گیاه‌پزشکی (مجله علمی کشاورزی)

جلد ٤٥، شماره ٤، زمستان ١٤٠١

10.22055/ppr.2022.17931

ارزیابی خاصیت ضدباکتریایی اسانس به‌لیمو و پنج گونه نعنا روی باکتری‌های بیمارگر *Xanthomonas citri* subsp. *citri*، *X. gardneri* و *X. perforans*

سیده زهره موسوی فر[۱]، حسین میرزایی نجفقلی[۲]* مصطفی درویش‌نیا[۳] و حسن مومیوند[۴]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲-*نویسنده مسوول: استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران (mirzaei.h@lu.ac.ir)

۳-استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۴-دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۵

چکیده

بیماری شانکر باکتریایی مرکبات ناشی از باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* و لکه‌برگی‌های باکتریایی ناشی از باکتری‌های بیمارگر *Xanthomonas gardneri* و *Xanthomonas perforans* از مهمترین بیماری‌های باکتریایی می‌باشند. کنترل این بیماگرها به دلیل محدودیت استفاده از سموم، آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت آن‌ها نسبت به سموم با چالش جدی مواجه می‌باشد. از این‌رو اسانس‌های گیاهی به عنوان یک جایگزین مناسب برای کنترل بیمارگرهای گیاهی مطرح می‌باشند. در مطالعه حاضر اثر اسانس‌های به‌لیمو، پونه، نعنا فلفلی، نعنا سبز، نعنا سیب و نعنا آبی علیه باکتری‌های بیمارگر *X. citri* subsp. *citri*، *X. gardneri* و *X. perforans* بررسی شده است. پس از استخراج اسانس‌های گیاهی، ترکیبات تشکیل‌دهنده‌ی آن‌ها با کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی‌جرمی (GC-MS) شناسایی شدند. سپس اثر ضدباکتریایی اسانس‌ها با استفاده از روش نشت در دیسک بررسی گردید. همچنین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)، اثر ترکیبی اسانس‌های گیاهی و اثر اسانس پونه علیه باکتری *X. gardneri* با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آنالیز GC-MS اسانس‌ها نشان داد که در مجموع به ترتیب ۲۸، ۲۸، ۳۰، ۳۶، ۳۹ و ٤٢ ترکیب به عنوان ترکیبات اسانس‌های نعنا سیب، نعنا فلفلی، پونه، نعنا آبی، نعنا سبز و به‌لیمو شناسایی شد. بیشترین میزان هاله بازدارنده مربوط به گونه پونه روی باکتری *X. citri* subsp. *citri* به میزان ۲/۰۸ ± ٢٤ میلی‌متر و کمترین هاله‌بازدارنده مربوط به اسانس نعنا سیب روی *X. gardneri* به میزان ٠/٦٦ ± ٥/٦٦ میلی‌متر بود. MIC و MBC برای اسانس‌های مورد بررسی علیه باکتری‌های بیمارگر به ترتیب بین ١-٥ و ٦-٢ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین اثر سینرژیستی بین اسانس‌های مختلف مانند نعنا فلفلی-به‌لیمو، پونه-نعنا سبز، پونه-نعنا آبی روی باکتری‌های بیمارگر مشاهده گردید. مطالعات میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان داد که اسانس پونه سبب تخریب کامل سلول، آسیب دیواره سلولی، ناحیه هسته‌ای متورم و تغییر در تراکم سیتوپلاسم سلول‌های باکتریایی *X. gardneri* شده است.

کلیدواژه‌ها: MIC، MBC، GC-MS، اسانس

دبیر تخصصی: دکتر رسول رضائی

Citation: Mousavifar, S. Z., Mirzaei Najafgholi, H., Darvishnia, M. & Mumivand, H. (2023). Antibacterial properties of lemon essential oil and five types of mint on pathogenic bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *X. gardneri* and *X. perforans*. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, *45*(4), 37-51. https://doi.org/10.22055/ppr.2022.17931.

مقدمه

بیماری شانکر باکتریایی مرکبات ناشی از باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* مخرب‌ترین بیماری مرکبات در سراسر جهان است (Mirzaei Najafgholi et al., 2017). این بیماری تحت نام‌های بلاست جوانه و شکوفه، سرخشکیدگی و بلایت سرشاخه نیز شناخته شده است. بیماری لکه‌برگی باکتریایی ناشی از عوامل *X. perforans* و *X. gardneri* گونه‌های گوجه‌فرنگی، فلفل دلمه‌ای و فلفل قرمز را آلوده می‌کند. استفاده از ارقام مقاوم، هرس شاخه‌های آلوده و مبارزه شمیایی با سموم حفاظتی مانند ترکیبات مسی، راهکارهای موجود برای کنترل بیماری‌های شانکر باکتریایی و لکه‌برگی باکتریایی در ایران می‌باشد. با توجه به تاثیر پایین، پایداری در چرخه‌های اکولوژیکی، خاصیت گیاه‌سوزی، بروز مقاومت در جمعیت‌های عامل بیمارگر و آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از استفاده از سموم مسی بکارگیری از راهکارهای ایمن و جایگزین مانند استفاده از اسانس‌های گیاهی ضروری می‌باشد (Mahmodi et al., 2009; Aeini et al., 2018). اسانس‌ها ترکیبات فراری هستند که از تقطیر مواد فرار موجود در اندام‌های مختلف گیاهان تازه یا خشک همراه با بخار آب بدست می‌آیند و وزن مخصوص آن‌ها غالباً از آب کمتر است. اسانس‌ها شامل مخلوط پیچیده‌ای از مواد شیمیایی آلی مثل ترپینوئیدها، آلدئیدها، الکل‌ها، استرها و استن‌ها می‌باشند. اسانس‌ها از طریق نفوذ به غشای سلولی و میتوکندری سبب تخریب، افزایش نفوذپذیری غشا، نشت مولکول‌ها، یون‌ها و دیگر محتویات سلولی می‌شوند (Burt, 2004). در پژوهش Beiki & alizadeh (2005) فعالیت ضدباکتریایی اسانس پونه در برابر باکتری‌های بیمارگر به‌ویژه باکتری‌های گرم‌مثبت نشان داده شده است (Beiki & alizadeh, 2005). همچنین در بررسی Soylu et al., (2005) تاثیر چندین اسانس گیاهی بر باکتری عامل شانکر گوجه‌فرنگی *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* نشان داده شد (Soylu et al., 2005). در مطالعه Hevesi et al., (2006) خواص ضدباکتریایی ۳۶ گونه گیاهی بر روی باکتری‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*، *Pseudomonas savastanoi*، *Erwinia amylovora* و *Xanthomonas vesicatoria* نشان داده شد. در این بررسی اسانس گونه‌های نعناع و آویشن بیشترین میزان بازدارندگی را علیه باکتری‌های بیمارگر نشان دادند (Hevesi et al., 2006). اسانس نعنا فلفلی فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی قابل توجهی را علیه میکروارگانیسم‌های بیمارگر مختلف نشان داده است. این اسانس فعالیت ضدباکتریایی علیه سویه‌های متعدد گونه‌های *Agrobacterium* نشان داده است. به‌طوری‌که از تشکیل گال در گیاهان گوجه‌فرنگی تلقیح شده با سویه بیماری‌زا *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 23308T جلوگیری کرده است (Hsouna et al., 2019). با توجه به محدودیت‌های کنترلی بیماری‌های باکتریایی گیاهان و همچنین پژوهش‌های انجام شده، اسانس‌های گیاهی می‌توانند به عنوان یک منبع از ترکیبات ضدباکتریایی مورد استفاده قرار گیرند. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس گیاهان دارویی پونه[1]، نعنا سبز[2]، نعنا سیب[3]، نعنا آبی[4]، نعنا فلفلی[5] و به‌لیمو[6] بر روی باکتری‌های بیمارگر گیاهی *Xanthomonas citri* subsp. *citri*، *X. perforans* و *X. gardneri* می‌باشد.

1- *Mentha pulegium*
2- *M. spicata*
3- *M. saulavens*
4- *M. aquatica*
5- *M. piperita*
6- *Lippia citriodora*

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های باکتریایی

سویه‌های باکتریایی *X. citri* subsp. *citri*، *X. perforans* و *X. gardneri* از کلکسیون باکتری‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه لرستان تهیه گردید.

استخراج اسانس

به منظور استخراج اسانس، نمونه‌های گیاهی پونه، نعنا سیب، نعنا آبی، نعنا سبز، نعنا فلفلی و به‌لیمو درسال زراعی ۱۴۰۰ در استان لرستان جمع‌آوری شد. گیاهان تازه در سایه و در هوای اتاق به مدت ۲۰ روز خشک شدند. اسانس از نمونه‌های برگ با روش تقطیر با آب با استفاده از دستگاه کلونجر به مدت سه ساعت استخراج شد. اسانس‌های استخراج شده درون ویال‌های دو میلی‌لیتری حاوی سولفات سدیم بی‌آب ریخته و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Mirzaei Najafgholi et al., 2017).

شناسایی ترکیبات اسانس

به منظور شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌ها از دستگاه GC-MS، مدل شیمادزو GC-17A (کیوتو، ژاپن) کروماتوگرافی گازی کویل شده با طیف‌سنج جرمی مدل MS Model QP5050 اسپکترومتر جرمی استفاده شد. شناسایی ترکیبات در ستون BP-5 پوشش داده شده با فیلم ۰/۲۵ میکرومتر به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۲ میلی‌متر (شیمادزو) انجام گرفت. از هلیوم خالص با سرعت یک میلی‌لیتر بر دقیقه به عنوان گاز حامل استفاده شد. انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد بود. دمای آون از ۵۰ درجه سانتی‌گراد تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت چهار درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافت و به مدت ۵ دقیقه در ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. دمای تزریق و آشکارساز به ترتیب ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. شناسایی کمی ترکیبات اسانس نیز با دستگاه GC-FID انجام گرفت. برنامه دمایی و شرایط دستگاه GC-FID نیز مشابه GC-MS بود. شناسایی ترکیبات اسانس با استفاده از محاسبه شاخص‌های بازداری آن‌ها پس از تزریق N-Alkanes (C8-C24) به ستون DB-5 و با استفاده از مقایسه طیف‌های جرمی آن‌ها با کتابخانه داخلی دستگاه طیف سنج جرمی مرجع (NIST08 و Wiley 9.0) انجام شد (Adams, 2007).

تعیین خواص ضدباکتریایی اسانس‌ها به روش انتشار از دیسک

این روش برای غربالگری اولیه خواص ضدباکتریایی اسانس‌های پونه، نعناسیب، نعنا آبی، نعنا سبز، نعنا فلفلی و به‌لیمو در برابر جدایه‌های *X. citri* subsp. *citri*، *X. gardneri* و *X. perforans* استفاده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی 10^8 CFU.ml^{-1} با استفاده از میله‌های شیشه‌ای ال‌شکل روی محیط کشت NA کشت گردید. سپس دیسک‌های کاغذی شش میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میکروگرم از هر یک از اسانس‌ها روی محیط کشت‌های NA حاوی باکتری‌ها قرار داده شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند و سپس قطر نواحی بازدارنده رشد باکتری در اطراف دیسک‌ها اندازه گیری شد. از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر) و آب مقطر به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد (Militello et al., 2011).

بررسی میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) با استفاده از روش میکرودایلوشن و ماکرودیلوشن

به منظور تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MIC) اسانس‌های مورد نظر از روش‌های Microdilution و Macrodilution استفاده شد. از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌های باکتریایی در محیط کشت مایع سوسپانسیون 10^8 CFU.ml^{-1} تهیه شد. مقدار ۷۰ میکرولیتر از محیط کشت NB به هر یک از چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای الیزا اضافه شد. سپس ۷۰ میکرولیتر از هر یک از

اسانس‌ها به چاهک اول هر یک از ردیف‌ها اضافه گردید. در مرحله بعد از چاهک اول تا چاهک آخر هر ردیف با پیپت کردن اسانس با محیط‌کشت به روش سری رقت، غلظت‌های مختلف اسانس با محیط‌کشت مخلوط گردید. در نهایت ۱۰ میکرولیتراز سوسپانسیون‌های باکتریایی به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در شیکر-انکوباتور با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه انکوبه شدند. سپس با اندازه‌گیری میزان کدورت و کشت از هر چاهک بر روی محیط‌کشت NA، MBC و MIC اولیه تعیین گردید. در مرحله بعد برای تعیین غلظت دقیق MIC و MBC از روش Macrodilution در لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتری حاوی پنج غلظت بین MBC و MIC اولیه استفاده گردبد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد (Mirzaei Najafgholi et al., 2017).

بررسی اثرات ترکیبی اسانس‌ها (FIC[1])

اثرات هم‌افزایی بین اسانس‌ها با روش Microdilutionبر روی پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای الیزا انجام شد (Mirzaei Najafgholi et al., 2017). مقدار ۷۰ میکرولیتر از هر رقت MIC اسانس مطابق با فرمول (2x, 1x, $\frac{1}{2}, \frac{1}{4}, \frac{1}{8}, \frac{1}{16}, \frac{1}{32}, \frac{1}{64}$) به هر ردیف اضافه گردید. سپس مقدار ۷۰ میکرولیتر از اسانس دیگر در جهت عمود مطابق با فرمول بالا به چاهک‌ها اضافه گردید. در نهایت مقدار ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت $۱۰^{۸}$ $CFU.ml^{-1}$ به هر چاهک اضافه شد. پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد روی شیکر-انکوباتور با سرعت ۱۲۵ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. هر آزمایش در سه تکرار انجام شد. شاخص غلظت بازدارنده کسری (FICI)نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$FICI = FIC\ A + FIC\ B = \frac{MIC\ A\ in\ combination}{MIC\ A\ alone} + \frac{MIC\ B\ in\ cobination}{MIC\ B\ alone}$$

FICI: مجموع غلظت بازدارندگی کسری اسانس گیاه A و B

MIC A: حداقل غلظت بازدارندگی اسانس A

MIC B: حداقل غلظت بازدارندگی اسانس B

برهمکنش ترکیب دو ماده به عنوان یک اثر هم‌افزایی تعریف می‌شود. اگر شاخص FIC کمتر از۰/۵ بود سینرژیستی، اگر ۱> FICI > ۰/۵ به صورت افزایشی ، اگر۴ ≥ FICI > ۱بود بی تفاوت و اگر ۴< FIC به صورت متضاد خواهد بود.

بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس پونه علیه باکتری *X. gardneri* با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری

به منظور آماده سازی سویه باکتریایی برای ارزیابی اثر اسانس پونه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (Leo-912 AB)، ابتدا کشت‌های ۲۴ ساعته از سویه باکتریایی در محیط‌کشت NB تهیه گردید. مقدار MIC از اسانس پونه به محیط‌کشت NB حاوی سویه باکتریایی اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت سوسپانسیون باکتریایی با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ شد. به منظور فیکس اولیه، سلول‌های باکتریایی در محلول ۲/۵ درصد گلوتارالدهید برای مدت ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس نمونه‌های اولیه سه مرحله به مدت ۱۰ دقیقه با بافر کاکودیلیت شست‌وشو و با محلول اوسیوم تراا‌کسید یک درصد فیکس شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها با بافر کاکودیلت برای مدت ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه شست‌وشو شدند. نمونه‌ها در اکسید پروپیلن و رزین با نسبت‌های ۱:۳، ۱:۱، ۳:۱ و رزین خالص به ترتیب به مدت ۱۲، ۴، ۱۲ و ۲۴ ساعت قرار داده شدند. در مرحله سوم قالب‌های نمونه‌ها درون آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. سپس توسط اولترامیکروتوم، برش‌های ۷۵ نانومتری تهیه و توسط اورانیل استات یک درصد و سیترات سرب رنگ-آمیزی شدند (Lucas et al., 2012).

1- fractional inhibitory concentration index

آنالیز داده‌ها

آزمایش‌های انجام شده در قالب طرح کاملا تصادفی و آنالیزهای آماری توسط نرم افزار SAS 9.1 انجام پذیرفت.

نتایج

ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌ها

نتایج آنالیز GC-MS اسانس‌ها نشان داد که در مجموع به ترتیب ۲۸، ۲۸، ۳۰، ۳۶، ۳۹ و ۴۲ ترکیب به عنوان ترکیبات اسانس‌های نعنا سیب، نعنا فلفلی، پونه، نعنا آبی، نعنا سبز و به‌لیمو شناسایی شد. لینالول[1] با ۴۰/۹۱ درصد جز غالب اسانس نعنا آبی، منتول[2] با ۴۵/۶۶ درصد ترکیب اصلی اسانس نعنا فلفلی، پولگون[3] با ۴۴/۶۷ درصد ترکیب اصلی اسانس پونه، کاروون[4] با ۶۷/۰۲ درصد جز اصلی اسانس نعنا سبز، پیپریتنون[5] با ۵۰/۱۸ درصد ترکیب غالب اسانس نعنا سیب و ایزوژرانیول[6] با ۲۳/۷۲ درصد ترکیب اصلی اسانس به‌لیمو را تشکیل دادند (جدول ۱ و ۲).

بررسی اثر اسانس‌ها بر روی سویه‌های باکتریایی به روش نشت در دیسک

اثر اسانس‌های نعنا سیب، نعنا سبز، پونه، نعنا آبی، نعنا فلفلی و به‌لیمو علیه باکتری‌های *X. citri* subsp. *citri*، *X. gardneri* و *X. perforans* با استفاده از روش انتشار دیسک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که همه‌ی اسانس‌ها قابلیت کنترل باکتری‌های بیمارگر را دارند. بیشترین میزان هاله بازدارنده مربوط به گونه پونه روی باکتری *X. citri subsp. citri* با میزان ۲۴±۲/۰۸ میلی‌متر و کمترین هاله‌بازدارنده مربوط به اسانس نعنا سیب روی *X. gardneri* با میزان ۵/۶۶±۰/۶۶ میلی‌متر بود. همچنین همه‌ی اسانس‌های مورد بررسی اثر بازدارنده قوی را علیه باکتری *X. perforans* از خود نشان دادند (جدول ۳).

تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

به منظور تعیین مقادیر MIC و MBC اسانس‌ها از روش میکرودیلوشن و ماکرودیلوشن استفاده گردید (جدول ۴). براساس نتایج به دست‌آمده کمترین مقدارMIC و MBCبرای باکتری *X. gardneri* مربوط به اسانس پونه به ترتیب با مقادیر دو و سه میکرولیتر بر میلی‌لیتر و برای باکتری *X. citri* subsp. *citri* مربوط به اسانس‌های پونه و به‌لیمو با مقادیر یک و دو میکرولیتر بر میلی‌لیتر بود. همچنین کمترین مقدار MIC و MBC برای باکتری *X. perforans* مربوط به اسانس نعنا فلفلی به ترتیب با مقادیر یک و دو میکرولیتر بر میلی‌لیتر بود.

بررسی اثرات ترکیبی اسانس‌ها

نتایج اثرات ترکیبی اسانس‌ها علیه سویه باکتریایی *X. gardneri* نشان داد که اسانس‌های به‌لیمو-نعنا فلفلی، پونه‌نعنا سبز، نعنا فلفلی-نعنا آبی، نعنا آبی-نعنا سبز، نعنا سیب-نعنا سبز، پونه-به‌لیمو، به‌لیمو-نعنا سبز و پونه-نعنا فلفلی با همدیگر دارای اثر سینرژیستی هستند. برای باکتری *X. perforans* اسانس‌های نعنا فلفلی-بی‌لیمو، نعنا فلفلی-نعنا آبی، نعنا آبی-پونه، نعنا آبی-نعنا سبز و پونه-نعنا فلفلی اثر سینرژیستی از خود نشان دادند. برای باکتری *X. citri* subsp. *citri* اسانس‌های نعنا فلفلی-بی‌لیمو، پونه-نعنا سبز و نعنا آبی-پونه اثر سینرژیستی از خود نشان دادند (جدول ۷).

بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس پونه علیه باکتری *X. gardneri* با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری

در بررسی اثر اسانس پونه علیه باکتری *X. gardneri*، تخریب کامل سلول، آسیب دیواره سلولی، ناحیه هسته‌ای رنگی، تغییر در تراکم سیتوپلاسم، و تورم در سلول‌های تیمار شده با اسانس پونه مشاهده شد (شکل ۱).

1- Linalool
2- Menthol
3- Pulegone
4- Carvon
5- Piperitenone
6- Isogeraniol

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی اسانس‌های گیاهان به‌لیمو، پونه و نعنا سیب.

Table 1. Chemicals composition of the essential oils of *Lippia citriodora, M. pulegium, M. saulavens.*

Lippia citriodora			*M.. pulegium*			*M. saulavens*		
RI	Constituent	Percent	RI	Constituent	Percent	RI	Constituent	Percent
939	Alpha.-Pinene	0.51	937	Alpha.-Pinene	0.39	937	Alpha.-Pinene	0.52
976	Sabinene	1.31	977	Sabinene	0.4	977	Sabinene	0.38
978	1-OCTAN-3-OL	0.57	985	beta.-Pinene	0.69	985	beta.-Pinene	1.03
985	5-Hepten-2-one,methyl-	3.08	990	Myrcene	0.42	991	Myrcene	0.68
993	3-Octanol	0.11	988	Octan-3-ol	0.63	993	Octan-3-ol	0.19
1031	Limonene	10.32	992	Limonene	0.35	1031	Limonene	1.28
1033	Eucalyptol	5.42	1036	cis.-beta.-Ocimene	0.53	1036	cis.-beta.-Ocimene	1.28
1050	trans-.beta.-Ocimene	0.75	1040	Eucalyptol	2.40	1044	Eucalyptol	0.29
1062	gamma.-Terpinene	0.05	1048	beta.-trans-Ocimene	0.11	1050	beta.-trans-Ocimene	0.28
1068	cis-Sabinenehydrata	0.15	1106	Linalool	1.08	1110	1-Octen-3-yl-acetate	2.83
1100	Perillen	0.08	1174	Menthone	33.29	1160	Menthon	2.01
1098	Linalool	0.49	1179	Menthofuran	0.12	1164	Menthofuran	1.23
1125	Cyclocytral	0.23	1182	Isomenthone	1.82	1186	Isomenthom	0.47
1134	Cis-Limonene Oxide	0.12	1194	Neoisomenthol	2.22	1188	Neoisomenthol	13.54
1153	Citronellal	0.22	1213	alpha.-Terpineol	0.25	1192	P-Cymen-8-ol	0.64
1179	Carane,4,5-epoxy-,trans	0.46	1217	Myrtenal	0.16	1235	cis-3-Hexenyl valatate	0.28
1190	Alpha -Terpinol	0.12	1260	Pulegone	44.67	1258	Pulegone	1.25
1228	Nerol	1.57	1263	Carvone	0.65	1265	carvone	0.85
1240	Neral	19.3	1273	3-cyclohexen-l-one-	0.53	1275	3-Cyclohexen-l-one2-	0.25
152	Piperitone	0.21	1359	Isopropyl-5-methyl-Piperitenone	0.82	1304	Isopropyl-5-methyl-Menthyl acetate	2.30
1273	Isogeraniol	23.72	1380	Piperitenone Oxide	0.63	1365	Piperitenone Oxide	50.1
1306	Thymol	0.56	1431	Caryophyllene	2.62	1391	cis-Jasmone	0.98
1342	4-Isopropenyl-l-methyl-1,2-cyclohexendio	0.41	1453	(Z)-.beta.-Farnesene	0.40	1427	Caryophyllene	1.81
1386	Geranyl acetate	2.43	1468	alpha.-Humulene	0.27	1446	(Z)-.beta.-Farnesene	2.06
1385	Bourbonene	0.51	1493	Germacrene-D	2.91	1480	Germacrene_D	8.88
1404	Caryophyllene	2.57	1508	bicyclogermacrene	0.43	1495	bicyclogermacrene	0.26
1432	Beta.-Gurjunene	0.14	1562	Elemol	0.16	1574	Germacrene D-4-ol	0.25
1460	Humulene	0.23	1593	germacrene D-4-ol	0.16	1612	Viridiflorol	2.62
1458	trans.-beta.-Farnesene	0.71	1576	Spathulenol	0.21			
1479	Ar-Curcumene	3.78	1590	Caryophyllene oxide	0.37			
1480	Germacrene-D	0.57						
1494	bicyclogermacrene	0.74						
1500	Himachalene	0.36						
1513[1]	gamma.-Cadinene	0.22						
1562	Geraniol butyrate	0.09						
1564	Nerolidol	1.68						
1580	Germacrene D-4-ol	0.38						
1576	Spathulenol	4.55						
1594	Caryophyllene oxide	5.29						
1615	Cedrenal	0.18						
1615	Carotol	0.48						
1653	alpha.-Cadinol	0.91						

جدول ۲- ترکیبات شیمیایی اسانس گیاهان نعناسبز، نعناآکواتیکا، نعنافلفلی.

Table 2. Chemicals composition of the essential oils of *Mentha spicata, M. aquatica, M. piperita*.

M. spicata			*M. aquatica*			*M. piperita*		
RI	Constituent	Percent	RI	Constituent	Percent	RI	Constituent	Percent
956	Camphene	0.07	939	Alpha.-pipene	0.17	939	Alpha.-pipene	0.44
977	Sabinene	0.09	976	Sabinene	0.29	976	Sabinene	0.19
985	beta-Pinene	0.14	980	beta.-Pinene	0.61	980	beta.-Pinene	0.5
990	Myrcene	0.25	991	.beta.-Myrcene	0.62	991	.beta.-Myrcene	0.22
1002	Octan-3-ol	0.46	993	3-Octanol	0.04	993	3-Octanol	0.1
1035	Limonene	3.61	1031	l-Limonene	0.25	1031	l-Limonene	1.07
1040	Eucalyptol	0.88	1035	cis-Ocimene	0.50	1033	Cineole	0.24
1079	Linalool Oxid Ecis	0.07	1033	Cineole	9.44	1098	Linalool	0.12
1106	Linalool	0.23	1050	trans-.beta.-Ocimene	0.50	1176	p-Menthone	21.37
1107	Iso Amylisovalerate	0.20	1091	Terpinolene	0.12	1183	Menthofuran	18.24
1119	l-Octen-3-yl-acetate	0.11	1098	Linalool	40.9	1182	Isomenthone	2.26
1172	Menthone	1.71	1126	3-Octanol,acetate	0.10	1170	neo-Menthol	1.71
1182	Isomenthone	0.73	1176	p-Menthone	0.50	1188	Menthol	45.66
1185	Menthol	0.15	1183	Menthofuran	0.07	1197	Neoisomenthol	0.12
1195	Neoisomenthol	5.78	1182	Isomenthone	0.18	1235	cis-3-Hexenylvalerate	0.23
1217	cis-Dihydrocarvone	2.31	1188	Menthol	0.46	1244	Hexyl3-methylbutanoate	0.1
1224	trans-Dihydrocarvone	0.12	1190	l-Terpinen-4-ol	0.13	1256	Linalyacetate	0.04
1241	Hexenylisovalerate	0.12	1190	alpha.-Terpineol	4.88	1258	Pulegone	3.14
1257	Pulegone	5.77	1205	Dihydrocarvone	0.13	1257	(+)-Carvone	0.22
1272	Carvone	67.02	1229	Nerol	0.71	1269	Piperitone	0.64
1276	3-Cyclohexen-l-one-Isopropyl-5-methyl-	0.10	1256	Linalyl acetate	24.4	1274	1S-NEOMENTHYL ACETATE	0.08
1295	Bornylacetate	0.87	1261	trans-Geraniol	1.87	1304	Menthylacetate	1.72
1360	Piperitenone	0.06	1271	Carvone	2.90	1369	Piperitenone Oxide	0.09
1367	cis-CarvylAcetate	0.07	1367	Nerylacetate	1.45	1427	Caryophyllene	0.42
1380	Piperitenone Oxide	0.40	1358	Geranylacetate	2.87	1459	(Z)-.beta.-Farnesene	0.14
1383	alpha.-Copaene	0.19	1400	cis-Jasmone	0.12	1490	Germacrene D	0.64
1410	cis-Jasmone	0.09	1409	alpha.-Gurjunene	0.16	1501	Bicyclogermacrene	0.1
1431	Caryophyllene	3.28	1427	Caryophyllene	1.44	1597	Viridiflorol	0.1
1452	(Z)-.beta.-Farnesene	0.68	1459	(Z)-.beta.-Farnesene	0.31			
1468	Alpha.-Humulene	0.13	1454	alpha.-Humulene	0.14			
1493	Germacrene-D	2.55	1490	GermacreneD	0.67			
1508	Bicyclogermacrene	0.28	1570	Elemol	1.53			
1527	delta.-Cadinene	0.14	1595	GermacreneD-4-ol	0.12			
1593	Germacrene D-4-ol	0.08	1613	2-(4a,8-Dimethyl-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahydro-2-naphtalenyl-2-propanol	0.08			
1596	Spathulenol	0.12	1654	gamma.-Eudesmol	0.16			
1602	Caryophylleneoxide	0.35	1688	beta.-Eudesmol	0.31			
1615	Viridiflorol	0.08						
1661	.tau.-Cadinol	0.23						
2033	Manoyloxide	0.08						

بحث

خواص ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی به نوع و درصد ترکیبات شیمیایی آن‌ها بستگی دارد. تجزیه اسانس‌های مورد بررسی به وسیله دستگاه GC-MS، ترکیبات و درصدهای مختلف اسانس‌های گیاهی به خصوص در بین گونه‌های مختلف خانواده نعنا را نشان داد (جدول ۱ و ۲). ترکیبات موجود در اسانس‌ها، متعلق به گروه‌های مونوترپن‌ها، سسکوئیترپن‌ها و سایر مشتقات اکسیژن‌دار مانند الکل‌ها، الدهیدها، استرها، اترها، کتون‌ها و فنول‌ها بودند. ترکیبات اصلی اسانس پونه شامل پولگون (۴۴/۶۷) و منتون (۳۳/۲۹) می‌باشد. در پژوهش‌های Boukhebti et al., (2011)، Khalilipour and Dejam (2014) و Luís and Domingues (2021) مطابق با پژوهش حاضر، پولگون بیشترین درصد ترکیب اسانس پونه را تشکیل داد. درحالی‌که در پژوهش Mahboubi and Haghi (2008) ترکیب پیپریتون (piperitone) بیشترین درصد تشکیل دهنده اسانس پونه را تشکیل داده است. مقادیر MIC و MBC اسانس پونه برای باکتری‌های مورد بررسی به ترتیب بین ۳-۲ و ۲-۱ میکرگرم بر میلی‌لیتر بود. اثر ضد باکتریایی قوی برای اسانس پونه و ترکیبات پولگون و منتون در پژوهش‌های مختلف بر علیه باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa*، *Klebsiella pneumoniae*، *Schigella sonnei*، *Salmonella typhi*، *Streptococcus pyogenes*، *S. pneumoniae*، *Staphylococcus epidermidis*، *Escherichia coli*، *Bacillus subtilis* و *X. campestris* گزارش گردیده است (Mahboubi & Haghi, 2008; Ozturk & Ercisli, 2007; Bouyahya et al., 2017). با توجه به پژوهش‌های انجام شده، اثر ضد باکتریایی بالای اسانس پونه را می‌توان به حضور درصد بالای ترکیبات پولگون و منتون نسبت داد.

جدول ۳- میانگین میزان هاله‌ی بازدارنده از رشد اسانس‌های گیاهان پونه، نعنا آبی ،نعنا فلفلی، نعنا سبز، نعنا سیب و به‌لیمو روی جدایه‌های *X. citri* subsp. *citri*، *X. gardneri* و *Xanthomatas perforans* بر حسب میلی‌متر

Table 3. The growth halo mean diameter of *Xanthomonas citri* subsp. *citri, X. perforans* and *X. gardneri* (in millimeters) in the inhibition test of *Mentha pulegium, M. aquatica, M. piperita, M. spicata, M. saulavens* and *Lippia citriodora* essential oils.

EO	*X. citri* subsp. *citri*	*X. perforans*	*X. gardneri*
Mentha pulegium	24±2/08 a	20/66±3/48 bc	19/33±0/66 cde
Mentha aquatica	11±1/73 hi	17/33±1/45 def	10±0/57 i
Mentha piperita	8/66±0/33 i	16/66±1/66 def	14/66±0/33 fg
Mentha spicata	21±3/78 ab	18/33±3/33 cde	13/33±0/88 gh
Mentha soulavens	21/33±3/17 ab	19/66±0/33 cd	5/66±0/66 j
Lippia citriodora	16/33±3/48 efg	17/69±1/45 cdef	19±1cde

جدول ٤- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس گیاهان پونه، نعنا اکواتیکا ،نعنا فلفلی، نعنا سبز، نعنا سیب و به‌لیمو علیه سویه‌های *X. gardneri*، *X. perforans* و *X. citri* subsp. *citri*

Table 4. MIC and MBC of essential oils of *Mentha pulegium, M. aquatica, M. piperita, M. spicata, M. saulavens* and *Lippia citriodora* against *X. gardneri, X. perforans and X. citri* subsp. *citri*

Bacterial strains	*X. gardneri*		*X. perforans*		*X. citri* subsp. *citri*	
Eo	MIC $mg.ml^{-1}$	MBC $mg.ml^{-1}$	MIC $mg.ml^{-1}$	MBC $mg.ml^{-1}$	MIC $mg.ml^{-1}$	MBC $mg.ml^{-1}$
Mentha saulavens	4	5	4	5	2	3
Mentha aquatic	5	6	5	6	2	3
Mentha spicata	3	4	5	6	4	5
Mentha pulegium	2	3	2	3	1	2
Mentha piperita	3	4	1	2	4	5
Lippia citriodora	5	6	3	4	1	2

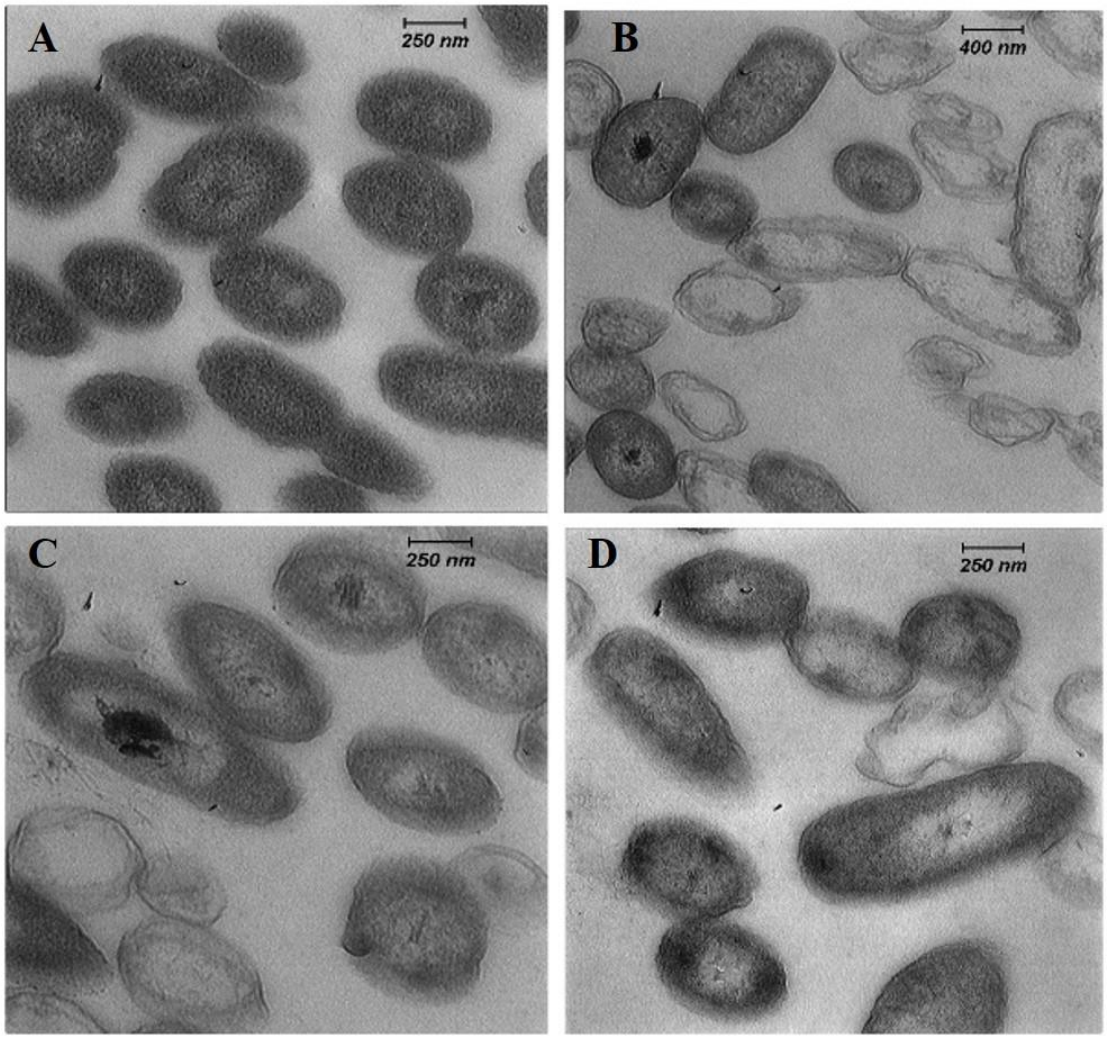
ترکیبات اصلی اسانس نعنا آبی در پژوهش حاضر شامل لینالول، لینالیل استات، سینول و الفا-ترپینول می‌باشد.در حالی که در مطالعه Sutour et al. (2011)، Yahyaabadi et al. (2018) و Jerkovic and Mastelic (2001) بتاکاریوفیلن، ژرماکرین دی و ویریدیفلورال ترکیبات اصلی اسانس نعنا آبی را تشکیل داده است. اثر ضد باکتریایی اسانس نعنا آبی در پژوهش Alizadeh Amoli et al. (2021) علیه باکتری‌های *S. aureus*، *E. coli*، *P. aeruginosa*، *S. typhimurium* و *Bacillus pumilus* گزارش شده است (Alizadeh Amoli et al., 2021). در پژوهش‌های انجام شده توسط محققین مختلف اثر ضدباکتریایی قوی ترکیبات لینالول، لینالیل استات، سینول و الفا_ترپینول علیه باکتری‌های *X. citri* subsp. *citri*، *K. pneumoniae*، *P. aeruginosa*، *E. coli* و *K. pneumonia* گزارش گردیده است (Mirzaei Najafgholi et al., 2017; Li et., 2014).

جدول ۵- غلظت بازدارنده افتراقی (FIC) اسانس گیاهان پونه، نعنا آبی ،نعنا فلفلی، نعنا سبز، نعنا سیب و به‌لیمو علیه سویه‌های *X. gardneri*، *X. perforans* و *X. citri* subsp. *Citri*

Table 5. Differential inhibitory concentration (FIC) of essential oils of *Mentha pulegium, M. aquatica, M. piperita, M. spicata, M. saulavens* and *Lippia citriodora* against *X. gardneri, X. perforans and X. citri* subsp. *citri*

	X. gardneri		*X. perforans*		*X. citri* subsp. *citri*	
Compound	**FIC Index**	**Activity**	**FIC Index**	**Activity**	**FIC Index**	**Activity**
Mentha piperita - Lippia citriodora	0/22	Synergistic	0/45	Synergistic	0/2	Synergistic
Mentha spicata - Mentha pulegium	0/17	Synergistic	0/69	Additive	0/43	Synergistic
Mentha soulavens- Mentha pulegium	3/66	Indifferent	1/5	Indifferent	1/54	Indifferent
Mentha piperita- Mentha aquatica	0/20	Synergistic	0/7	Synergistic	1/9	Indifferent
Mentha saulavens- Mentha piperita	2/58	Indifferent	1/69	Indifferent	1/61	Indifferent
Mentha saulavens- Mentha aquatica	0/92	Additive	2/27	Indifferent	0/92	Additive
Mentha aquatica- Lippia citriodora	0/51	Additive	0/97	Additive	1/09	Indifferent
Mentha aquatica- Mentha pulegium	0/7	Additive	0/16	Synergistic	0/4	Synergistic
Mentha aquatica- Mentha spicata	0/27	Synergistic	0/15	Synergistic	3/3	Indifferent
Mentha soulavens- Lippia citriodora	0/42	Synergistic	1/2	Indifferent	0/8	Additive
Mentha soulavens- Mentha spicata	1/62	Indifferent	2/1	Indifferent	2/4	Indifferent
Mentha pulegium- Mentha piperita	0/25	Synergistic	0/21	Synergistic	1/3	Indifferent
Lippia citriodora- Mentha pulegium	0/11	Synergistic	0/76	Additive	0/5	Synergistic
Lippia citriodora- Mentha spicata	0/12	Synergistic	0/87	Additive	0/55	Additive
Mentha piperita- Mentha spicata	1/83	Indifferent	0/19	Synergistic	2/8	Indifferent

با توجه به تخریب غشای خارجی و سیتوپلاسمی توسط ترکیبات لینالول و الف-ترپینول (Mirzaei Najafgholi et al., 2017) و همچنین نقش لینالیل استات در برهمکنش با لیپیدهای غشایی و تغییر در نفوذپذیری غشای سلولی (Akthar et al., 2014)، می‌توان خواص ضدباکتریایی این اسانس را به حضور ترکیبات لینالول، لینالیل استات، سینول و الفا_ترپینول نسبت داد. براساس نتایج به‌دست آمده ترکیبات اصلی اسانس نعنا سبز شامل کاروون[1]، نئوایزومنتول[2] و پولگون می‌باشد که با مطالعه‌ی Adam et al. (1998) و Mokhayeri et al. (2017) مطابقت دارد. در حالی‌که در مطالعه‌ی Hadjiakhoondi et al. (2000) بیشترین ترکیبات اسانس نعنا سبز را کاروون، لینالول و لیمونن تشکیل داده است.



شکل ۱- عکس میکروسکوپ الکترونی عبوری از اثرات اسانس پونه در غلظت MIC بر روی باکتری *X. gardneri* پس از چهار ساعت، A: نمونه شاهد، B-D: تخریب کامل سلول باکتری، نشت محتویات سلول باکتری، متراکم شدن سیتوپلاسم و تورم ژنوم سلول باکتری.

Figure 1. Transmission electron micrographs of *X. gardneri* exposed to MIC value of *M. pulegium* for 4 h. (A), control with complete cell wall; (B-D) Bacterial cells exposed to *M. pulegium* Eo with apparent the complete destruction of the cell, damage of cell wall, alteration in cytoplasm density, swelling and colored nuclear area

1- Carvon

2- Neoisomenthol

اثر ضد باکتریایی اسانس نعنا سبز در پژوهش Mokhayeri et al., (2017) علیه باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* گزارش شده است. خواص ضدباکتریایی ترکیبات اصلی تشکیل دهنده اسانس نعنا سبز در پژوهش‌های Aggarwal et al., (2002)، Camele et al., (2021) و Helander et al., (1998) علیه باکتری‌ها *Enterococcus faecalis*، *Enterobacter aerogenes*، *P. aeruginosa*، *S. typhimurium*، *S. epidermidis*، *S. aureus*، *E. coli* و *Yersinia enterocolitica* و قارچ‌های *Monilinia fructicola*، *Botrytis cinerea*، *Aspergillus niger* و *Penicillium expansum* گزارش شده است (Aggarwal et al., 2002; Helander et al., 1998; Camele et al., 2021). با توجه به خواص ضدباکتریایی ترکیبات اسانس نعنا سبز در پژوهش‌های مختلف، می‌توان خاصیت ضدباکتریایی این اسانس را به وجود این ترکیبات نسبت داد. همچنین ترکیبات اصلی اسانس نعناسیب شامل پیپریتنون اکساید[1]، نئوایزومنتول و ژرماکرین[2] می‌باشد که با نتایج Sutour et al., (2011) در تضاد می‌باشد (Sutour et al., 2011). ترکیبات اصلی نعنا فلفلی در پژوهش حاضر منتول[3]، منتون[4]، منتوفوران[5] و پولگون شناسایی گردید. این ترکیبات مشابه با مطالعه Kazem Alvandi et al., (2009) است. اما در پژوهش Beuchat and Golden (1998)، تیمول، کارواکرول، منتول و در مواردی پاراسیمین مهمترین اجزا موثر در اسانس نعنا فلفلی بودند. در مطالعه‌ی Kazem Alvandi et al., (2009) اثر ضدباکتریایی اسانس نعنا فلفلی بر علیه باکتری‌های *S. aureus*، *E. coli* و *S. tiphy* گزارش شده است (Kazem Alvandi et al., 2009). همچنین در گیاه به‌لیمو ترکیبات اصلی شامل ایزوژرانیول[6]، نرال[7]، لیمونن[8] واکالیپتول[9] می‌باشد. در مطالعه Babaei and Zhiyani (2013) مطابق با پژوهش حاضر ژرانیول، نرال و لیمونن بیشترین درصد ترکیب اسانس به‌لیمو را تشکیل داد. در حالی که در پژوهش Gleiser and Zygadlo (2007)، ترکیبات آلفا-توجون، لیمونن و لیپیفولنن بیشترین درصد اسانس به‌لیمو را تشکیل داده است. در مطالعه‌ی Etminani and Etminani (2018) اثر ضدباکتریایی اسانس به‌لیمو بر علیه باکتری بیماری‌زای *Pseudomonas syringae* گزارش شده است.

ترکیب تشکیل دهنده اسانس یک گونه از گیاهان نسبت به همان گونه در شرایط منطقه‌ای مختلف ممکن است، متفاوت باشد. این اختلاف می‌تواند ناشی از تفاوت در فصل برداشت، زمان استخراج اسانس، روش‌های استخراج، تغییرات دما، ژنوتیپ‌های مختلف، شرایط آب و هوایی، رطوبت نسبی، ترکیب خاک و حتی بخش‌های مختلف گیاه باشد. اثر سینرژیستی در تعدادی از اسانس‌های مورد بررسی مانند نعنا فلفلی-به‌لیمو، پونه-نعنا سبز، پونه-نعنا آبی، روی باکتری‌های بیمارگر مشاهده گردید (جدول ۷). در صورت استفاده توام اسانس‌های با اثر سینرژیستی و یا افزایشی برای کنترل بیمارگرها، سبب کاهش میزان مصرف اسانس، افزایش خاصیت ضدباکتریایی و کاهش مقاومت باکتری‌ها (به دلیل وجود ترکیبات مختلف و نحوه اثر متفاوت ترکیبات) نسبت به اسانس‌ها می‌گردد (Mirzaei Najafgholi et al., 2017). Pazhouhi et al., (2019) ارتباط سینرژیستی بین اسانس پونه به همراه نیسین علیه باکتری‌های بیمارگر *B. cereus* و *B. subtilis* گزارش نموده‌اند. در مطالعه دیگری نشان داده شد که تاثیر ضدمیکروبی کارواکرول (یکی از اجزا اسانس آویشن) به طور فزاینده‌ای در ترکیب با نیسین

1- Piperitenone oxide
2- Germacrene
3- Menthol
4- Menthone
5- Menthofuran
6- Isogeraniol
7- Neral
8- Limonene
9- Eucalyptol

بر روی باکتری *B. cereus* موثر بوده و با افزایش غلظت این اثر بیشتر نمایان می‌شود (Pol et al., 2002). نتایج بررسی اثر اسانس پونه علیه باکتری *X. gardneri* نشان داد که حضور اسانس سبب تخریب کامل سلول، آسیب دیواره سلولی، تغییر در تراکم سیتوپلاسم و تورم در سلول‌های تیمار شده، می‌شود. به طور کلی مطالعات بر روی عملکرد اسانس‌ها علیه باکتری‌ها و قارچ‌ها، به واکنش آن‌ها با DNA غشای خارجی، غشای پلاسمایی و آسیب دیواره سلولی نسبت داده شده است (Celiktas et al., 2007).

نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد اسانس گیاهان پونه، نعنا سبز، نعنا سیب، نعنا فلفلی، نعنا آبی و به‌لیمو اثر بازدارندگی معناداری بر روی باکتری‌های عامل بیماری شانکرباکتریایی مرکبات و لکه‌برگی‌های باکتریایی دارند. میزان MIC اسانس‌های مورد بررسی علیه باکتری‌های بیمارگر ۵-۱ میکرگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین بررسی اثر ترکیبی اسانس‌های مورد بررسی نشان داد که اکثر اسانس‌ها دارای اثر سینرژیستی بر علیه باکتری‌های بیمارگر بودند.

REFRENCES

Adam, K., Sivropoulol, A., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1998). Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 1739-1745. https://doi.org/10.1021/jf9708296.

Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil component by gas chromatography. Quadropole Mass Spectroscopy*. Allured Publishing Corporation, Illinois, U.S.A.

Aeini, M., Khodakaramian, G., & Mirzaei Najafgholi, H. (2018). Sugar Beet Leaf Culturable Endophytic Bacterial Composition from the Major Sugar Beet Growing Areas in the West of Iran. *Journal of Genetic Resources 4*, 105-113. https://dx.doi.org/10.22080/jgr.2019.15537.1118

Afridi, M., Ali, J., Abbas, S., Rehman, S., Khan, F., Khan, M., & Shahid, M. (2016). Essential oil composition of *Mentha piperita* L. and its antimicrobial effects against common human pathogenic bacterial and fungal strains. *Pharmacology Online 3*, 90-97.

Aggarwal, K., Khanuja, S., Ahmad, A., Santha Kumar, T., Gupta, V. K., & Kumar, S. (2002). Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and Anethum sowa. *Flavour and Fragrance Journal*, *17*, 59-63. http://dx.doi.org/10.1002/ffj.1040.

Akthar, M. S., Degaga, B., & Azam, T. (2014). Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *Journal Issues*, *2350*, 001-007.

Alizadeh Amoli, Z., Mehdizadeh, T., & Tajik, H. (2021). Comparative study of antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha aquatica* L. ethanolic extract and essential oil. *Studies in Medical Sciences*, *31*, 873-863. (In Farsi with English summary)

Babaei, S. A., & Zhiyani, R. (2013). Investigation of plant chemical compounds to lemon (*Lippia citriodora*): The essential oil of the plant increases the survival of PC12 cells treated

with H2O2. *Neuroscience journal of Shefaye khatam*. *2*, 38. (In Farsi with English summary). http://dx.doi.org/10.18869/acadpub.shefa.2.1.31

Beiki, F., & Alizadeh, A. (2005). Antibacterial effects of some herbal essential oil and extract on the causal agent of bacterial leaf streak in wheat and barley. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, *13*, 70-81. (In Farsi with English summary)

Beuchat, L. R., & Golden, D. A. (1998): Antimicrobials Naturally in Foods. *Food technology*, *11*, 134-142.

Boukhebti, H., Chaker, A. N., Belhadj, H., Sahli, F., Ramdhani, M., Laouer, H., & Harzallah, D. (2011). Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Der Pharmacia Lettre*, *3*, 267-275.

Bouyahya, A., Et-Touys, A., Bakri, Y., Talbaui, A., Fellah, H., Abrini, J., & Dakka, N. (2017). Chemical composition of *Mentha pulegium* and Rosmarinus officinalis essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Microbial pathogenesis*, *111*, 41-49. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.015

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology*, *94*, 223-253. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

Camele, I., Gruľová, D., & Elshafie, H. S. (2021). Chemical composition and antimicrobial properties of *Mentha piperita* cv. 'Kristinka'essential oil. *Plants*, *10*, 1567. https://doi.org/10.3390/plants10081567

Celiktas, O. Y., Kocabas, E. H., Bedir, E., Sukan, F. V., Ozek, T., & Baser, K. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, *100*, 553-559.

Etminani, F., & Etminani, A. (2018). Antibacterial activity of hydroalcoholic extracts of *Thymus vulgaris* and *Lippia citriodora* on *Pseudomonas syringae* bacteria in laboratory conditions. *Molecular Research Journal (Iranian Journal of Biology)*, *1*, 12-18. (In Farsi with English summary)

Gleiser, R. M., & Zygadlo, J. A. 2007. Insecticidal properties of essential oils from *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (Verbenaceae) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research 101*, 1349-1354. https://doi.org/10.1007/s00436-007-0647-z

Hadjiakhoondi, A., Aghel, N., Zamanzadeh-Nadgar, N., & Vatandoost, H. (2000). Chemical and biological study of *Mentha spicata* L. essential oil from Iran. *DARU Journal of Pharmaceutical. Sciences*, *8*, 19-21.

Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G., & von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, *46*, 3590-3595.

Hevesi, M., Boja, N., Banatfy, R., Babulka, P., & Toth, M. (2006). In vitro inhibition of growth of *Erwinia amylovora* by plant oils. *Mitteilungen-biologischen bundesanstalt fur land und forstwirtschaft, 408*, 262-264.

Hsouna, A. B., Touj, N., Hammami, I., Dridi, K., Sulayman Aleyd, A., & Hamdi, N. (2019). Chemical composition and effect in vivo essential oil *Mentha piperita* L. In suppressing disease crown disease in tomato plants. *Juornal of Olao science, 68*, 419-426. https://doi.org/10.5650/jos.ess

Jerkovic, I., & Mastelic, J. (2001). Composition of Free and Glycosidically Bound Volatiles of *Mentha aquatica* L. *Croatica Chemica Acta, 74*, 431-439.

Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., & Weisslowicz, H. (1994). Factors that intract with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriol, 76*, 626-631.

Kazem Alvandi, R., Sharifan, A., & Aghazadeh mashgi, M. (2009). Chemical composition and antimicrobial effect of plant essential oil *Mentha piperita*. *Comparative pathobiology, 7*, 355-364. (In Farsi with English summary)

Khalilipour, A., & Dejam, M. (2014). Essential oil composition of Pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) from Southern Iran. *Journal of Herbal Drugs, 5*, 33-37.

Lucas, G. C., Alves, E., Pereira, R. B., Perina, F. J., & Souza, R. M. (2012). Antibacterial activity of essential oils on *Xanthomonas vesicatoria* and control of bacterial spot in tomato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, 47*, 351-359. https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000300006

Luís, A., & Domingues, F. (2021). Screening of the Potential Bioactivities of Pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) Essential Oil. *Antibiotics, 10*, 1266. https://doi.org/10.3390/antibiotics10101266

Mahboubi, M., & Haghi, G. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology, 119*, 325-7. https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.023

Mahmodi, H., Rahnama, K., & Arabkhani, M. A. (2009). Investigation of Antibacterial Effect of Essential Essence and Aqueous Extract of Medicinal Plants on Bacteria and Bacterial Trees. *Journal of Medicinal Plants, 9*, 36. (In Farsi)

Militello, M., Settanni, L., Aleo, A., Mammina, C., Moschetti, G., Giammanco, G., Blàzquez, M. A., and Carrubba, A. 2011. Chemical composition and antibacterial potential of *Artemisia arborescens* L. essential oil. *Current Microbiology 62*: 1274-1281. https://doi.org/10.1007/s00284-010-9855-3.

Mirzaei-najafgholi, H., Tarighi, S., Golmohammadi, M., and Taheri, P. (2017). The effect of Citrus essential oils and their constituents on growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Molecules 22*, 591. https://doi.org/10.3390/molecules22040591

Mokhayeri, K., Kouhsari, H., & Seyedalangi, S. Z. (2017). Determination of chemical compounds and minimum inhibitory concentration and bacteriography of menthological

essential oil on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria. *Microbiology of Food, 4*, 9-19. (In Farsi with English summary)

Oussalah, M., Caillet, E., Saucier, L., & Lakroix, M. (2007). The inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogens: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and Listeria. *Food control*, *18*, 414-420. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.009

Pazhouhi, M., Tajik, H., Akhondzadeh, A., Gandomi, H., Ehsani, A., & Shokohi Sabetjalali, F. (2019). Evaluation of chemical compounds and antimicrobial activity of essential oil of oregano (*Mentha longifolia* L.) and cumin seed (*Cuminum cyminum* L.) alone and combined with nisin. *Urmia Medical Journal*, *2*, 324-331. (In Farsi)

Pol, I. E., Krommer, J., & Smid, E. J. (2002). Bioenergetic consequences of nisin combined with carvacrol towards *Bacillus cereus*. *innovative food science & emerging technologies*, *3*, 55-61. https://doi.org/10.1016/S1466-8564(01)00055-8

Soylu, S., Soylu, E. M., Baysal, O., & Zeller, W. (2005). Antibacterial activities of the essential oils from medicinal plants against the growth of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Biologischen bundesanstalt fur land und forstwirtschaft*, *408*, 82.

S-Ozturk, E., & Ercisli, S. (2007). Antibacterial activity and chemical constitutions of Ziziphora clinopodioides. *Food control*, 18, 535-540. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.01.002

Sutour, S., Tomi, F., & Bradesi, P. (2011). Chemical Composition of the Essential Oil from Corsican *Mentha aquatica* - Combined Analysis by GC(RI), GC-MS and 13C NMR Spectroscopy . *Natural Product Communications*, *6*, 1479-1482.

Yahyaabadi, Y., Mahmodi Ataghori, A., & Nazifi, E. (2018). Phytochemical study and pollination of a number of Mentha L species in northern Iran. *Journal of Herbal Research (Iranian Biology Journal)*, *33*, 1-23. (In Farsi with English summary). https://dorl.net/dor/20.1001.1.23832592.1399.33.4.8.4

© 2023 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)

45(4), Winter, 2023

10.22055/ppr.2022.17931

Antibacterial properties of lemon essential oil and five types of mint on pathogenic bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *X. gardneri* and *X. perforans*

S. Z. Mousavifar[1], H. Mirzaei Najafgholi [2*], M. Darvishnia [3], H. Mumivand[4]

1. M. Sc. student, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran
2. ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran (mirzaei.h@lu.ac.ir)
3. Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran
4. Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Received: 17 October 2022 Accepted: 16 December 2022

Abstract

Background and Objectives

Citrus canker disease caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and bacterial leaf spots caused by *X. gardneri* and *X. perforans* are critical bacterial diseases. The control of these pathogens is a serious challenge due to the problems caused by the restrictions on the use of poisons and antibiotics, and the issue of toxic resistance. Therefore, plant essential oils can be a suitable alternative to control plant pathogens. In the present study, the effect of *Lippia citriodora*, *Mentha piperita*, *M. aquatica*, *M. saulavens*, *M. spicata* and *M. pulegium* essential oils against *X. citri* subsp. *citri*, *X. gardneri* and *X. perforans* have been evaluated.

Materials and Methods

After plant essential oils extraction by clevenger, their constituent compounds were identified by GC-MS. Then, the antibacterial effect of essential oils was surveyed using the disk diffusion method. Also, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC), the combined effect of plant essential oils, and the effect of *M. pulegium* essential oil against *X. gardneri* were investigated using Transmission electron microscopy.

Results

The results of GC-MS essential oils analysis showed that a total of 28, 28, 30, 36, 39, and 42 compounds were identified in *M. saulavens*, *M. piperita*, *M. pulegium*, *M. aquatica*, *M. spicata*, and *L. citriodora* essential oil compounds, respectively. The highest and lowest amount of inhibitory zone was related to oregano species on the bacteria *X. citri* subsp. *citri* with an amount of 24 ± 2.08 mm and apple mint essential oil on *X. gardneri* with an amount of 5.66 ± 0.66 mm, respectively. MIC and MBC for the examined essential oils against the

pathogenic bacteria were between 1-5 and 2-6 µg/ml, respectively. Also, the synergistic effect was observed between different essential oils such as *M. piperita- L. citriodora*, *M. pulegium- M. spicata*, *M. pulegium- M. aquatic*, *M. aquatic- M. piperita*, *M. aquatic- M. pulegium*, *M. pulegium- M. saulavens* on pathogenic bacteria. Transmission electron microscope photos related to the effect of *M. pulegium* essential oil against *X. gardneri* bacteria showed complete cell destruction, cell wall damage, swollen nuclear, area and changes in the cytoplasm density of bacterial cells.

Discussion

Essential oils are regarded safe substances when considering the control limitations of bacterial infections, bacterial resistance to toxins, and environmental issues associated with the use of toxins. Also, due to the different compositions of essential oils and the observation of synergistic properties between them in this study, the risk of developing resistance to them decreases, and their antibacterial effect increases.

Keywords: ***MIC, MBC, GC-MS, essential oil***

Associate editor: R. Rezaei (Ph.D.)

Citation: Mousavifar, S. Z., Mirzaei Najafgholi, H., Darvishnia, M. & Mumivand, H. (2023). Antibacterial properties of lemon essential oil and five types of mint on pathogenic bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *X. gardneri* and *X. perforans*. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, *45*(4), 37-51. https://doi.org/10.22055/ppr.2022.17931.