

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

سهراب احمدی وند<sup>۱\*</sup>، مهدی سلطانی<sup>۱</sup>، مهران احمد پور<sup>۱</sup>، سهیل ایگدری<sup>۲</sup>

چکیده

سداب (*Ruta graveolens*) از جمله گیاهان دارویی در طب سنتی است که دارای خواص دارویی متعددی از جمله ضد سرطانی، آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب، ضد میکروبی، ضد تشنج و کاهش فشار خون می‌باشد. در مطالعه کنونی اثرات ضد باکتریایی عصاره اتانولی این گیاه بر دو جدایه بیماری‌زای لاکتوکوکوس گارویه (*Lactococcus garvieae*) و آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) جداسازی شده از مزارع قزل‌آلای کشور که به ترتیب گرم مثبت و منفی می‌باشند تعیین و با آنتی‌بیوتیک‌های اریترومايسين و انروفلوکسازین، 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 دایلوژن تعیین گردید. بر اساس نتایج عصاره اتانولی سداب اثر ممانعت‌کنندگی رشد بر دو جدایه بیماری‌زای شایع در مزارع قزل‌آلای 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، *Lactococcus garvieae*، *Aeromonas hydrophila*

۱- گروه بهداشت و بیماری‌های 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 آبی‌پروری می‌باشند که موجب بروز مشکلات و خسارات فراوان می‌شوند. به‌طور کلی 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 *Pasteurella sp*، *Flavobacterium sp*، *Pseudomonas spp*، *A. hydrophila* ایجاد می‌شوند، 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 قزل‌آلای کشور ایجاد می‌نماید. در حال حاضر از جمله روش‌های مرسوم مقابله با این بیماری‌ها استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و در برخی موارد استفاده از واکسن‌ها می‌باشد. از مهمترین عوامل محدود کننده استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، 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 می‌گردند (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 آنتی‌بیوتیک‌ها ضروری به نظر می‌رسد. در سال‌های 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 خانواده Rutaceae و از راسته Sapindales است که بیش از ۱۶۰ جنس و ۱۶۰۰ گونه را شامل می‌شود (Miguel, 2003). این گیاه از کهن‌ترین 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 می‌کردند (Ratheesh et al., 2011).

همچنین خواص دارویی متعدد این گیاه از جمله ضد تشنج، 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). اخیراً 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 (Khouiri 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 قزل‌آلای کشور انجام شد. بدین منظور حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) و حداقل غلظت مهار رشد (MIC) با استفاده از روش میکرو دایلوژن همچنین اثر باکتری‌کشی 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

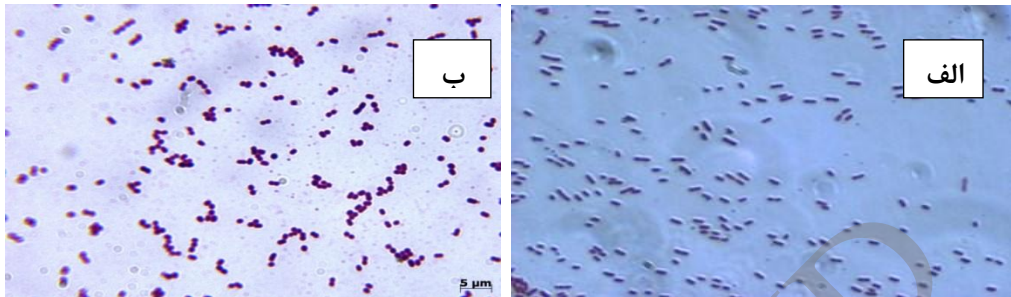
ابتداء دو جدایه بیماری‌زای لاکتوکوکوس گارویه و آئروموناس هیدروفیلا که به ترتیب گرم مثبت و منفی می باشند و قبلاً از مزارع قزل‌آلای کشور جداسازی و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) شناسایی شده بودند از قطب بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شدند. سپس در شرایط استریل باکتری‌ها بر روی 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 به منظور سنجش خاصیت ضد باکتریایی عصاره سداب و سایر آنتی بیوتیک‌ها 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 ( $3 \times 10^8$  cfu/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 کارایی عصاره سداب در مقابل تأثیر سایر آنتی-بیوتیک‌ها بر روی جدایه‌های مختلف باکتری‌ها از دیسک‌های استاندارد Erythromycin 15، Enrofloxacin 5، sulfamethoxazole 5 و Tetracycline 30 استفاده شد. سپس در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت هاله منطقه مهار رشد به وسیله کولیس اندازه‌گیری شد. آزمایش در ۳ تکرار انجام گرفت و قطر هاله‌های بدست آمده از دیسک‌های آنتی بیوتیکی مورد 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) (CLSI 2000) با اندکی تغییرات با سه بار تکرار تعیین شد. بدین منظور رقت‌های متوالی از عصاره تهیه شده در محیط TSB و در محدود  $1/8 - 1/16$  و تهیه و سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده با غلظت نهایی ( $3 \times 10^8$  cfu/ml) به صورت جداگانه به محیط اضافه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه 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 به عنوان نمونه شاهد که در معرض عصاره قرار نرفته بود مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور 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)

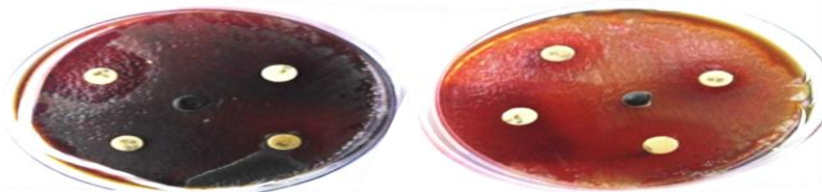
### ۳- نتایج

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 اریترومايسين و انروفلوکساسين، تتراسایکلین و سولفامتوکسازول تأثیری بر رشد هیچ یک از باکتری‌ها نشان نداد. در حالی که تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مزبور اثر ممانعت‌کنندگی رشد بر باکتری *A. hydrophila* نشان دادند، تنها آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین بر باکتری *L. garvieae* اثر ممانعت‌کنندگی نشان داد.

همچنین به علت وجود کدورت عصاره در لوله‌های اولیه میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) قابل تشخیص نبود و در تمام لوله‌ها 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) به دلیل زیاد بودن تعداد کلنی‌ها قابل محاسبه نبود. در نتیجه عصاره سداب خاصیت ضد باکتریایی نداشته و نمی‌توان آن را برای درمان و کنترل عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها استفاده نمود.

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

عصاره	آنتی بیوتیک				گونه باکتری
	Tetracycline30	Enrofloxacin5	sulfamethoxazole	Erythromycin15	
<i>R. graveolens</i>	۱۴	۳۵	۱۵	۸	<i>A. hydrophila</i>
.	.	۲۵	.	.	<i>L. garvieae</i>



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

#### ۴- بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه اثرات ضد باکتریایی عصاره سداب بر دو جدایه بیماری‌زای لاکتوکوکوس گارویه (*L. garvieae*) و آنرومونس 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 ممانعت‌کنندگی رشد علیه باکتری‌های مورد مطالعه را نشان نداد. بعلاوه آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین بیشترین اثر ممانعت‌کنندگی 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 سابیتیلیس (*Bacillus subtilis*)، باسیلوس سرئوس (*B. cereus*) استافیلوکوکوس آرئوس (*Staphylococcus aureus*)، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (*S. epidermidis*) میکروکوکوس فلاووس (*Micrococcus flavus*)، میکروکوکوس لوتوس (*M. luteus*) لیستریا منوسیژن (*Lysteria monocytogenes*) و استرپتوکوکوس پیژن (*Streptococcus pyogenes*) اثبات شده است (Ivanova et al., 2005; Orlanda and Nascimento, 2015). همچنین اثر ممانعت‌کنندگی از رشد عصاره هیدرو الکلی این گیاه بر باکتری گرم منفی اشیریشیا کولای (*Escherichia coli*) و همچنین بر سودومونس آنروژینوزا (*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 باکتری‌های 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، اشیریشیا کولی، سالمونلا تیفی و

انتروباکترکلوکاهه بررسی نمودند ولی عصاره ها حتی با غلظت بالا (۳ میلی گرم 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، آلکالوئیدها و ترپنوییدهای موجود در این گیاه خاصیت ضد باکتریایی از خود نشان داده‌اند (Al-Bakri and Afifi, 2007). میزان فعالیت ضد میکروبی بستگی به وجود 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 استخراج می‌شوند می‌توانند آثار ضد میکروبی متفاوتی روی گونه‌های مختلف ارگانسمی 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 آلابی کشور 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.

#### فهرست منابع

1. **Ahmadi jalali Moghadam, M., Honarmand, H., Falah-Delavar, S., Saedinia, 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 resistance in non hemolytic *streptococcus* sp. Isolate 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 cerevisiae*. *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 *Pseudomonas aeruginosa*. *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.