Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Food Processing and Preservation Journal

Print ISSN: 2423-3544
Online ISSN: 2423-3803

Iranian Association of Food Scientists and Technologists

Comparison of the effect of nanoemulsion and emulsion coating containing of *Oliveria decumbens* essential oil on bacteria inoculated into rainbow trout fillet

Leila Nikravan[1], Siavash Maktabi[2*], Maryam Ghaderi Ghahfarrokhi[3], Mohammad Mahmoodi Sourestani[4]

[1]Graduated from faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
[2]Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, Email: s.maktabi@scu.ac.ir
[3]Assistant professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Box: 61355-145, Ahvaz, Iran
[4]Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 2024-01-31
Revised: 2024-04-29
Accepted: 2024-05-06

Keywords:
Nanoemulsion
Essential oil
Oliveria decumbens
Pseudomonas aeruginosa
Listeria monocytogenes

ABSTRACT

Background and objectives: Fish, a significant component of the human diet, is prone to early spoilage due to its nutrient content. Supplying fresh fish, preventing spoilage and increasing shelf life have been considered in the food industry, and therefore, the use of edible films and coatings to increase the shelf life of fresh fish has been considered. *Oliveria decumbens* essential oil contains compounds such as thymol and carvacrol, which cause antimicrobial properties. To improve the antimicrobial and antioxidant properties and solve the problem of volatility and high consumption of essential oils, their nanoemulsions can be used. In this study, the effect of an edible sodium caseinate coating containing emulsion and nanoemulsion of *Oliveria decumbens* essential oil on the growth of *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes* inoculated into rainbow salmon fillets during storage in the refrigerator was investigated.

Materials and methods: The essential oil of *Oliveria decumbens* (*Od*-EO) was extracted according to standard methods using a Clevenger apparatus, and a concentration of 2% nanoemulsion of the essential oil was prepared. The antibacterial effect of essential oil and nanoemulsions of essential oil were evaluated by the microdilution method and the antioxidant property of essential oil was evaluated by the free radical reduction method. To evaluate the antibacterial effects, first, 100 µL of the prepared bacterial suspension with a concentration of 10^5 CFU/mL was inoculated ~~to~~ on the surface of the samples and then treated. To create a coating on the fish fillet, the pieces were immersed for 2 minutes in different treatments, including sterile physiological serum (control), pure sodium caseinate coating solution, caseinate coating solution containing essential oil, and caseinate coating solution containing essential oil nanoemulsion. The samples were dried for 2 minutes at room temperature and under sterile conditions to form the desired edible coating . The samples were stored for 15 days in a

refrigerator and ~~were~~ examined every 3 days.

Results: Thymol (53.4%) was identified as the most important compound in the chemical composition of *Oliveria decumbens essential oil*. The MIC and MBC ~~of~~ of essential oil for *Pseudomonas aeruginosa* bacteria 10 and 20 mg/ml, respectively, and against *Listeria monocytogenes* bacteria, 2.5 and 5 mg/ml, respectively. The MIC and MBC of the essential oil nanoemulsion for *Pseudomonas aeruginosa* bacteria, were 2.5 and 10 mg/ml, respectively, and for *Listeria monocytogenes* bacteria They were 1.25 and 2.5 mg/ml, respectively. The antioxidant activity of *Oliveria decumbens* essential oil and nanoemulsion was 1456.95 and 757.29 µg/µl, respectively. Treatment with sodium caseinate containing essential oil or sodium caseinate containing nanoemulsion of *Oliveria decumbens* essential oil could significantly reduce the amount of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in fish fillets during 15 days of refrigerator temperature ($P < 0.05$).

Conclusion: The results of this study have shown that a coating of sodium caseinate containing a nanoemulsion of *Oliveria decumbens* essential oil is effectively capable of inhibiting the growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* in rainbow trout fillets at cold temperatures. Furthermore, the nanoemulsion can be used in the food industries.

Cite this article: Nikravan, L., Maktabi, S., Ghaderi Ghahfarrokhi, M., Mahmoodi Sourestani, M. 2024. Comparison of the effect of nanoemulsion and emulsion coating containing of *Oliveria decumbens* essential oil on bacteria inoculated into rainbow trout fillet. *Food Processing and Preservation Journal*, 16(1), 33-48.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/fppj.2024.22153.1798
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

فرآوری و نگهداری مواد غذایی
شاپا چاپی: ۳۵٤٤-۲٤۲۳
شاپا الکترونیکی: ۳۸۰۳-۲٤۲۳

مقایسه پوشش حاوی نانوامولسیون و امولسیون اسانس لعل کوهستان بر باکتری‌های تلقیح شده به ماهی قزل آلا

لیلا نیکروان[۱]، سیاوش مکتبی[۲*]، مریم قادری قهفرخی[۳]، محمد محمودی‌سورستانی[٤]

[۱] دانش آموخته دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۲] استاد، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، رایانامه: s.maktabi @scu.ac.ir
[۳] استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[٤] دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی-پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۲/۱۱/۱۱
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۳/۰۲/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۳/۰۲/۱۷

واژه‌های کلیدی:
نانوامولسیون
اسانس
لعل کوهستان
سودوموناس آئروژینوزا
لیستریا مونوسایتوژنز

چکیده

سابقه و هدف: گوشت ماهی یکی از منابع مهم رژیم غذایی انسان است. این محصول به‌دلیل وجود مواد مغذی در معرض فساد زود هنگام است. عرضه تازه ماهی و جلوگیری از فساد و افزایش زمان ماندگاری در صنایع غذایی مورد توجه بوده و لذا استفاده از فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی به‌منظور افزایش زمان ماندگاری ماهی تازه مورد توجه قرار گرفته است. اسانس گیاه لعل کوهستان دارای ترکیباتی مانند تیمول و کارواکرول می‌باشد که سبب ایجاد خواص ضدمیکروبی می‌شود. برای بهبود ویژگی‌های ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی و رفع مشکل فراریت و میزان مصرف بالای اسانس‌ها می‌توان از نانوامولسیون آن‌ها استفاده کرد. در این مطالعه اثر پوشش خوراکی کازئینات سدیم حاوی امولسیون و نانوامولسیون اسانس لعل کوهستان بر رشد باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و *لیستریا مونوسایتوژنز* تلقیح شده به فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان طی نگهداری در یخچال مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: اسانس گیاه لعل کوهستان (*Od*-EO) با استفاده از دستگاه کلونجر و طبق روش‌های استاندارد استخراج شد و غلظت ۲ درصد نانوامولسیون اسانس (*Od-NEO*) تهیه‌گردید. اثر ضدباکتریایی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و نانوامولسیون اسانس مورد ارزیابی قرارگرفت. جهت ارزیابی اثرات ضد باکتری ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تهیه شده با غلظت 10^6 CFU/mL به قطعات تهیه شده به‌صورت سطحی تلقیح و سپس به‌منظور ایجاد پوشش روی فیله ماهی، نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه در تیمارهای مختلف شامل سرم فیزیولوزی استریل (کنترل)، محلول پوششی کازئینات سدیم خالص، محلول پوششی کازئینات حاوی اسانس و محلول پوششی کازئینات حاوی نانوامولسیون اسانس غوطه‌ور شدند. نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق و در شرایط استریل زیر هود خشک گردیدند تا پوشش خوراکی مورد نظر بر روی آن‌ها تشکیل شده و سپس به مدت ۱۵ روز در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و به فاصله هر ۳ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد مهمترین ترکیب اسانس تیمول با غلظت ۵۳/٤ درصد می‌باشد. حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی اسانس برای باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به‌ترتیب ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در برابر باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* به ترتیب ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی نانوامولسیون اسانس برای باکتری*سودوموناس آئروژینوزا* به *ترتیب* ۲/۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* به‌ترتیب ۱/۲۵ و ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و نانوامولسیون اسانس لعل کوهستان به‌ترتیب ۱٤٥٦/۹۵ و ۷۵۷/۲۹ میکروگرم بر میکرولیتر بود. تیماری با کازئینات سدیم حاوی اسانس و یا کازئینات سدیم حاوی نانوامولسیون اسانس لعل کوهستان توانستند به‌طور معناداری میزان باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* و *سودوموناس آئروژینوزا* تلقیح شده در قطعات فیله‌ی ماهی طی ۱۵ روز نگه‌داری در دمای یخچال را کاهش دهند ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: پوشش خوراکی حاوی نانوامولسیون اسانس لعل کوهستان در مقایسه با امولسیون دارای اثر ضدباکتری مؤثرتری علیه باکتری‌های تلقیح شده داشته و سبب حفظ ویژگی‌های حسی و افزایش ماندگاری ماهی قزل آلای رنگین کمان گردید.

استناد: نیکروان، لیلا؛ مکتبی، سیاوش؛ قادری قهفرخی، مریم؛ محمودی‌سورستانی، محمد. (۱٤۰۳). مقایسه پوشش حاوی نانوامولسیون و امولسیون اسانس لعل کوهستان بر باکتری‌های تلقیح شده به ماهی قزل‌آلا. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱٦(۱)، ٤۸-۳۳.

DOI: 10.22069/fppj.2024.22153.1798

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

گوشت ماهی به‌عنوان یکی از منابع مهم رژیم غذایی انسان محسوب می‌شود. فساد زودهنگام و افت کیفیت اولیه این محصول باعث شده که شرایط نگه‌داری و نوع بسته بندی آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) متعلق به خانواده سالمونیده دارای ارزش غذایی بالایی است که امروزه مصرف آن در سراسر دنیا افزایش یافته‌است. تولید جهانی آن در سال ۲۰۲۰ به میزان ۷٤۰۰۰۰ تن گزارش گردیده‌است (۱). مصرف این ماهی در کشور ما نیز به‌دلیل طعم مطلوب و امکان پرورش در مناطق معتدل و سردسیر کشور افزایش زیادی یافته است. امروزه استفاده از فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی به‌منظور افزایش زمان ماندگاری ماهی تازه مورد توجه قرار گرفته است. این فیلم‌ها علاوه بر خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی، قابلیت زیادی در حفظ بو، رنگ، طعم و عطر، ممانعت از ورود رطوبت و اکسیژن به محصول را دارند. فیلم‌های بر پایه کازئینات سدیم، بهترین و رایج‌ترین شکل پوشش‌های خوراکی محسوب می‌شوند که به‌دلیل ساختار کازئین و توالی اسید آمینه و قابلیت تشکیل باندهای وسیع هیدروژنی بین مولکولی، دارای خصوصیات نگه‌داری آب نیز می‌باشند و به راحتی در یک محلول آبی تشکیل فیلم می‌دهند (۲).

در دو دهه‌ی اخیر، به‌دلیل نگرانی از مصرف نگهدارنده‌های شیمیایی، بررسی استفاده از ترکیبات طبیعی همانند اسانس‌های گیاهی رشد چشمگیری داشته‌است. اسانس‌های گیاهی ترکیباتی معطر و آب گریز می‌باشند که توسط روش‌های فیزیکی از بخش‌های مختلف گیاهان استخراج می‌شوند و خواص ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها اثبات شده است (۳). گیاه لعل کوهستان *Oliveria decumbens* متعلق به خانواده چتریان در مناطق گرمسیری جنوب غربی و غرب ایران مانند استان‌های کرمانشاه، خوزستان، ایلام، چهارمحال و بختیاری، فارس و بوشهر رشد می‌کند (٤). اسانس این گیاه دارای ترکیباتی مانند تیمول و کارواکرول می‌باشد که سبب ایجاد خواص ضدمیکروبی علیه پاتوژن‌ها می‌شود (۵). برای بهبود ویژگی‌های ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی و رفع مشکل فراریت و میزان مصرف بالای اسانس‌ها می‌توان از نانوامولسیون آن‌ها استفاده کرد (٦). نانوامولسیون به امولسیونی گفته می‌شود که قطر ذرات آن در حدود ۱۰۰ نانومتر می‌باشد و. به‌دلیل اندازه کوچک قطر ذرات و نسبت بالای سطح به حجم می‌توان از آنها برای ریزپوشانی ترکیبات فعال زیستی استفاده نمود (۷). امروزه استفاده از نانوامولسیون اسانس‌های گیاهی به‌صورت پوشش‌های خوراکی جهت کنترل میکروارگانیسم‌های مواد غذایی مورد توجه زیادی قرار گرفته‌است.

لیستریا مونوسایتوژنز یک باکتری گرم مثبت و درون سلولی اختیاری است و به‌عنوان یکی از باکتری‌های مهم موادغذایی خصوصا در شرایط یخچالی شناخته می‌شود (۸). *سودوموناس* نیز یکی از باکتری‌های گرم منفی مهم است که عامل فساد در انواع مواد غذایی از جمله محصولات شیلاتی می‌باشد. این باکتری از جمله باکتری‌های سرما دوستی است که توانایی رشد در دمای یخچال را دارد (۹). گونه‌های مختلفی از باکتری‌های جنس *سودوموناس* در محیط و روده ماهیان وجود دارند که به‌واسطه تولید متابولیت‌های مختلف به‌سرعت رشد و تکثیر می‌کنند و در نتیجه باعث شروع فرآیند فساد می‌شوند (۱۰). ارائه روش‌های نوین در جهت کنترل باکتری‌های بیماری‌زا و یا به تأخیر انداختن فساد ناشی از باکتری‌ها نقش مهمی در افزایش زمان نگهداری محصولات شیلاتی و نیز افزایش بهداشت عمومی دارد.

در مطالعه حاضر ضمن بررسی آزمایشگاهی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی اسانس و نانواملسیون اسانس لعل کوهستان، یک بررسی مقایسه‌ای در خصوص اثر مهارکنندگی املسیون و نانواملسیون این اسانس در پوشش کازئینات سدیم بر کنترل رشد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* و *سودوموناس آئروژینوزا* تلقیح شده به فیله ماهی قزل‌آلا در دمای یخچال صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

استخراج اسانس و تهیه نانواملسیون اسانس: گیاه تازه لعل کوهستان از شمال شرقی استان خوزستان جمع‌آوری شد و سپس توسط هرباریوم گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز شناسایی و مورد تایید قرار گرفت. اسانس (*Od*-EO) با استفاده از دستگاه کلونجر و طبق روش‌های استاندارد داروئنامه اروپا استخراج شد و در ظروف شیشه‌ای درب‌دار تیره رنگ استریل در یخچال جهت انجام آزمایشات نگه‌داری گردید. آنالیز اسانس لعل کوهستان توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی انجام شد. نانواملسیون اسانس لعل کوهستان (*Od*-NEO) با غلظت ۲ درصد و با استفاده از سورفاکتانت غیریونی توئین ۸۰ (HLB:15)، آب مقطر و اسانس لعل کوهستان به کمک دستگاه اولتراسونیک با فرکانس ۲۰ کیلو هرتز تهیه گردید. نانواملسیون تهیه شده در ظرف غیرقابل نفوذ به نور و در دمای ٤ درجه سلسیوس نگه‌داری گردید (۱۱).

تهیه باکتری و سوسپانسیون میکروبی: سویه‌های *لیستریا مونوسایتوژنز* (ATCC 19118) و *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 9027) از کلکسیون میکروبی دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه و تایید گردیدند. به‌منظور فعال‌سازی، ابتدا باکتری از فریزر خارج و پس از رفع انجماد تحت شرایط استریل، ۱۰۰ میکرولیتر از سویه مورد نظر برداشته و به لوله‌های حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط کشت عصاره قلب و مغز براث (BHIB[1]) انتقال یافت. لوله‌ها به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردیدند. سپس از لوله‌های حاوی باکتری روی پلیت‌های تریپتیک سوی آگار (TSA[2]) کشت داده شد و پلیت‌ها به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شدند. جهت تهیه سوسپانسیون باکتری، یک کلنی به لوله‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع BHI استریل انتقال داده شد و سپس لوله‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شدند، سپس ۱ میلی‌لیتر از سویه باکتری مورد مطالعه به ۹ میلی‌لیتر محیط کشت مایع BHI اضافه شد. تعداد باکتری‌ها در محلول با روش کدورت سنجی در طول موج ۵۷۰ نانومتر به‌دست آمد. در این رابطه بر اساس بررسی‌های صورت گرفته، جذب نوری ۰/۰۸ تا ۰/۱ تقریبا معادل 10^8 باکتری در هر میلی‌متر در نظر گرفته شد. سپس با انجام رقت‌های متوالی غلظت معادل 10^5 CFU/mL به‌منظور تلقیح به فیله ماهی تهیه گردید (۱۲).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس و نانواملسیون اسانس لعل کوهستان: برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی، از روش میکرودایلوشن براث[3] در محیط کشت مایع BHI و با استفاده از میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای استفاده شد. غلظت‌های مختلف از اسانس و نانواملسیون اسانس (۰/۳۱۲ – ۰/٦۲۵ – ۱/۲۵ – ۲/۵ – ۵ – ۱۰ – ۲۰ – ٤۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تهیه‌گردید. به هر یک از چاهک‌ها، ۱٦۰ میکرولیتر محیط

1. Brain Heart Infusion Broth
2. Tryptic Soy Agar
3. Microdilution broth method

کشت مایع BHI و ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت معادل 10^5 CFU/mL و ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس و یا نانوامولسیون اسانس اضافه گردید. تعدادی از چاهک‌ها نیز به عنوان کنترل مثبت (۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت مایع BHI به‌همراه ۲۰ میکرولیتر باکتری مورد نظر) وکنترل منفی (۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت مایع BHI به‌همراه ۲۰ میکرولیتر اسانس و یا نانوامولسیون اسانس) در نظر گرفته شدند.

میکروپلیت کشت شده برای هر دو سویه باکتریایی در گرمخانه ۳۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت ٤٨-٢٤ ساعت قرار گرفتند. چاهک‌های دارای کدورت از نظر رشد مثبت تلقی شدند و در نهایت مقدار MIC براساس کمترین غلظت اسانس که رشد باکتری در آن دیده نشد تعیین گردید. همچنین رشد سویه‌ها روی محیط کشت جامد مورد بررسی قرار گرفت و حداقل غلظتی که با تشکیل پرگنه باکتری در پلیت‌ها همراه نبود به‌عنوان MBC در نظر گرفته‌شد (۱۳).

ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و نانوامولسیون اسانس لعل کوهستان: ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با روش احیاء رادیکال آزاد (DPPH) تعیین شد. غلظت‌های مختلفی از اسانس و یا نانوامولسیون اسانس لعل کوهستان (۵۰۰۰ -۳۱۲/۵ میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر) و محلول ۰/۰۰٤ درصد DPPH در متانول تهیه شد. سپس میزان ۵ میلی‌لیتر از محلول ذکر شده به ۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف اسانس و یا نانوامولسیون اسانس افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در تاریکی گرمخانه گذاری شد. پس از این مدت جذب نوری نمونه‌ها در مقایسه با بلانک در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردید. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و نانوامولسیون اسانس به‌صورت مقدار غلظت مهار ۵۰ درصد (IC_{50}) نشان داده‌شد که بیان‌گر غلظتی از ترکیب است که می‌تواند سبب ۵۰ درصد بازدارندگی در ظرفیت رادیکال آزاد شود. برای کنترل مثبت نیز از آنتی‌اکسیدان سنتزی بتا هیدروکسی تولوئن (BHT) استفاده شد (١٤).

تلقیح باکتری به فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان: فیله‌های ماهی قزل آلای رنگین کمان به تعداد کافی از یک مرکز عرضه معتبر شهر اهواز تهیه شدند. بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی استریل، فیله‌ها به قطعات ۷۰ گرمی تقسیم و در الکل ۷۰ درصد استریل گردیدند. سپس به‌طور جداگانه ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تهیه شده با غلظت 10^5CFU/mL به قطعات تهیه شده به‌صورت سطحی تلقیح و با کمک میله شیشه‌ای L شکل استریل پخش گردید و جهت تثبیت باکتری به‌مدت ۳۰ دقیقه در زیر هود نگه‌داری شد (۱۵).

تهیه محلول پوششی کازئینات سدیم: ابتدا ٤ گرم پودر سدیم کازئینات به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل تحت همزنی مداوم و آرام آرام اضافه گردید و به‌مدت ۳ ساعت با سرعت ۱۱۰۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد توسط همزن مغناطیسی همزده شد. سپس مقدار ۱/۲ گرم (معادل ۳۰ درصد وزن ماده خشک کازئینات سدیم) گلیسرول به‌عنوان نرم کننده به محلول اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه همزده شد و در نهایت اسانس و یا نانوامولسیون اسانس به محلول اضافه گردید تا محلول پوششی ۲ درصد تهیه شود (١٦).

تهیه تیمارهای مختلف: به‌منظور ایجاد پوشش روی فیله ماهی، قطعات به‌مدت ۲ دقیقه در تیمارهای مختلف شامل سرم فیزیولوزی استریل (کنترل)، محلول پوششی کازئینات سدیم خالص، محلول پوششی کازئینات حاوی ۲ درصد اسانس و محلول پوششی کازئینات حاوی ۲ درصد نانوامولسیون اسانس غوطه‌ور شدند. نمونه‌ها به‌مدت ۲ دقیقه در

دمای اتاق و در شرایط استریل زیر هود خشک گردیدند تا پوشش خوراکی مورد نظر بر روی آن‌ها تشکیل شود و سپس در کیسه‌های پلی اتیلنی استریل بسته‌بندی و به‌مدت ۱۵ روز در دمای یخچال ٤ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. از فیله‌ها به فاصله زمانی هر سه روز یک‌بار، در روزهای ۰، ۳، ٦، ۹، ۱۲و ۱۵ نمونه برداری شد و از نظر حضور و رشد باکتری تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند.

شمارش باکتریایی: وضعیت رشد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* و *سودوموناس آئروژینوزا* تلقیح شده بر فیله ماهی طبق روش‌های استاندارد و در محیط کشت‌های اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت. از محیط کشت اختصاصی پالکام آگار حاوی آنتی‌بیوتیک‌های سیکلوهگزامید، آکریفلاوین و نالیدیکسیک اسید جهت شمارش باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* و از محیط کشت اختصاصی ستریماید آگار حاوی آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک اسید نیز به‌منظور شمارش کلنی‌های *سودوموناس آئروژینوزا* استفاده شد.

تجزیه تحلیل آماری

تمامی آزمایشات در سه نوبت تکرار گردید و داده‌های به دست آمده با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱٦ به‌صورت توصیفی و تحلیلی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور تحلیل داده‌ها با آنالیز واریانس با اندازه‌گیری تکراری و آزمون تکمیلی LSD صورت گرفت (α =۰/۰۵ مبنای قضاوت آماری لحاظ گردید).

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی اسانس: اسانس لعل کوهستان با استفاده از دستگاه گازکروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی، مورد آنالیز قرار گرفت. بر طبق این بررسی، ۱۵ ترکیب شیمیایی در این اسانس مورد شناسایی قرار گرفت. تیمول با غلظت ۵۳/٤٪ به‌عنوان بیشترین ترکیب آلی موجود در اسانس لعل کوهستان می‌باشد. جدول ۱ ترکیب شیمیایی کامل اسانس لعل کوهستان را نشان می‌دهد.

جدول ۱- ترکیب شیمیایی گیاه لعل کوهستان *Od-EO*

Table 1. Chemical composition of *Od-EO*

تعداد NO	ترکیبات Compounds	درصد %	مدت زمان بازداری RT	شاخص بازداری RI
1	آلفا توجن Alpha-thujene	0.24	5.45	924
2	آلفا پینن Alpha-pinene	0.15	5.633	932
3	بتا پینن Beta-pinene	1.16	6.823	974
4	بتا میرسن Beta.-myrcene	0.4	7.23	988
5	آلف ترپینن Alpha- Terpinene	0.12	8.071	1014
6	سیمن Cymene	18.02	8.368	1020
7	لیمونن Limonene	1.5	8.488	1024
8	۱ و ۸ سینئول 1,8-Cineole	0.04	8.569	1026
9	گاما ترپینن Gamma-Terpinene	20.48	9.604	1054

10	ترپینولن Terpinolene	0.05	10.669	1086
11	٤-ال ترپینن Terpinene-4-ol	0.6	14.228	1174
12	آلفا ترپینول Alpha. terpineol	0.04	14.806	1186
13	تیمول Thymol	53.4	18.988	1289
14	کارواکرول Carvacrol	0.66	19.337	1298
15	میریستیسین Myristicin	2.7	28.458	1517
	جمع Total	99.56		

RT: Retention Time / مدت زمان بازداری

RI: Retention index / شاخص بازداری

نتایج بدست آمده در خصوص ترکیب شیمیایی اسانس هم‌خوانی نسبی با مطالعات سایر محققین بر روی اسانس لعل کوهستان دارد. به طور مثال در مطالعه‌ای توسط امین و همکاران (۲۰۰۵)، تیمول با ٤٧/٠٦ ٪ و کارواکرول با ۲۳/۳۱٪ بیشترین ترکیب موجود در اسانس گزارش گردید (١٦). محبوبی و همکاران (۲۰۱٦) نیز تیمول (٪۲٦/۹)، پاراسیمن (٪۱۳/۳) و گاماترپینن (٪۱۱) را به‌عنوان اجزای غالب اسانس لعل کوهستان و میزان کارواکرول موجود در اسانس را ٪۰/۲۵ گزارش نمودند (۱۷). در مطالعه بهبهانی (۲۰۱۸)، تیمول با ۲۸/٤٥ ٪ را ترکیب غالب موجود در اسانس دانستند (٤) که در مقایسه با مطالعه حاضر از مقادیر کمتری برخوردار بود. این تغییر و تفاوت‌های مشاهده شده در ترکیبات موثر در اسانس را می‌توان به‌علت تفاوت‌های موجود در مرحله رشد گیاه، روش اسانس‌گیری، تغییرات آب و هوایی، شرایط جغرافیایی منطقه، ترکیب خاک منطقه نسبت داد (۱۸).

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC): برای تعیین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی، از روش میکرودایلوشن براث استفاده شد که نتایج آن در جدول ۲ بیان شده است. طبق نتایج بدست آمده، باکتری‌های *لیستریا مونوسایتوژنز* و *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به نانوامولسیون اسانس لعل کوهستان حساسیت بالاتری نسبت به اسانس لعل کوهستان داشتند.

جدول ۲- مقادیر MIC و MBC (میلی‌گرم / میلی‌لیتر) اسانس و نانوامولسیون اسانس لعل کوهستان علیه باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و *لیستریا مونوسایتوژنز*

Table 2- MIC and MBC values (mg/ml) of *Oliveria decumbens* essential oil and nanoemulsion against *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes bacteria*

میکروارگانیسم Microorganism	اسانس لعل کوهستان *Od*-EO		نانوامولسیون اسانس لعل کوهستان *Od*-NEO	
	حداقل غلظت مهارکنندگی MIC	حداقل غلظت کشندگی MBC	حداقل غلظت مهارکنندگی MIC	حداقل غلظت کشندگی MBC
لیستریا مونوسایتوژنز *Listeria monocytogenes*	2.5	5	1.25	2.5
سودوموناس آئروژینوزا *Pseudomonas aeruginosa*	10	20	2.5	10

Od-EO: *Oliveria decumbens* essential oil; *Od*-NEO: *Oliveria decumbens* nanoemulsion essential oil

نانوامولسیون اسانس لعل کوهستان اسانس لعل کوهستان

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که با تبدیل اسانس به ذرات در مقیاس نانو می‌توان فعالیت ضدمیکروبی اسانس را بهبود بخشید. در مطالعه مشابهی توسط محبوبی و همکاران (۲۰۱۶)، مقادیر MIC و MBC گیاه لعل کوهستان برای باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* به ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۲۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر و برای باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* میزان MIC، ۰/۵ میکرولیتر بر میلی لیتر و MBC به‌میزان ۱ میکرولیتر بر میلی‌لیتر گزارش شد (۱۷). در مطالعه بهبهانی و همکاران (۲۰۱۸) خاصیت ضدمیکروبی گیاه لعل کوهستان بر رشد برخی از سویه‌های کلینیکی و استاندارد مانند *سودوموناس آئروژینوزا*، *استرپتوکوکوس پیوژنز* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* بررسی شد. در این مطالعه میزان MIC را بسته به سویه‌های مورد مطالعه از ۱ تا ۸ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر و میزان MBC را از ۱ تا ۱۶ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر گزارش نمودند (۴). تفاوت‌های مشاهده شده در میزان فعالیت ضدمیکروبی اسانس گیاه لعل کوهستان در مطالعات مختلف مرتبط با تفاوت‌های مشاهده شده در ترکیبات موثر در اسانس می‌باشد. در بررسی‌های انجام شده روی اثر ضدلیستریایی اسانس-های گیاهی مشخص گردید که حضور ترکیبات تیمول و کارواکرول جهت اعمال اثرات بازدارندگی روی این باکتری الزامی می‌باشد (۱۹). از طرفی *لیستریا مونوسایتوژنز* یک باکتری تطبیق‌پذیر است و می‌تواند تحت شرایط بسیار دشوار رشد کند. برخی سویه‌های لیستریا زمانی‌که در شرایط کشنده قرار می‌گیرند، قادر هستند تغییراتی در فیزیولوژی سلولی خود ایجاد کنند و در نتیجه باکتری می‌تواند پاسخ‌های تطبیق‌پذیر به مواد ضدمیکروبی موجود در محیط دهد (۷). مرال و همکاران (۲۰۱۹) گزارش نمودند که نانوامولسیون آویشن می‌تواند سبب کاهش بار میکروبی فیله ماهی قزل‌آلا در طی مدت زمان نگهداری شود و فعالیت ضدباکتریایی اسانس زمانی‌که به نانوامولسیون تبدیل می‌شود به‌دلیل دسترسی سریع‌تر اسانس به سلول باکتری افزایش می‌یابد (۲۰). یزگان (۲۰۱۳) و ازگل (۲۰۲۲)، نیز نتایج مشابهی گزارش نمودند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (۲۲، ۲۱).

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و نانوامولسیون اسانس: مهار رادیکال آزاد DPPH توسط اسانس و نانوامولسیون لعل کوهستان در مقایسه با BHT در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج بدست آمده، اسانس لعل کوهستان از خواص

آنتی‌اکسیدانی خوبی برخوردار می‌باشد. علاوه بر این، با تبدیل اسانس به نانوامولسیون، قدرت مهار رادیکال آزاد نیز افزایش می‌یابد (جدول ۳).

جدول ۳- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و نانوامولسیون گیاه لعل کوهستان با استفاده از روشDPPH

Table 3- Antioxidant capacity of *Oliveria decumbens* essential oil and nanoemulsion using DPPH method

روش Method	BHT	*Od*-EO	*Od*-NEO
DPPH	18.57±3.41[a]	1456.95±109.99[c]	757.29±16.62[b]

نتایج میانگین سه تکرار ± انحراف استاندارد میانگین

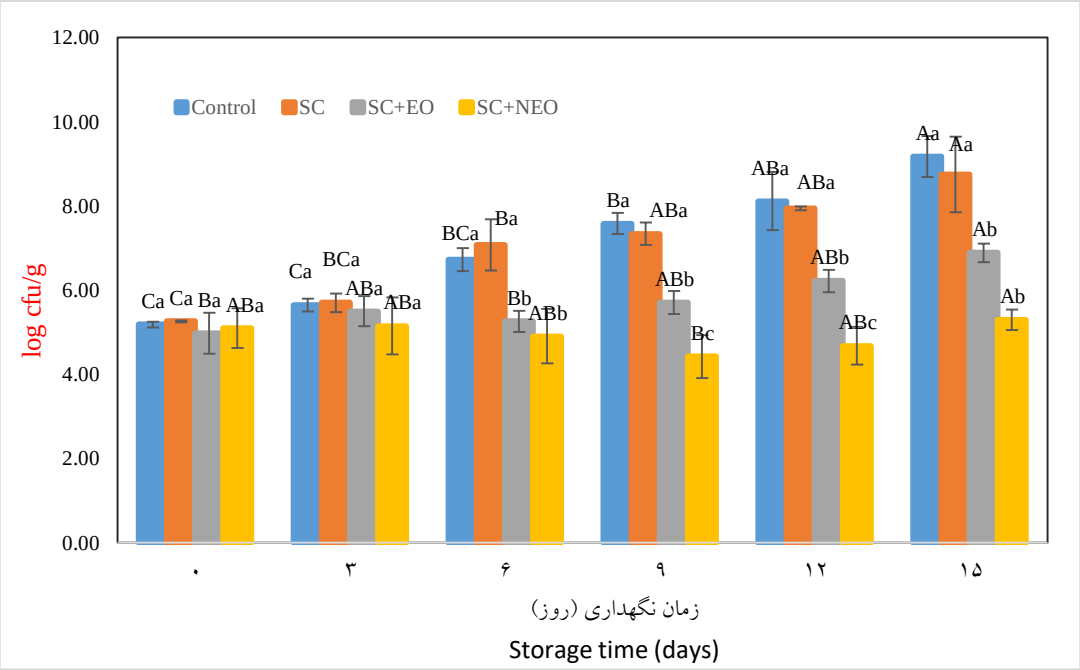
Mean values of three replicates ± the standard deviation of the mean.

حروف مختلف درهر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

Different superscript lettersrepresent the significant differences (p<0.05)

ترکیبات فنولی که به‌میزان گسترده در گیاهان یافت می‌شوند از قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی برخوردار هستند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات فنولی در نانوامولسیون قوی‌تر از اسانس می‌باشد که علت آن را می‌توان مربوط به سایز کوچک ذرات و در نتیجه اثر بهتر بر رادیکال‌های آزاد دانست (۲۳). در مطالعه سیبرت و همکاران (۲۰۱۹)، نشان داده شد که نانوامولسیون تولید شده از اسانس استخراج شده از برگ‌های علف لیمو در مقایسه با اسانس، خواص آنتی‌اکسیدانی حدود ٤ برابر بیشتر دارد (٢٤). در مطالعه دیگری توسط بهبهانی و همکاران (۲۰۱۸)، خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاه لعل کوهستان بررسی شد. در این مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس ۱/۲۵ ± ١٦٤/٤٥ میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر گزارش گردید که در مقایسه با مطالعه حاضر از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری برخوردار بود (٤). این تفاوت‌های مشاهده شده در مطالعات مختلف می‌تواند به این دلیل باشد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌ها مرتبط با ترکیبات شیمیایی آن‌ها به‌ویژه ترکیبات فنولیک مانند کارواکرول و تیمول می‌باشد و با تغییر ترکیبات اسانس در اثر شرایط مختلف، اثرات آنتی‌اکسیدانی نیز دچار تغییراتی گردد (۲۵).

آزمون شمارش میکروبی: نتایج میانگین لگاریتم تعداد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* و *سودوموناس آئروژینوزا* در قطعات فیله‌ی ماهی طی ۱۵ روز نگه‌داری در دمای یخچال به ترتیب در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. طبق نتایج بدست آمده، تیمار کازئینات سدیم به تنهایی تاثیری بر کنترل رشد باکتری نداشته است (p>۰/۰۵)، در حالی‌که تیمارکازئینات سدیم حاوی اسانس به ترتیب حدود *Log* ۲/۳ و *Log* ۱/۱ کاهش در تعداد *لیستریا مونوسایتوژنز* و *سودوموناس آئروژینوزا* و تیمارکازئینات سدیم حاوی نانوامولسیون اسانس لعل کوهستان حدود *Log* ۳/۹ و *Log* ۳ کاهش در باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* و *سودوموناس آئروژینوزا* تلقیح شده در قطعات فیله‌ی ماهی طی ۱۵ روز نگهداری در دمای یخچال ایجاد کردند که از نظر آماری معنی دار بود (p <۰/۰۵). اما در بین دو تیمار پوششی ذکر شده تفاوت معناداری مشاهده نگردید (p >۰/۰۵) و فقط در روزهای ۹ و ۱۲، تیمار کازئینات سدیم حاوی نانوامولسیون اسانس لعل کوهستان توانست به طور معناداری میزان باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* را کاهش دهد (p <۰/۰۵).



شکل ۱- تغییرات تعداد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* در نمونه‌های تلقیح شده در طول ۱۵ روز

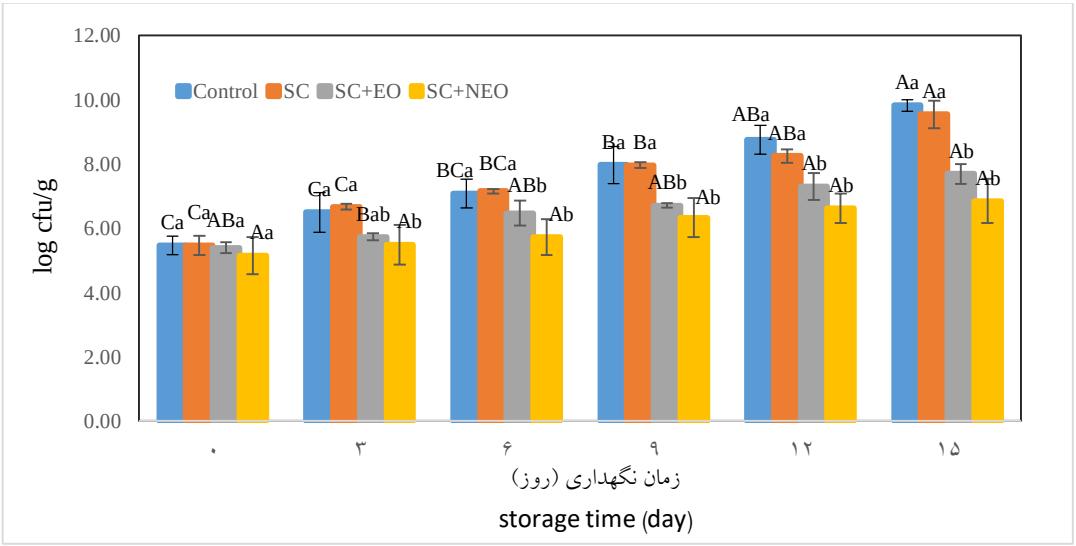
Figure 1- Changes in the number of *Listeria monocytogenes* in the inoculated samples during 15 days.

حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین روزهای مختلف در هر گروه می‌باشد.

* Different capital letters in each row indicate significant differences between different days in each group.

حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین گروه‌ها در هر روز اندازه‌گیری می‌باشد.

* Different small letters in each column indicate significant differences between groups on each measurement day.



شکل۲- تغییرات تعداد باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در نمونه‌های تلقیح شده در طول ۱۵ روز.

Figure 2- Changes in the number of *pseudomonas aeruginosa* in the inoculated samples during 15 days.

حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین روزهای مختلف در هر گروه می‌باشد.

* Different capital letters in each row indicate significant differences between different days in each group.

حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین گروه‌ها در هر روز اندازه‌گیری می‌باشد.

* Different small letters in each column indicate significant differences between groups on each measurement day.

بررسی کنترل رشد باکتری‌های تلقیح شده بر نمونه‌های فیله ماهی نشان داد که تیمار کازئینات سدیم حاوی نانوامولسیون اسانس لعل کوهستان توانایی بیشتری در کنترل رشد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* و *سودوموناس آئروژینوزا* داشته است. در مطالعه نیکانن و همکاران (۲۰۰۰)، اثر هم‌افزایی نایسین و اسید لاکتیک بر مهار باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* تلقیح شده بر ماهی قزل‌آلای رنگین کمان دودی شده مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه میزان باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* تلقیح شده بر عضله ماهی از Log CFU/gr ۳/۳ در ابتدای دوره به *Log CFU/gr* ۱/۸ در پایان دوره کاهش یافت (۲۶). ربیعی و همکاران (۲۰۱۳)، اثر بازدارندگی اسانس زنیان را بر رشد باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* تلقیح شده در محیط عصاره و گوشت ماهی سفید مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه تعداد اولیه باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* *Log CFU/gr* ٤/١ بود که در طول دوره آزمایش افزایش یافت و در پایان دوره به *Log CFU/gr* ۸/۱ رسید، در حالی‌که در تیمار حاوی غلظت ۰/۳ درصد اسانس، این میزان به *Log CFU/gr* ۲/۳ رسید. در این مطالعه تاثیر غلظت ۰/۳ درصد اسانس زنیان جهت کاهش باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* به‌خوبی مشاهده گردید (۲۷). شریفی و همکاران (۲۰۱۷)، توانستند با استفاده از پوشش آلژینات حاوی لاکتوپراکسیداز و آویشن کوهی میزان باکتری‌های *لیستریا مونوسایتوژنز* تلقیح شده بر فیله ماهی را کاهش دهند (۲۸).

در خصوص کنترل رشد باکتری *سودوموناس فلورسانس نیز* تحقیقات مشابه اندکی وجود دارد. به‌طور مثال صفری و همکاران (۲۰۱۵)، تاثیر عصاره پونه کوهی و نایسین را بر تغییرات رشد *سودوموناس فلورسانس* در گوشت چرخ شده ماهی کیلکا مورد ارزیابی قرار دادند. در گروه کنترل تعداد باکتری *سودوموناس فلورسانس* از *Log CFU/gr* ۳/٤٥ در ابتدای دوره به *Log CFU/gr* ۹/۲۲ در انتهای روز پانزدهم رسید. در حالی‌که این روند افزایشی برای تیمار پوششی حاوی ۱ درصد عصاره پونه و ۱۰۰۰ واحد نایسین بسیار کمتر بود و از *Log CFU/gr* ۳/۲۱ در روز صفر به *Log CFU/gr* ۵/۲۱ در پایان دوره رسید (۲۹). آقابابایی و همکاران (۲۰۲۱)، پوشش خوراکی نانوامولسیون کیتوزان حاوی اسانس شیرازی و کاکوتی را بر روی رشد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* تلقیح شده در فیله ماهی سالمون موثر دانستند (۳۰). احمدی و همکاران (۲۰۲۳)، به بررسی اثر ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی پوشش خوراکی دولایه ژلاتین- کیتوزان حاوی نانوامولسیون اسانس برازمبل[1] بر کنترل رشد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* تلقیح شده به فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که استفاده از پوشش کیتوزان-ژلاتین حاوی نانوامولسیون اسانس برازمبل سبب کاهش تعداد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در فیله‌ی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نگه‌داری شده در یخچال گردید (۳۱). اما تاکنون در هیچ مطالعه‌ای مقایسه‌ای در ارتباط با اثر ضدباکتریایی پوشش‌های خوراکی حاوی اسانس و نانوامولسیون اسانس بر مواد غذایی بررسی نشده است و فقط اثرات ضدباکتریایی آن‌ها بر روی برخی از باکتری‌های فسادزای غذایی در محیط آزمایشگاهی بررسی شده است که نشان دهنده افزایش فعالیت ضدباکتریایی نانوامولسیون اسانس به‌دلیل دسترسی سریع‌تر اسانس به سلول باکتری می‌باشد. افزایش فعالیت ضدباکتریایی تحت تاثیر عوامل مختلفی مانند نوع و خصوصیات فیزیکی اسانس، روش آماده‌سازی نانوامولسیون و نوع میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش می‌باشد (۲۳).

1. *Perovskia abrotanoides*

نتیجه‌گیری کلی

پوشش کازئینات سدیم حاوی ۲ درصد نانوامولسیون اسانس لعل کوهستان دارای اثر خوبی در کنترل رشد باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و *لیستریا مونوسایتوژنز* تلقیح شده به گوشت ماهی قزل‌آلای رنگین کمان داشت که نشان دهنده اثر خوب ضد-میکروبی اسانس و خصوصیات مناسب پوشش می-باشد. نتایج نشان داد استفاده از فناوری نانو در تهیه پوشش‌های خوراکی که حاوی ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی هستند می‌توانند به طور مؤثرتری موجب افزایش ماندگاری مواد غذایی به خصوص فرآورده-های دریایی شوند.

سپاسگزاری

بدینوسیله از حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه این تحقیق را در قالب پژوهانه پایان نامه‌ای (گرنت شماره SCU.VF99.534) فراهم نموده است سپاسگزاری می‌نماید.

References

1. FAO. (2022). The State of World Fisheries and Aquaculture. Towards Blue Transformation. Available online: www.fao.org
2. Mohsenzadeh, M., Alizadeh-Sani, M., Maleki, M., Azizi-lalabadi, M., & Rezaeian-Doloei, R. (2021). Fabrication of biocomposite films based on sodium caseinate reinforced with gellan and Persian gums and evaluation of physicomechanical and morphology properties. Journal of food science and technology (Iran), 18(113), 187-196.
3. Donsì, F., & Ferrari, G. (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. Journal of biotechnology, 233, 106-120.
4. Behbahani, B. A., Yazdi, F. T., Vasiee, A., & Mortazavi, S. A. (2018). Oliveria decumbens essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. Microbial pathogenesis,114: p. 449-452.
5. Khosravinezhad, M., Talebi, E., kumar, Sh., Nemati, Z., & Nasrollahi, I. (2017). Essential oil composition and antimicrobial, antioxidant activities of *Oliveria decumbens* Vent. International Journal of Herbal Medicine, 5: p. 102-106.
6. Bilia, A. R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., & Bergonzi, M. C. (2014). Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. Evidence-based complementary and alternative medicine, 2014:651593.
7. Huang, Q.; Yu, H. & Ru, Q. (2010). Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. Journal of Food Science, 75(1): 50-57.
8. da Silva Luz, I., Neto, N. J. G., Tavares, A. G., Magnani, M., & de Souza, E. L. (2012). Exposure of Listeria monocytogenes to sublethal amounts of Origanum vulgare L. essential oil or carvacrol in a food-based medium does not induce direct or cross protection. Food Research International, 48(2), 667-672 .
9. Sterniša, M., Klančnik, A., & Smole Možina, S. (2019). Spoilage Pseudomonas biofilm with Escherichia coli protection in fish meat at 5 C. Journal of the Science of Food and Agriculture, 99(10), 4635-4641.
10. Li, X. M., Zhu, Y. J., Ringø, E., & Yang, D. (2020). Prevalence of Aeromonas hydrophila and Pseudomonas fluorescens and factors influencing them in different freshwater fish ponds. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 19(1), 111-124.
11. Noori, S., Zeynali, F., & Almasi, H. (2018). Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (Zingiber officinale) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets. Food control, 84, 312-320
12. Merrikhi Ardebili, E. and Mohsenzadeh, M. (2018). Evaluation of methyl cellulose edible coating incorporated with Carum copticum L. essential oil and Turmeric (Curcuma longa L.)

extract on growth control of Listeria monocytogenes inoculated to chicken meat portions storaged at 4˚ C. Journal of food science and technology (Iran), 15(83): p. 315-328.
13. Nuraskin, C. A., Idroes, R., & Soraya, C. (2019). Study of inhibition of methanol extract of laban leaf (Vitex Pinnata) against Sreptococcus mutans with microdilution. Research Journal of Pharmacy and Technology, 12(12), 6037-6040.
14. Selles, S. M. A., Kouidri, M., Belhamiti, B. T., & Ait Amrane, A. (2020). Chemical composition, in-vitro antibacterial and antioxidant activities of Syzygium aromaticum essential oil. Journal of Food Measurement and Characterization, 14(4), 2352-2358.
15. Rabiey, S., Hosseini, H., & Rezaei, M. (2013). The H urdle Effect of Bunium persicum Essential Oil, Smoke and NaCl for Controlling the Listeria monocytogenes Growth in Fish Model Systems. Journal of Food Safety, 33(2), 137-144.
16. Amin, G., Sourmaghi, M. S., Zahedi, M., Khanavi, M., & Samadi, N. (2005). Essential oil composition and antimicrobial activity of Oliveria decumbens. Fitoterapia, 76(7-8), 704-707.
17. Mahboubi, M., Feizabadi, M. M., Khamechian, T., Kazempour, N., Zadeh, M. R., Sasani, F., & Bekhradi, M. (2016). The effect of Oliveria decumbens and Pelargonium graveolens on healing of infected skin wounds in mice. World journal of plastic surgery, 5(3), 259.
18. Sepahvand, R., Delfan, B., Ghanbarzadeh, S., Rashidipour, M., Veiskarami, G. H., & Ghasemian-Yadegari, J. (2014). Chemical composition, antioxidant activity and antibacterial effect of essential oil of the aerial parts of Salvia sclareoides. Asian Pacific journal of tropical medicine, 7, S491-S496.
19. Gill, A. and Holley, R. (2006). Disruption of Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Lactobacillus sakei cellular membranes by plant oil aromatics. International journal of food microbiology, 108(1): p. 1-9.
20. Meral, R., Ceylan, Z., and Kose, S. (2019). Limitation of microbial spoilage of rainbow trout fillets using characterized thyme oil antibacterial nanoemulsions. Journal of Food Safety, 39(4): p. 12644.
21. Yazgan, H. (2013). Effects of nanoemulsion based on sunflower oil on sensory, chemical and microbiological quality of sea bass (Dicentrarchus labrax) and sea bream (Sparus aurata) stored at chilled temperature (20 ±2 C). Department of Fisheries and Processing Technology, Institute of Natural and Applied Science, Cukurova University, Aldana Turkey.
22. Özogul, Y., El Abed, N., & Özogul ,F. (2022). Antimicrobial effect of laurel essential oil nanoemulsion on food-borne pathogens and fish spoilage bacteria. Food chemistry, 368, 130831.
23. Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Soobrattee, M. A., & Aruoma, O. I. (2002). Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of Cassia fistula. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(18), 5042-5047.
24. Seibert, J. B., Rodrigues, I. V., Carneiro, S. P., Amparo, T. R., Lanza, J. S., Frézard, F. J. G., Santos, O. D. H. d. (2019). Seasonality study of essential oil from leaves of Cymbopogon densiflorus and nanoemulsion development with antioxidant activity. Flavour and fragrance journal, 34(1), 5-14.
25. Shahbazi, Y., Shavisi, N., Karami, N., & Kakaei, S. (2015). Chemical composition and in vitro antibacterial activity of Ferulago angulata (Schlecht.) Boiss essential oil. Pharmaceutical Sciences, 21(1), 6-11.
26. Nykänen, A., Weckman, K., & Lapveteläinen, A .(2000) .Synergistic inhibition of Listeria monocytogenes on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate. International journal of food microbiology, 61(1), 63-72.
27. Rabiei, S., Hosseini, H., Rezaei, M., Mousavi, T.(2013). Inhibitory effects of Ajowan essential oil on growth of Listeria monocytogenes in Rutilus frissi kutum broth medium and fillet. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, Vol. 8, No. 2.
28. Sharifi, F., Khanzadi, S., Hashemi, M., & Azizzadeh, M. (2017). Control of Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157: H7 inoculated on fish fillets using alginate coating containing lactoperoxidase system and Zataria multiflora boiss essential oil. Journal of Aquatic Food Product Technology, 26(9), 1014-1021.

29. Safari, R., Bardani Amiri, Z., Yaqubzadeh, Z., Khajavi's truth, sh., (2015). Evaluation of growth changes of Pseudomonas fluorescens in minced meat of Kilka fish (Clupeonelladelicatula) containing biological preservatives. Caspian Sea Aquatic Journal. First year, number 3.
30. Aghababaei, M., Kazemeini, H.R. and Shahavi, M.H. (2021). Investigating Chemical Composition of Zataria multiflora Boiss and Ziziphora clinopodioides Essential Oils in Chitosan Nanoemulsion Coating on Growth of Aeromonas Hydrophila Inoculated in Salmon Fillets. Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology, 16 (2): p. 99-109.
31. Ahmadi, K., and Mohsenzadeh, M. (2023). Evaluation of antibacterial and antioxidant effect of gelatin-chitosan bilayer edible coating containing nanoemulsion of Perovskiaabrotanoides Kar. essential oil on growth control of Aeromonas hydrophila inoculated into rainbow trout fillet. Journal of Food Science and Technology (Iran). No. 133, Vol. 19.