختلف میزان حساسیت متفاوتی دارند و همچنین عصاره‌هایی که با استفاده از روش‌ها و حلال‌های متفاوت از یک گیاه اسخراج می‌شوند می‌توانند آثار ضد میکروبی متفاوتی روی گونه‌های مختلف ارگانیسمی از خود نشان دهند (Nostro et al., 2000)، بنابراین تمامی این عوامل می‌توانند دلیلی برای نتایج متناقض گزارش شده باشند. به‌طور خلاصه نتایج این بررسی نشان داد که عصاره اتانولی سداب (*R. graveolens*) اثر ممانعت‌کنندگی رشد بر دو جدایه بیماری‌زای شایع در مزارع قزل آلای کشور ندارند که ممکن است به دلیل مقاوم بودن سویه‌های باکتریایی بررسی شده، فقدان یا پایین بودن مواد ضدمیکروبی خود گیاه و یا ناشی از شیوه استخراج عصاره باشد.

فهرست منابع

1. **Ahmadi jalali Moghadam, M., Honarmand, H., Falah-Delavar, S., Saeidinia, A., (2012).** Study on antibacterial effect of *Ruta graveolens* extracts on pathogenic bacteria. Annals of Biological Research, 3:4542-4545.
2. **Al-Bakri, A.G., Afifi, F.U., (2007).** Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. Journal of Microbiology Methods, 68: 19-25.
3. **Alzoreky, N.S., Nakahara, K., (2003).** Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asian International Journal of Food Microbiol, 80: 223-230.
4. **Aoki, T., Takami, K. & Kitao, T., (1990).** Drug yesistance in non hemolitic *streptococcus* sp. Isolateol from cultured yellow tail. Disease of Aquatic organisms, 8: 171-177.
5. **Austin, B., & Austin, D. A., (2007).** Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish. Springer.
6. **Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M., Debevere, J., (2004).** Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, Linalool and P-Cymene towards shigella sonnei and S. Flexneri. Food Microbiology, 21: 33-42.
7. **Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, B., Idaomar, M., (2008).** Biological effects of essential oils - a review. Food and Chemical Toxicology, 46: 446-475.

8. **Barbosa, F.S., Leite, G.L.D., Alves, S.M., Nascimento, A.F., D'Avila, V.A., Costa, C.A., (2011).** Insecticide effects of *Ruta graveolens*, Copaifera langsdorffii and Chenopodium ambrosioides against pests and natural enemies in commercial tomato plantation. Maringa, 33: 37-43.
9. **Belletti, N., Ndagihimana, M., Sisto, C., Guerzoni, M., Lanciotti, R., Gardini, F., (2004).** Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 6932-6938.
10. **Ivanova , A., Mikhova, B., Najdenski, H., Tsvetkova, I., Kostova, I., (2005).** Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ruta graveolens*. Fitoterapia, 76: 344 - 7.
11. **Khouri, N.A., EL-Akawi, Z., (2005).** Antiandrogenic activity of *Ruta graveolens L* in male Albino rats with emphasis on sexual and aggressive behavior. *Neuroendocrinology Letters*, 26: 823-829.
12. **Meepagala, K.M., Schrader, K.K., Wedge, D.E., Duke, S.O., (2005).** Algicidal and antifungal compounds from the roots of Ruta graveolens and synthesis of their analogs. Phytochemistry, 66:2689–95.
13. **Miguel, E.S., (2003).** Rue in traditional Spain: frequency and distribution of its medicinal and symbolic applications. Economic Botany, 57: 231-244.
14. **Nostro, A., Gernano, M.P., Angelo, V.A., Marino, A., Cannatelli, M.A., (2000).** Extraction methods and bio autography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Letter Applied Microbiology, 30: 379-384.
15. **Olia, P., Saderi, H., Tabatabai nejad, S., Naseri, M., Rezaie, M., (2004).** Comparison of antimicrobial effect of Ruta graveolens extract and Gentamycin on Psudomonas aeroginosa. Iran Med. and Aromatic Plants Res. J, 2: 171-80.
16. **Orlanda, J.F.F., Nascimento, A.R., (2015).** Chemical composition and antibacterial activity of *Ruta graveolens L.* (Rutaceae) volatile oils, from São Luís, Maranhão, Brazil. South African Journal of Botany, 99: 103-106.
17. **Preethi, K.C., Kuttan, G., Kuttan, R., (2006).** Anti-tumour activity of *Ruta graveolens* extract. Asian Pac J Cancer Prev, 7: 439-43.
18. **Ratheesh, M., Shyni, G.L., Sindhu, G., Helen, A., (2011).** Inhibitory effect of Ruta graveolens L. on oxidative damage, inflammation and aortic pathology in hypercholesteromic rats. Experimental and Toxicologic Pathology, 63-285–290.
19. **Toserkani, A., Jalali, M.R., Najafzaheh, H., (2011).** Changes of lipid profiles, glucose, and hemogram after administration of *Ruta graveolens* extract in diabetic rats. Comp. Clin. Pathol, 10: 1331-1333.
20. **Velag, J., Studlla, G., (2005).** The Medicinal Plants. Persian Translation by Zaman S. Sixth Ed. Tehran. Naghsh Iran publication.