

## مطالعه اثرات ضدمیکروبی اسانس دارچین و زیره سبز بر ساختار سلولی باکتری باسیلوس سرئوس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره

مجید قلیزاده<sup>۱</sup>, زهره مشاک<sup>۲\*</sup>, ایرج پوستی<sup>۳</sup>, بیژن مرادی<sup>۴</sup>, بهروز مرادی<sup>۵</sup>

- ۱- دانش آموخته دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج
- ۲- استادیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج
- ۳- مدیر گروه بخش علوم تشریحی دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
- ۴- کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان
- ۵- کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج
- \*آدرس مکاتبه: کرج، بلوار موزن، دانشگاه آزاد اسلامی کرج، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت مواد غذایی  
تلفن: ۰۲۶۱ ۴۱۸۲۵۴۳  
پست الکترونیک: zohreh\_mashak@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۸۹/۷/۱۴

تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۹

### چکیده

مقدمه: باسیلوس سرئوس باکتری بیماری‌زای غذازad مولد اسپور است که در اغلب فرآورده‌های غذایی مانند گوشت، سبزیجات، سوپ، برنج، شیر و سایر فرآورده‌های لبنی تحت شرایط مناسب می‌تواند تکثیر و تولید توکسین نماید. بین ۱ الی ۲۰ درصد تمامی موارد شیوع مسمومیت‌های غذایی در جهان به دلیل باسیلوس سرئوس بوده است. امروزه توجه و علاقه فرازینده‌ای به استفاده از اسانس‌های گیاهی به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی برای غذا وجود دارد. اسانس دارچین و زیره سبز از این دسته افزودنی‌های ضدمیکروبی طبیعی است و تاکنون مکانیسم مهار رشد چندین بacterی بیماری‌زا در سطح سلولی توسط اسانس‌های مزبور با استفاده از میکروسکوپ الکترونی در مقالات مختلف گزارش شده است.

هدف: هدف از این تحقیق ارزیابی اثر ضدمیکروبی اسانس دارچین و زیره سبز در سطح ساختار سلولی باکتری باسیلوس سرئوس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره بود.

روش بررسی: اسانس دارچین و زیره سبز به وسیله روش نقطیزی با بخار آب استخراج شد و به کمک دستگاه رنگنگار گازی متصل به طیف‌نگار جرمی مورد تحلیل قرار گرفت. سپس تاثیر غلظت ۵۰ میکرومیتر بر لیتر هر یک از دو اسانس بر باکتری باسیلوس سرئوس در مقایسه با گروه کنترل جهت کار با میکروسکوپ الکترونی گذاره آماده شد. پس از طی مراحل مختلف مقاطع حاصله توسط میکروسکوپ الکترونی عکس گرفته شد و تفسیر شد.

نتایج: در گروه کنترل (فأقد اسانس) باکتری‌های باسیلوس سرئوس دارای دیواره عرضی طبیعی در حین تقسیم سلولی طبیعی و متقارن بوده، استحکام غشای سلولی همچنین غشای فسفولیپیدی دولایه، پیتیدوگلیکان و مزوژوم طبیعی بود که همگی دلالت بر سالم بودن باکتری می‌کنند. در حالی که در گروه‌های تیمار علاوه بر تقسیم سلولی غیرطبیعی، پارگی غشای سلولی، خالی شدن سلول باکتری از محتویات سیتوپلاسمی و بدشکلی سلول‌ها، در تیمار اسانس دارچین از بین رفتن غشای فسفولیپیدی دو لایه و لایه پیتیدوگلیکان و لذا عدم یکپارچگی غشای سلولی و در تیمار اسانس زیره سبز انعقاد اجزای سیتوپلاسمی به صورت مواد متراکم داخل سلولی در نزدیکی پوشش غشایی از اختصاصات تاثیر باکتریوسیدال هر یک از دو اسانس مزبور بود.

نتیجه گیری: یافته‌های این پژوهش نشانگر وجود مکانیسم‌های متفاوت تأثیر دو اسانس دارچین و زیره سبز بر مهار رشد باکتری باسیلوس سرئوس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره بود.

گل واژگان: اسانس دارچین، اسانس زیره سبز، باکتری باسیلوس سرئوس، میکروسکوپ الکترونی گذاره



## مقدمه

در این مطالعه نیز به منظور بررسی تغییرات ساختاری باکتری و توجیه مکانیسم عمل ضدبакتریایی، غلظت  $450\text{ میکرولیتر بر لیتر}$  هر یک از دو انسس دارچین و زیره سبز به طور جداگانه بر روی باکتری باسیلوس سرئوس ATCC11778 از میکروسوکوب الکترونی گذاره (TEM) استفاده شده است.

در سالیان اخیر به نحوه عمل ضدبакتریایی ترکیبات انسس‌های گیاهی بر روی مورفولوژی سلولی باکتری‌های غذازد با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره یا نگاره توجه خاصی می‌شود. به طوری که در مطالعات متعدد از جمله موسوی و همکاران (۲۰۰۸) و بوهدید (Bouhdid S) و همکاران (۲۰۱۰) تاثیر انسس‌های مختلف بر روی ساختار سلولی باکتری‌ها بررسی شده است [۳، ۸، ۹].

## مواد و روش‌ها

**تهیه انسس:** برای تهیه انسس‌های مورد نظر گیاه زیره سبز در فصل تابستان از شهر تبریز و گیاه دارچین به صورت پوست‌های خشک شده از شهر تریوندروم (Trivandrum) واقع در جنوب غربی هندوستان تهیه شد و مورد تایید گیاه‌شناسان پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی قرار گرفت. انسس گیاه به روش تقطیر با بخار داغ (Steam distillation) با استفاده از دستگاه کلونجر نوع آپاراتوس (Clevenger-type apparatus) تهیه شد.

**شناصایی اجزای انسس‌ها:** برای بررسی ترکیبات سازنده انسس‌ها، آنالیز به وسیله دستگاه گاز کرومتوگراف متصل به طیف نگار جرمی Mass Spectrophotometer (GC/MS) انجام شد. برای این منظور از دستگاه ترموموکوئست فینیگان (Thermoquest Finnigan) ساخت کشور امریکا، با ستون مویینه به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی  $0.25\text{ میکرومتر}$ ، با برنامه دمایی  $265 - 50^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد با افزایش تدریجی  $2/5^\circ\text{C}/\text{min}$  در دقتیه و نگهداری ستون در  $265^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد به مدت  $30\text{ دقیقه}$  مورد استفاده قرار گرفت. دمای اتفاق تزریق  $250^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد و گاز

افزایش جمعیت شهرنشین، کاربرد تکنولوژی‌های نوین در عرصه تولید مواد غذایی، مهاجرت‌ها و جابه‌جایی بین‌المللی جمعیت به همراه تجارت بین‌المللی غذا خطر بروز بیماری‌های متنقله از راه مواد غذایی را بیش از پیش مطرح ساخته است، گیاه دارچین بومی چین، هند، سریلانکا و مالزی بوده که به عنوان تسکین دهنده درد، کنترل کننده قند خون، کاهش دهنده چربی خون و ... می‌باشد. زیره سبز نیز معمولاً در ایران، ترکیه، هند و چین می‌روید و در ایران محل اصلی رویش آن در اطراف تبریز، کرمان، خراسان، تهران، سمنان و دامغان و... می‌باشد. میوه این گیاه که اصطلاحاً دانه زیره سبز نامیده می‌شود، حاوی انسس زیادی بوده و به عنوان یک داروی محرك و ضدفخ، کاهش دهنده چربی و کنترل کننده دیابت عمدتاً به کار برده می‌شود. از هر دو گیاه به عنوان ادویه‌جات، طعم و مزه دهنده غذا استفاده می‌شود [۴، ۲].

باسیلوس سرئوس باکتری اسپوردار بیماری‌زای غذازدی می‌باشد که اغلب در فرآورده‌های غذایی نظری گوشت، سبزیجات، برنج، سوپ، شیر و فرآورده‌های لبنی، تحت شرایط مناسب می‌تواند رشد و تولید توکسین نماید. علایم بالینی مسمومیت حاصله از توکسین‌های این باکتری به دو فرم استفراغی و اسهالی ایجاد می‌شود. ۱ الی  $20\text{ درصد}$  موارد شیوع مسمومیت‌های غذایی در جهان به دلیل باسیلوس سرئوس می‌باشد. بر طبق گزارشات علمی مختلف تعداد  $10^5 - 10^8$  از این باکتری قادر به ایجاد بیماری در انسان می‌باشد [۵].

تاكون مطالعات بسیاری بر روی اثرات ضدمیکروبی انسس‌های مختلف در محیط کشت آزمایشگاهی و مدل غذایی از جمله زیره سبز و دارچین صورت پذیرفته است که همگی بر خاصیت ضدمیکروبی اجزای مختلف آنها تأکید نموده‌اند [۶، ۷].

در مطالعات جداگانه به عمل آمده مهار رشد باکتری باسیلوس سرئوس در سوپ تجاری توسط انسس دارچین و انسس زیره سبز در دمای  $10 - 25^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد در طی  $21$  روز با غلظت  $450\text{ میکرولیتر بر لیتر}$  در مقایسه با غلظت‌های صفر،  $50$ ،  $100$  و  $300\text{ میکرولیتر بر لیتر}$  مشاهده شد [۶، ۷].



با انتقال باکتری از لوله میکروسانتریفیوژ اپندرف به محیط آبگوشت BHI و گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت صورت گرفت. مقادیر مساوی از کشت دوم به داخل ۶ لوله آزمایش استریل درپوش دار برده شد. به دو لوله اول (تیمار دارچین) مقدار ۴۵۰ میکرولیتر بر لیتر اسانس دارچین و ۵ درصد (Dimethyl sulfoxide) DMSO (گروه ۳، ۹). به لوله سوم و چهارم (تیمار زیره سبز) به مقدار ۴۵۰ میکرولیتر بر لیتر اسانس زیره سبز و ۵ درصد DMSO و به لوله‌های بعدی (گروه کنترل) تنها ۵ درصد DMSO اضافه شد. بعد از گرمخانه‌گذاری لوله‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت، مراحل آماده‌سازی نمونه‌ها جهت کار با میکروسکپ الکترونی انجام گرفت.

**مراحل کار با میکروسکپ الکترونی گذاره (TEM):** بعد از مرحله گرمخانه‌گذاری لوله‌ها، سانتریفیوژ آنها با دور ۱۵۰۰ گرم به مدت ۴ دقیقه انجام گرفت و مایع رویی دور ریخته شد، سپس میزان ۰/۵ میلی لیتر از هر یک از لوله‌ها را به یک لوله میکروسانتریفیوژ اپندرف وارد نموده و با افزودن ۱ میلی لیتر محلول گلوتارآلدئید (Gloteraldehyd) ۲/۵ درصد به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ثبوت اولیه نمونه‌ها انجام شد. جهت خارج نمودن محلول گلوتارآلدئید، در نمونه‌ها سه بار عمل شستشو توسط بافر فسفات ۰/۱ مولار صورت گرفت. ثبوت ثانویه نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در محلول تترواکسید اسیمیوم <sup>۱</sup> درصد صورت گرفت. در این مرحله مجدداً نمونه‌ها مانند مرحله قبل شستشو شدند. جهت آب‌گیری، از غلظت‌های رو به افزایش استون در طی ۸ مرحله استفاده شد. سپس نمونه‌های آب‌گیری شده به تدریج و در سه مرحله توسط مونومرهای پلاستیکی مایع (رزین‌های اپوکسی) جایگزین شدند. نمونه‌ها جداگانه درون قالب مخصوص قرار داده شده و تا نیمه از رزین مخصوص قالب‌گیری پر شدند. بعد از آن برای پلیمریزاسیون رزین، قالب‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. عمل تهیه برش‌های نیمه نازک توسط دستگاه اولترا میکروتوم مدل لیکا اولتراکات (Leica Ultracut UCT) انجام گرفت.

سپس برش‌های نیمه نازکی با رنگ متیلن برای مطالعه با

حامل هلیم بود که با سرعت ۱/۵ میلی‌متر بر دقیقه از لوله عبور می‌کرد. همچنین ظرفیت الکتریکی شناساگر IE ۷۰ الکترون ولت و دمای منع یونیزاسیون آن ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. بدین‌منظور ابتدا ۱ میکرولیتر از اسانس با سرنگ مخصوص، به اتفاق تزریق دستگاه منتقل شد. اسانس تزریق شده تحت تأثیر دمای تزریق کننده تبخیر و وارد ستون شد. مواد مختلف موجود در اسانس بر اساس قطبیت، وزن مولکولی، نقطه جوش و طبق برنامه دمایی داده شده به ستون و با فشاری که گاز حامل دارد در طول ستون جلو رفت، در زمان‌های مختلف از ستون خارج و منجر به اختلاف ولتاژی شد که به صورت پیک در صفحه مانیتور نمایان شد. در مجموع، پیک‌های کنار هم یک کروماتوگرام تشکیل داد که محور عمودی آن نشانگر اختلاف ولتاژ بر اساس میلیولت و آلکان اسانس به دستگاه تزریق شد و کروماتوگرام استاندارد به دست آمد. سپس اندیس کواتس (Kovats index) برای هر یک از مواد جدا شده بر اساس زمان استخراج محاسبه شد. به کمک اطلاعات کتابخانه‌ای وایلی (Wiley) و با مراجعه با رفرنس‌های موجود در ارتباط با اجزای تشکیل‌دهنده اسانس‌ها و تطابق تصاویر طیف‌سنجی نتایج حاصل تفسیر و اجزای تشکیل‌دهنده اسانس مشخص شد.

**ارگانیسم مورد مطالعه:** باکتری مورد مطالعه با سیلوس سرئوس ATCC11778 بود که از گنجینه میکروبی گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. باکتری لیوفیلیزه دو مرتبه به طور متواالی در محیط آبگوشت (Merk) BHI (Brain Heart Infusion Broth) (آلمان) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت کشت داده شد. سپس کشت دوم به میزان پنج به یک با گلیسیرین (Glycerin) استریل مخلوط و در قسمت‌های مساوی در لوله‌های میکروسانتریفیوژ اپندرف (Ependorph micro-centerphuge) استریل در دمای ۲۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در طی تحقیق از لوله‌های فوق استفاده شد.

**تهیه محیط آبگوشت با رشد اپتیم باکتری، افزودن اسانس و گرمخانه‌گذاری:** دو بار کشت باکتری مورد آزمایش،



سبز: درصد اجزای تشکیل دهنده هر دو اسانس با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی - طیف نگار جرمی به دست آمد. بازدهی پوست خشک شده درخت دارچین، در تهیه اسانس برابر با  $4/6$  درصد (وزنی / حجمی) بود. در این روش  $8$  نوع ترکیب مختلف شناسایی شدند که  $91/9$  درصد از اسانس فوق را تشکیل می دهند. عملده ترین ترکیب موجود، سینامالدهاید (Cinnamon Aldehyde) به میزان  $79/10$  درصد و سایر (Cinnamyl Acetate) ترکیبات مهم شامل سینامیل استات (Eugenol) و کاریوپیلن (Caryophyllene) بود (جدول و نمودار شماره  $1$ ).

میکروسکپ نوری و تشخیص جایگاه مورد نظر آماده شد و توسط اولترامیکروتوم بر شاهی به ضخامت  $50$  نانومتر به جایگاه مورد نظر زده شد و بر روی گردیدهای  $200$  مش منتقل شد. برای رنگ آمیزی بر شاهی فوق نازک از استات یورانیل (Acetate Yoranil) و سیترات سرب استفاده شد.

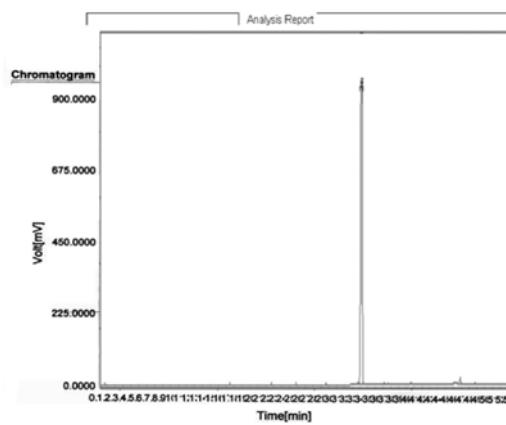
پس از مشاهده گردیدها با میکروسکپ الکترونی گذاره مدل کارل زیس (Carl Zeiss) EM900 ساخت کشور آلمان، با استفاده از دوربین نواحی مورد نظر عکس برداری شد.

## نتایج

### الف- تجزیه و تحلیل اجزای اسانس دارچین و زیره

جدول شماره  $1$ - نتایج آنالیز اسانس دارچین مورد بررسی با استفاده از GC/MS

ردیف	نام ترکیب	درصد
۱	آلدهاید سینامون	$79/10$
۲	استات سینامیل	$5/23$
۳	اوژنول	$4/27$
۴	کاریوپیلن	$3/26$
۵	لینالول	$2/64$
۶	تریپیثول آلفا	$0/70$
۷	کومارین	$0/69$
۸	و $1$ - سینثول	$0/60$
مجموع		$96/90$



نمودار شماره  $1$ - رنگنگار گازی هر یک از اجزای تجزیه شده اسانس دارچین (mV) در طی زمان تحلیل به کمک GC/MS

طبيعي بودن دیواره عرضي باكتري در حين تقسيم دال بر سالم بودن باكتريها مى نماید. در تصوير شماره ۱ - ج طبيعى بودن غشای فسفوليپيدی دولایه، لايه پيتيدوگلیكان و مزوZoom موجود در طی مراحل اولیه ايجاد دیواره عرضي باكتري آورده شده است.

باكتريایی بدون محتويات سلولی، f: تقسيم سلولی نامتقارن، g: محل بیرون ریختن محتويات سیتوپلاسمی

در تصوير شماره ۲ - الف a و b باكتريها دفرمه شده، تقسيم سلولی غيرطبيعي بوده و مراحل اولیه اسپورسازی غيرطبيعي، دیواره سلولی باكتريها پاره و نشت محتويات سیتوپلاسمی مشهود می باشد.

در تصوير شماره ۲ - ب پیوستگی و یکنواختی دیواره سلولی در بعضی از نقاط از بين رفته، سوراخ (Hole) در دیواره سلولی ايجاد شده، محتويات سلولی در نتيجه پارگی دیواره سلول از آن خارج شده، نتيجتاً سلول های خالي از محتويات سیتوپلاسمی به چشم می خورد. در تصوير شماره ۲ - ج علاوه بر دفرمه شدن سلول ها و بیرون ریختن محتويات سیتوپلاسمی، تقسيم سلولی به صورت نامتقارن و حتى تكه های جدا شده از غشای سیتوپلاسمی در سطح مقطع مشاهده می شود.

بازدهی دانه های نمونه گیاه زیره سبز نیز، در تهييه اسانس برابر با ۳/۵ درصد (وزني/حجمي) بود. بر اساس نتایج ۱۳ نوع تركيب مختلف شناسایي شدند که ۹۷/۹۳ درصد از اسانس فوق را تشکيل مى دهند. عمده ترین تركيب موجود، کومين آلدھید (Cuminaldehyde) به ميزان ۲۸/۹۶ درصد و سائر (Beta-terpinyl) ترکبات مهم شامل بتا ترپينيل بوتانوات (Beta-pinene) ۱۴/۹۳ (butanoate) ۲۲/۱۷، بتاپین (Beta-pinene) ۹/۴۰ درصد) درصد) و پاراسيمين (Para-cymene) (Para-cymene) بود (جدول و نمودار شماره ۲).

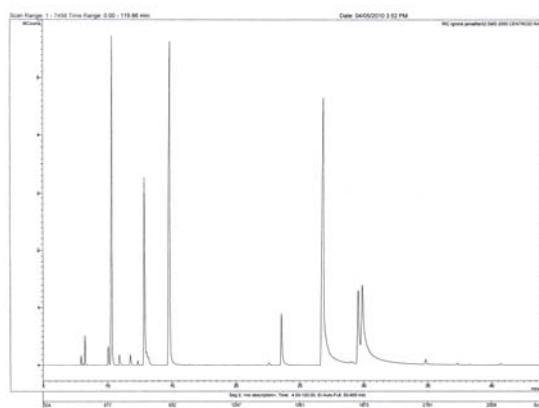
با استفاده از ميكروسكوب الکترونی گذاره (a: مزوZoom، b: غشای دو لایه فسفوليپيدی، c: لايه پيتيدوگلیكان)

ب- بررسی تاثير اسانس دارچين و زيره سبز بر ساختار سلولی باكتري باسيلوس سرئوس در مقايسه با گروه كترل با استفاده از ميكروسكوب الکترونی گذاره (TEM): در تصوير شماره ۱ - الف (گروه كترل) باكتريها اكثراً در مرحله تقسيم سلولی بوده که اين تقسيم طبيعى و متقان مى باشد. وضعیت غشا سلولی، استحکام و يکپارچگی غشا، محتوى سیتوپلاسمی و شکل سلولی همگی نيز طبيعى مى باشند. در تصوير شماره ۱ - ب مورفولوژی سلول ها طبيعى بوده و استحکام و يکپارچگی غشا سلولی، محتويات سیتوپلاسمی،

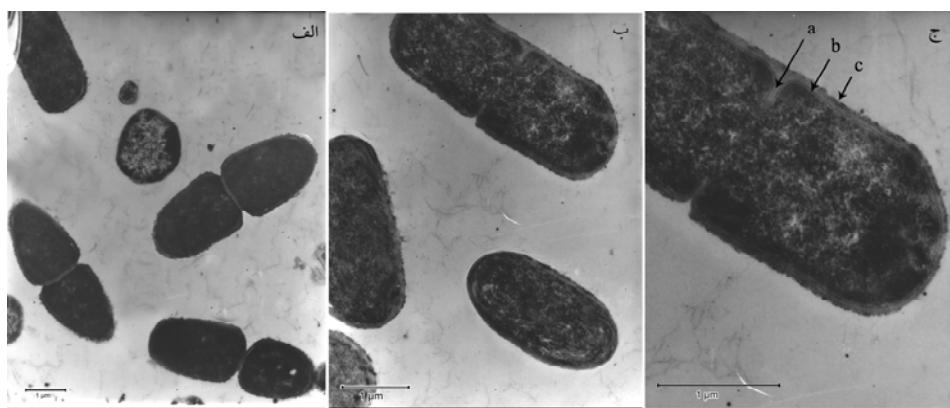
جدول شماره ۲- نتایج آنالیز اسانس زیره سبز مورد بررسی با استفاده از GC/MS

ردیف	نام ترکیب	درصد
۱	آلفا توجن	۰/۴۲
۲	آلفا پین	۰/۹۴
۳	ساپین	۰/۹۶
۴	بتا پین	۱۴/۹۳
۵	ميرسن	۰/۵۷
۶	آلفا فلاوندرن	۰/۵۶
۷	پارا سیمن	۹/۴۰
۸	بتا فلاوندرن	۰/۶۱
۹	بتا ترپینيل بوتانوات	۲۲/۱۷
۱۰	گاما ترپین	۳/۶۰
۱۱	کومین آلدھید	۲۸/۹۶
۱۲	او ۳ سیکلو هگزادین	۸/۵۱
۱۳	او ۲ اتان دیول	۷/۳۰
مجموع		۹۷/۹۳

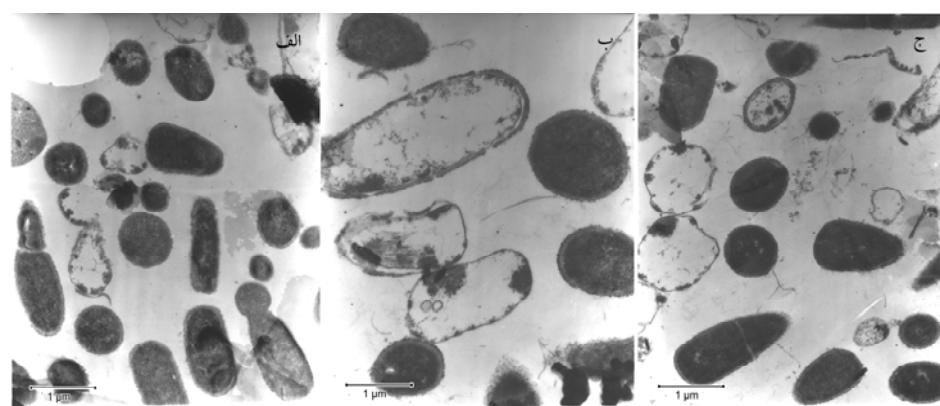




نمودار شماره ۲- رنگنگار گازی هر یک از اجزای تجزیه شده اسانس زیره سبز به کمک GC/MS



تصویر شماره ۱- بررسی ساختار سلولی باکتری‌های باسیلوس سرئوس در محیط BHI حاوی DMSO و فاقد اسانس (گروه کنترل) با استفاده از میکروسکپ الکترونی گذاره (a: مزوژوم، b: غشای دو لایه فسفولیپیدی، c: لایه پیتیوگلیکان)



تصویر شماره ۲- بررسی ساختار سلولی باکتری‌های باسیلوس سرئوس در محیط BHI حاوی DMSO و اسانس دارچین (تیمار دارچین) با استفاده از میکروسکپ الکترونی گذاره (a: مراحل اولیه اسپوراسازی غیر طبیعی، b: پارگی دیواره سلولی و خالی شدن محتويات سلولی، c: از بین رفت پیوستگی و یکنواختی دیواره سلولی، d: ایجاد سوراخ در دیواره سلولی، e: سلول باکتریابی بدون محتويات سلولی، f: تقسیم سلولی نامتقارن، g: محل بیرون ریختن محتويات سیتوپلاسمی)



## بحث

الف) تجزیه و تحلیل اسانس دارچین و زیره سبز و تاثیر ضدباکتریایی آنها: حدود ۳۰ درصد مردم در کشورهای صنعتی حداقل یک بار در سال به بیماری‌های منتقل شده از مواد غذایی مبتلا می‌شوند. بنابراین برای کاهش یا حذف عوامل میکروبی بیماری‌زا و مولد فساد مواد غذایی به روش‌های جدید موردنیاز است. یکی از این روش‌ها استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مشتق از منابع گیاهی، حیوانی و میکروبی است؛ که علاوه بر بالا بردن زمان ماندگاری غذا، می‌توان از اثرات مضر نگهدارنده‌های شیمیایی غذا نیز مصون ماند [۲۴]. یکی از ترکیبات طبیعی، اسانس‌های گیاهی هستند که مطالعات فراوانی توسط محققین روی اثرات ضدمیکروبی و نگهدارنده‌گی آنها انجام گرفته است [۱۰، ۲].

اسانس‌های گیاهی مورد آزمایش در این بررسی به ترتیب اسانس دارچین (سیناموم زیلانیکوم *Cinnamomum zeylanicum*) و اسانس زیره سبز (کومینوم سیمونوم *Cuminum cyminum*) می‌باشد. امروزه استفاده از این مواد جایگزین طبیعی جهت بالا بردن طول دوره نگهداری مواد غذایی توصیه می‌شود. دارچین یک ماده طعم‌دهنده بوده که به میزان زیادی در انواع غذاهای ایرانی استفاده می‌شود. در جدول تجزیه و تحلیل ترکیبات اسانس دارچین ۷۹/۱۰ درصد مربوط به سینامون آلدہاید می‌باشد که میزان و خصوصیت ضدمیکروبی آن با تحقیقات پیشین هم خوانی دارد [۱۵-۱۱]. در مطالعه چانگ (۲۰۰۱) نیز بیان شد که از میان اجزای اسانس دارچین، سینامالدہاید قوی‌ترین فعالیت ضدباکتریایی را دارد که عمدتاً به علت وجود حلقه بنزیلی و یک پیوند دوگانه متصل به آن می‌باشد. به همین دلیل بین مشتقان مختلف سینامون آلدہاید، اثر سینامالدہاید< اسید سینامیک> الكل سینامیل< استات سینامیل می‌باشد. به نظر می‌رسد که گروه آلدہایدی دارای بیشترین خاصیت ضدباکتریایی باشد. بر اساس ارزیابی خاصیت ضدباکتریایی در این اجزا نظیر سینامالدہاید، ۳-فنیل پروپیونالدہاید، بنزالدہاید و ۴-هیدروکسی بنزالدہاید هر چه تعداد پیوندهای دوگانه، گروه‌های هیدروکسیلی و طول زنجیره هیدروکربنی در خارج

از حلقه بنزیلی بیشتر باشد، فعالیت ضدباکتریایی اسانس بیشتر می‌شود [۱۱].

والرو و همکاران (۲۰۰۶) تاثیر سینزیزیک اسانس‌های کارواکرول، تیمول و سینمالدہاید و همچنین دمای پایین را بر روی مهار رشد باکتری باسیلوس سرئوس در محیط آبگوشت برسی کردند و هرناندز (Hernandez Herrero LA) و همکاران (۲۰۰۸) نیز فعالیت اسپورکشی اسانس روغنی دارچین را بر علیه اسپور باکتری باسیلوس سرئوس در شرایط مشابهی مورد بررسی قرار دادند [۱۶، ۱۷].

براساس مقاله مشاک و همکاران (۲۰۱۰)، کاربرد اسانس دارچین می‌تواند در غلظت‌های بالاتر از ۳۰۰ میکرولیتر بر لیتر به عنوان یک نگهدارنده مناسب علیه باکتری باسیلوس سرئوس در مدل غذایی سوب تجاری مورد استفاده قرار گیرد [۷].

زیره سبز نیز یک گیاه علفی یکساله با ساقه نازک منشعب از خانواده چتریان (*Umbelliferae*) می‌باشد و کشور ایران بزرگ‌ترین تولیدکننده زیره به میزان ۱۲۰۰۰ تن در سال می‌باشد [۱۸]. محل رویش آن در ایران در بسیاری از نقاط نظیر خراسان، صالح آباد تهران، تبریز و ... می‌باشد. علاوه بر طعم و آروما در طب به عنوان محرك و قابض و کاهش دهنده چربی خون و کنترل کننده دیابت به کار برده می‌شود. همچنین به خواص ضداسیدانی و ضدالتهابی و ضدسرطانی و ضدجهش‌زا بودن آن نیز در مطالعات پیشین اشاره شده است. بیشترین ترکیبات اسانس غیر از کومین آلدہید ۲۶/۹۶ (درصد)، ترپینول بوتانات ۲۲/۱۷ (درصد)، بتا پینن ۱۴/۹۳ (درصد) و پاراسایمن (۹/۴۰ درصد) می‌باشد. مشابه این نتایج در مطالعات دیگر، نظیر مطالعه هایلاؤ و همکاران (۲۰۱۰) که ترکیبات اسانس روغنی زیره سبز به روش GC/MS مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان اجزای موجود در آن نظیر کومین آلدہید ۳۹/۴۸ درصد، تیمول بتاپین ۱۱/۱۳ درصد و پاراسایمن ۱۱/۸۲ درصد و کارون ۱۰ ال ۷/۹۳ درصد بود، گزارش شده است [۹، ۱۹].

در مقاله لاکوبليس و همکاران (۲۰۰۵) فعالیت ضدباکتریایی اسانس روغنی زیره سبز به کومین آلدہید (۲۵/۲۰ درصد)، بتا پینن (۱۰/۴۰ درصد)، آلفا پینن (۰/۶۰ درصد) و ساپینن (۰/۷۰ درصد) نسبت داده شد [۲۰].



آویشن بر روی تغییرات اسیدهای چرب و فسفولیپید موجود در غشاء سلولی باسیلوس سرئوس و اشريشيا کولی گزارش شده است. در مطالعه فوق از پایدارکننده یا تثبیتکننده هایی (Stabilizer) DMSO نظری (DMSO Stabilizer) اتانول، توین ۲۰ و توین ۸۰ به منظور نشان دادن بهتر خاصیت ضد میکروبی انسان های روغنی استفاده شده بود. در مطالعه حاضر نیز از DMSO نظری تحقیقات پیشین استفاده شده است. به نظر می رسد که پایدارکننده های فوق سبب کندی جداسازی انسان های روغنی از فاز آبی شده و لذا در حمایت از عمل ضد باکتریایی انسان روغنی نقش دارند [۲۲].

در مطالعه دی پاسکا (Di Pasqua) و همکاران (۲۰۰۶) نیز با افزودن تیمول، کارواکرول، لیموزین و سینامالدید (دارچین) و اوژنول در محیط کشت باکتری های *E. coli*, O157:H7, استافیلکوکوس ارئوس و سالمونلا انتریکا تغییر در ترکیبات زنجیره ای اسیدهای چرب موجود در غشا مشاهده شد [۲۳].

به طور کلی فعالیت مهارکننده انسان دارچین بر روی باکتری های نامبرده به صورت صدمه به غشاهای سلولی و نشت کاتیون پتاسیم از غشاء باکتری های تیمار شده گزارش شده و چون یون پتاسیم مهم ترین کاتیون داخل سلولی همه ارگانیسم های زنده محسوب می شود و برای انجام بسیاری از وظایف سلول های باکتریایی مهم می باشد، لذا اتلاف یون پتاسیم در سراسر غشای سلولی را مسبب صدمات بعدی به غشا و از بین بردن سد قابلیت نفوذ سلولی ذکر نموده اند. در مطالعه کنونی نیز وجود سوراخ هایی در دیواره غشای باکتری متأثر از انسان روغنی دارچین به چشم می خورد. به نظر می رسد تخریب ایفلکس (Efflux) پمپ یون پتاسیم و نقص فعالیت آنزیمی سبب مهار تنفسی در باکتری های مذبور شده باشد. همچنین انسان های مورد استفاده در این مطالعه به طور مؤثری بر روی عدم یکپارچگی غشاء باکتری ها و تخلیه محتويات سلولی نقش داشتند. لمبرت (Lambert RJW) و همکاران (۲۰۰۱) عقیده دارند که انسان های روغنی با غشاء سیتوپلاسمی باکتری ها واکنش نشان داده و با اختلال و تخریب آن سبب نشت یون های اساسی و نتیجتاً مرگ باکتری می شود.

اندک تفاوت مشاهده شده در نتایج میزان درصد اجزای متشكله این انسان در مطالعه کنونی با مطالعات به عمل آمده قبلی می تواند تحت تاثیر فصل برداشت، سن گیاه، منطقه جغرافیایی رشد و ... باشد [۲].

در مطالعه اوزکان و ارکمن (۲۰۰۱) نیز خاصیت ضد باکتریایی انسان روغنی زیرا بروی *E. coli* O157:H7 تاحدودی متأثر از مواد فنولی موجود در انسان مزبور ذکر نمودند [۲۱].

در مطالعه مرادی و همکاران (۲۰۰۹) کاربرد غلاظت ۴۵۰ میکرو لیتر بر لیتر انسان زیرا سبز در دمای ۱۰ و ۲۵ درجه سانتی گراد سبب کاهش چشمگیر تعداد باکتری باسیلوس سرئوس در مدل غذایی در مقایسه با سایر غلاظت ها یعنی صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ شده بود [۶].

ج) بررسی تاثیر انسان دارچین و زیرا سبز بر ساختار سلولی باکتری باسیلوس سرئوس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM): با آن که اثرات ضد میکروبی انسان های روغنی بر روی پاتوژن های مولد بیماری های منتقله از راه مواد غذایی در محیط کشت و مدل غذایی به اثبات رسیده است ولی مکانیسم و جزئیات آنها هنوز نامشخص می باشد. لذا جهت شناخت مکانیسم ضد میکروبی انسان ها بر ساختار سلولی این گونه باکتری ها از روش های مختلفی از جمله میکروسکوپ الکترونی استفاده می شود. به طوری که موسوی و بستی (۲۰۰۸) در مطالعات خود با میکروسکوپ الکترونی گذاره تاثیر انسان آویشن شیرازی بر روی سالمونلا تایفی موریوم را به صورت افزایش نفوذپذیری غشاء سلولی و نشت اجزا درون سلولی به خارج آن و در باکتری استافیلکوکوس آرئوس به صورت پارگی دیواره نشان دادند. محققین مذبور این تغییرات مورفولوژیکی مهم از جمله پارگی غشاء سلولی را که منجر به خالی شدن محتويات آن و بدشکلی سلول ها (Deformity) می شود ناشی از میزان بالای کارواکرول موجود در انسان آویشن شیرازی و تاثیر طبیعت لیپوفیلیک انسان مذبور ذکر کردند [۳].

در مطالعه بارت (Burt) و ریندرس (Reinders) (۲۰۰۳) تاثیر مهاری ترکیبات فنولیک انسان های روغنی پونه کوهی و



[۲۴، ۸]

ساختار سلولی باکتری باسیلوس سرئوس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) انجام شد، در گروه کنترل باکتری‌ها دارای تقسیم سلولی طبیعی و متقاضان بوده، غشاء سلولی از استحکام و یکپارچگی خاص خود برخوردار بوده، غشاء فسفولیپیدی دو لایه، لایه پیتیدوگلیکان و مزوژوم طبیعی می‌باشد. همچنین محتویات سیتوپلاسمی و دیواره عرضی طبیعی باکتری در حین تقسیم سلولی دلالت بر سالم بودن باکتری می‌کند (تصاویر شماره ۱-الف، ب و ج).

در حالی که در گروه تیمار (حاوی اسانس دارچین) در مقاطع میکروسکوپ الکترونی سلول‌های باسیلوس سرئوس در محیط BHI حاوی DMSO، سلول‌های باکتریابی دفرمه شده، تقسیم سلولی نامتقاضان بوده و مراحل اولیه اسپورسازی غیرطبیعی، صدمات وارد به دیواره سلولی باکتری‌ها به صورت عدم یکنواختی و پیوستگی دیواره سلولی، وجود سوراخ (Hole) در آن، پارگی دیواره سلول به صورت کامل و یا چسبیده به سیتوپلاسم، نشت محتویات سیتوپلاسمی و نتیجتاً خالی شدن سلول‌ها و همچنین وجود تکه‌هایی از دیواره سلولی به چشم می‌خورد. لذا تاثیر ضدباکتریابی اسانس دارچین بر روی باکتری باسیلوس سرئوس مشهود می‌باشد (تصاویر شماره ۲-الف، ب و ج).

گوئینوایسیو E (Guinoiseau) و همکاران (۲۰۱۰) غشاء پلاسمایی باکتری‌ها را اولین محل عمل توکسیک اسانس‌های روغنی خصوصاً در ارتباط با خاصیت هیدروفوبیستی اجزا ترپنونئیدی آن‌ها ذکر نموده که سبب تفکیک غشاء دو لایه‌ای فسفولیپیدی باکتریابی، تخریب غشا و بالاخره تخلیه محتوای باکتری‌ها می‌گردد [۲۹]. در تایید نظر محققین قبلی چنین بر می‌آید که اسانس دارچین از طریق تغییر در مکانیسم‌هایی نظیر قابلیت نفوذ انتخابی غشاء سلولی، مهار فعالیت تنفسی، از دست دادن فعالیت‌های آنزیمی و اساسی دیگر سبب تغییر در غشاء باکتری باسیلوس سرئوس و لذا منجر به مرگ آن شده است [۲۸، ۲۹].

قابل ذکر آن که تغییر شکل (دفرمه شدن) سلول‌ها در هر دو گروه تیمار به نظر می‌رسد به علت از دست رفتن استحکام دیواره سلولی و از هم‌گسیختگی غشاء سلولی باشد.

در گروه تیمار حاوی اسانس زیره سبز نیز مقاطع

همچنین در مطالعات میکروسکوپ الکترونی کارسون (Carson CF) و همکاران (۲۰۰۲) و دینیر (Denyer SP) و هوگو (Hugo WB) (۱۹۹۱) از تخلیه محتویات سیتوپلاسمی به عنوان یک صدمه‌ی مهم و غیرقابل برگشت یاد شده است [۲۵، ۲۶].

در این مطالعه نیز تغییرات موجود در شکل، تقسیم سلولی غیرطبیعی، عدم انسجام و یکپارچگی دیواره سلولی، تخلیه محتویات سیتوپلاسمی و غیره توسط هر یک از دو اسانس دارچین و زیره سبز کاملاً مشهود می‌باشد.

به نظر می‌رسد که در مطالعات مختلف تغییرات میکروسکوپی به دست آمده بسیار متفاوت و بسته به اسانس به کار برده شده و باکتری مورد نظر دارد. به عنوان مثال در مطالعه اوسلا و همکاران (۲۰۰۶) که بر روی مکانیسم عمل سه اسانس روغنی دارچین چینی، پونه کوهی (*Corydotherymus capitatus*) و اسانس مرزه کوهی (*Satureja Montana*) با حداقل غلظت بازدارنده (MIC) آنها بر روی اشريشيا کولاي O157:H7 و لیستریا منوسایتوژن و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی صورت پذیرفت، وضعیت غشاء و دیواره سلولی باکتری‌ها و نشت محتویات سلولی بررسی شد که پونه کوهی و همچنین دارچین چینی تغییرات بیشتری را در نفوذپذیری غشاء سیتوپلاسمی لیستریا منوسایتوژن در مقایسه با اشريشيا کولاي با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نشان دادند [۲۷].

در مطالعه رایور (Rhayour) و همکاران (۲۰۰۳) که از اسانس‌های روغنی مشابه و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) صورت پذیرفت، اثرات باکتری‌کشی ترکیبات فنولیک بر روی باکتری اشريشيا کولاي و باسیلوس سوبتیلیس به صورت صدمات مشخص در دیواره سلولی نظیر فرو رفتگی پوشش (Envelope) غشایی در باکتری اشريشيا کولاي و در باسیلوس سوبتیلیس به صورت بدشکل بودن سلول‌ها (دفرمه شدن) مشاهده شد و علت متفاوت بودن تغییرات ایجاد شده در ساختمان دو باکتری به متفاوت بودن گرم مثبت و گرم منفی بودن آنها نسبت داده شد [۲۸].

در مطالعه حاضر که اثر ضدباکتریابی غلظت ۴۵۰ میکرولیتر بر لیتر اسانس دارچین و زیره سبز بر روی رشد و



غشایی سلول باکتری گزارش نمودند. در این مطالعه نیز انسس روغنی زیره سبز برخلاف انسس دارچین به طور مشخص قادر به ایجاد انعقاد اجزای سیتوپلاسمی و مواد متراکم داخل سلولی در نزدیک پوشش غشایی باکتری بود. به نظر می‌رسد علت مواد منعقد شده موجود در سلول، رسوب پروتئین‌های غیرطبیعی و یا غشاء دناتوره شده باشد [۳۰].

بر طبق مطالعات مختلف انسس‌های روغنی حاوی ترین‌ها (Terpens) (نظیر انسس دارچین و زیره سبز به کار برده شده در این بررسی) با خاصیت هیدروفوبیستی خود قادر به نفوذ و یا تخریب ساختمان‌های حاوی چربی بوده و سبب تجمع در غشای سلولی، از دست رفتن اتصالات غشایی و یکپارچگی آن و همچنین تخریب نیروی محرکه پروتونی (Proton motive force) می‌شوند [۲۹، ۱۲].

به نظر می‌رسد که جایگاه اصلی انسس‌ها غشای سلول، اندامک‌های سلولی و دیواره سلول باشد. ولی احتمالاً یک مکانیسم اختصاصی جهت توجیه فعالیت ضدباکتریایی انسس‌های روغنی متفاوت در یک نوع باکتری و بالعکس موجود نمی‌باشد و علاوه‌بر میزان آب‌گریزی مواد موجود در غشاء سلولی که قابلیت نفوذ آن را تحت تاثیر انسس‌های روغنی مشخص می‌نمایند، ترکیبات دیگر موجود در غشاء سلول باکتریایی باسیلوس سرئوس را نیز نباید نادیده انگاشت. در خاتمه به نظر می‌رسد که قابلیت فیزیکی فعال انسس‌های روغنی دارچین و زیره سبز بر روی غشای دولایه‌ای فسفولیپیدی باسیلوس سرئوس از طریق اختلال در حمل تبادلات غشایی صورت می‌گیرد. البته انسس‌های روغنی فوق برای مهار رشد این باکتری پاتوژن می‌توانند در آن واحد با چندین مکانیسم مختلف سلول باکتریایی را مورد هدف قرار بدهند [۲۹، ۲۷].

میکروسکوپ الکترونی سلول‌های باسیلوس سرئوس در محیط حاوی DMSO علاوه بر دفرمه شدن سلول‌های باکتریایی تقسیم سلولی نامتفاون، غیرطبیعی بودن اسپورسازی در مراحل اولیه، پارگی دیواره سلولی به صورت کامل و یا چسبیده به سیتوپلاسم، نشت محتويات سیتوپلاسمی به خارج از سلول، طویل شدن سلول‌های باکتریایی و تراکم اجزای سیتوپلاسم به صورت منعقد شده به چشم می‌خورد. در بررسی‌های درخشان و همکاران (۲۰۰۸) که بر روی تأثیر ضدباکتریایی انسس روغنی زیره سبز بر روی مورفولوژی و وضعیت کپسول و فعالیت اوره‌آز در باکتری کلبسیلا نمونیا صورت پذیرفت نتایج حاصل از مطالعات میکروسکوپ الکترونی گذاره نشانگر تغییرات مورفولوژیکی خاصی در سلول باکتری نظیر طویل شدن آنها بود که مشابه این تغییرات در تیمار انسس زیره سبز بر روی باکتری باسیلوس سرئوس نیز مشاهده شد. همچنین محققین مذکور اثرگذاری جزء لیپوفیلیک انسس زیره سبز را بر روی قسمت‌های لیپیدی موجود در غشاء سلولی باکتری از طریق آنزیم‌ها، حاملین (Carrier) و کanal‌های یونی و گیرنده‌های آن‌ها ذکر نمودند. در این مطالعه به نظر می‌رسد تغییر در نفوذ پذیری (Permeability) غشای سلولی و یا به علت وجود مکانیسم‌های غیرمستقیم دخیل با فعالیت‌های آنزیمی مرتبط با تقسیم سلولی و یا ترکیبی از هر دو عامل ذکر شده علت ایجاد حالت فوق باشد [۹].

در مطالعات اسکاندامیس (Skandamis P) و همکاران (۲۰۰۵) نیز در مشاهدات میکروسکوپ الکترونی که بر روی کاربرد پونه‌ی کوهی بر روی اشریشیا کولای انجام گرفته بود، تراکم مواد داخل سلولی را به صورت انعقاد (Coagulation) اجزای سیتوپلاسمی و همچنین خشن و نامنظم بودن ساختمان

## منابع

- Akhondzadeh Basti A, Misaghi A and Khaschabi D. Growth response and modeling of the effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil, pH and temperature on

*Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *LWT- Science and Technology* 2007; 40: 973 - 81.

- Burt S. Essential oils: their antibacterial



properties and potential application in foods-a review, *Int. J. Food Microbiol.* 2004; 94 (3): 223 - 53.

**3.** Moosavy M, Basti AA, Misaghi A, Salehi TZ, Abbasifar R, Ebrahimzadeh Mousavi HA, Alipour M, Razavi NE, Gandomi H, Noori N. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes, *Food Research Int.* 2008; 41 (10): 1050 - 7.

**4.** Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12 (4): 564 - 82.

**5.** Kramer JM and Gilbert RJ. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species, Doyle MP (ed.), *Foodborne bacterial pathogens*, Marcel Dekker Inc. New York. 1989, pp: 21 - 70.

**6.** Moradi B, Mashak Z, Akhondzadeh Basti A, Moradi B, Barin A. Study of the effect of *Cuminum cyminum* L. essential oil on the growth of *Bacillus cereus* in a food model system, *J. Medicinal Plants* 2009; No of acceptance: F/1774/40.

**7.** Mashak Z, Moradi B, Moradi B. The Combined effect of *Zataria multiflora* Boiss. and *Cinnamomum zeylanicum* Nees. essential oil on the growth of *Bacillus cereus* in a food model system, *J. Medicinal Plants* 2010; No of acceptance: F/1732/40.

**8.** Bouhdid S, Abrini J, Amensour M, Zhiri A, Espuny MJ and Manresa A. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *J. Appl. Microbiol.* 2010; DOI: 10.1111/j.1365-2672.04740.x.

**9.** Derakhshan S, Sattari M, Bigdeli M. Effect of subinhibitory concentrations of cumin

(*Cuminum cyminum* L.) seed essential oil and alcoholic extract on the morphology, capsule expression and urease activity of *Klebsiella pneumoniae*, *Int. J. Antimicrob. Agents* 2008; 32: 432 - 6.

**10.** Moreira MR, Ponce AG, Del Valle CE and Roura SI. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen, *LWT - Food Sc. Tech.* 2005; 38: 565 - 70.

**11.** Chang ST, Chen PF and Chang SC. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*, *J. Ethnopharma.* 2001; 77 (1): 123 - 7.

**12.** Jrimand K and Rezaei MB. Plant essential oils research center in Iran, Academic Press. Iran. 2001, pp: 119 - 28.

**13.** Ooi LS, Li Y, Kam SL, Wang H, Wong EY and Ooi VE. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. *Am. J. Chin. Med.*, 2006; 34 (3): 511 - 22.

**14.** Gill AO and Holley RA. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *Int. J. Food Microbiol.* 2006; 111: 170 - 4.

**15.** Park IK, Lee HS, Lee SG, Park JD and Ahn YJ, Insecticidal and fumigant activities of *Cinnamomum cassia* barkderived materials against *Mechoris ursulus* (Coleoptera: Attelabidae), *J. Agri. Food Chem.* 2000; 48: 2528 - 31.

**16.** Valero M and Giner MJ. Effect of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth, *Int. J. Food Microbiol.* 2006; 106 (1): 90 - 4.



- 17.** Hernandez-Herreroa LA, Ginera MJ and Valero M. Effective chemical control of psychrotrophic *Bacillus cereus* EPSO-35AS and INRA TZ415 spore outgrowth in carrot broth, *Food Microbiol.* 2008; 25 (5): 714 - 21.
- 18.** Peter KV. Handbook of herbs and spices.2001; Vol 1. Cambridge, U.K.; Woodhead Publishing Ltd. 165 p.
- 19.** Hajlaoui H, Mighri H, Noumi E, Snoussi M, Trabelsi N and Bakhrouf RKA. Chemical composition and biological activities of Tunisian *Cuminum cyminum* L. A high effectiveness against *Vibrio* spp. Strains, *Food Chem. Toxicol.* 2010; DIO: 10.1016/j.fct.05.044.
- 20.** Lacobrbellis NS, Cantore PL, Capasso F, Senatore F, Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential Oils, *J. Agric. Food Chem.* 205; 53: 57 - 61.
- 21.** Ozcan M and Erkmen O. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices, *Euro. Food Res. Tech.* 2001; 212: 658 – 60.
- 22.** Burt SA and Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7, *Lett. Appl. Microbiol.* 2003; 36: 162 - 7.
- 23.** Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, Edwards M, Ercolini D and Mauriello G. Memberane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils, *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 4863 - 70.
- 24.** Lambert RJW, Skandamis PN, Coote P, Nychas GJE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol, and carvacrol, *J. Appl. Microbiol.* 2001; 91: 453 – 62.
- 25.** Carson CF, Mee BJ and Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined par time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 1914 – 20.
- 26.** Denyer SP, Hugo WB. Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In: Denyer SP, Hugo WB (eds), Mechanisms of action of chemical biocides: their study and exploitation, Blackwell Scientific Publications. Oxford. UK. 1991, pp: 171 – 87.
- 27.** Oussalah M, Caillet S, Saucier L and Lacroix M. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Sci.* 2006; 73: 236 – 44.
- 28.** Rhayour K, Bouchiki T, Tantaoui-Elaraki A, Sendide K and Remmal A. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, *J. Essential Oil Res.* 2003; 15: 356 - 62.
- 29.** Guinoiseau E, Luciani A, Rossi PG, Quilichini Y, Ternengo S, Bradesi P and Berti L. Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2010; DOI: 10.1007/s10096-010-0943-x.
- 30.** Skandamis P, Tsingarida E and Nychas GJE. The effect of oregano essential oil on survival/ death of *Salmonella thyphimurium* in meat stored at 5°C under aerobic, VP/MAP conditions, *Food Microbiol.* 2002; 19: 379 - 85.



## The Study of Antibacterial Effects of *Cinnamomum zeylanicum* Nees. and *Cuminum cyminum* L. Essential oil on Morphology of *Bacillus cereus* with Use of Transmission of Electron Microscopy (TEM)

Gholizadeh M (DVM)<sup>1</sup>, Mashak Z (Ph.D.)<sup>2\*</sup>, Poosti I (Ph.D.)<sup>3</sup>, Moradi B (M.Sc.)<sup>4</sup>, Moradi B (M.Sc.)<sup>5</sup>

1- Department of Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran

2- Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran

3- Department of Anatomy, Factually of specialized veterinary medicine, Islamic Azad University, Science and research campus, Tehran, Iran

4- Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran

5- Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran

\*Corresponding author: Department of Food Hygiene, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran; Tel: +98-261-4182543

E-mail: zohreh\_mashak@yahoo.com

### Abstract

**Background:** *Bacillus cereus* is a spore-forming food-borne pathogen often associated with food products such as meat, vegetables, soup, rice, and milk and other dairy products. 1 - 20 % of total outbreaks of food intoxication in the world are caused by *Bacillus cereus*. There is an increasing interest in the use of plant-derived antimicrobial compounds as natural preservatives for foods. Such as *Cinnamomum zeylanicum* Nees. and *Cuminum cyminum* L. essential oils that growth inhibition mechanism of several pathogen's morphology by them have been reported in various articles by electronic microscopy.

**Objective:** The objective of this survey was evaluation of antibacterial effects of *Cinnamomum zeylanicum* Nees. and *Cuminum cyminum* L. essential oils on *Bacillus cereus* morphology with use TEM.

**Methods:** The essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* Nees. and *Cuminum cyminum* plants were obtained by steam-distillation and analyzed by GC/MS. Then effect of concentration of these essential oils (450 µl/l) on morphology of *Bacillus cereus* was evaluated with TEM after processing and photographs explanation.

**Results:** with use of two treatments (*Cinnamomum zeylanicum* Nees. and *Cuminum cyminum* L. essential oils) observed abnormality bacterial division, cell deformity and depletion of cell content, release of cytoplasmic constituent. In treatment by *Cinnamomum zeylanicum* Nees. essential oil, destruction of bilayer phospholipids membrane and glycopeptides of cell wall and unintegrity was detected. But in *Cuminum cyminum* L. essential oil treatment observed cytoplasmic coagulation near the envelope of bacterial cell.

**Conclusion:** The results showed the different mechanism inhibitory effects of the *Cinnamomum zeylanicum* Nees. and *Cuminum cyminum* L. essential oils on morphology of *Bacillus cereus* with TEM.

**Keywords:** *Cinnamomum zeylanicum* Nees., *Cuminum cyminum* L., essential oils, *Bacillus cereus*, Transmission electron microscopy

