مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال شانزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰، صفحات ۱۰۹-۹۹

مطالعه ترکیب شیمیایی اسانس گیاه آویشن شیرازی و کاکوتی در پوشش خوراکی نانوامولسیون کیتوزان برروی رشد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* تلقیح شده در فیله ماهی سالمون

مرضیه آقابابایی[۱]، حمید رضا کاظمینی[۲]، محمد حسن شاهوی[۳]

۱- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران
۲- نویسنده مسئول: استادیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران
پست الکترونیکی: h.kazemeini@ausmt.ac.ir
۳- استادیار دانشکده مهندسی فناوری‌های نوین، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۶/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۹/۲۵

چکیده

سابقه و هدف: بیماری‌های با منشاء غذا همواره مهم ترین دغدغه‌های بشر بوده و مطالعه حاضر به منظور بررسی روشی برای کاهش این خطرات انجام شده است. هدف از این مطالعه بررسی ترکیب شیمیایی اسانس‌های آویشن شیرازی و کاکوتی و کاربرد آن در پوشش پایه نانوامولسیون کیتوزان جهت کنترل رشد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* تلقیح شده در فیله ماهی تازه سالمون طی یک دوره ۱۲ روزه نگهداری شده در دمای سرد (۱±۴ درجه سانتی‌گراد) و همچنین بررسی فعالیت ضد باکتریایی اسانس و نانوامولسیون اسانس‌های آویشن شیرازی و کاکوتی علیه باکتری مورد مطالعه به روش میکرودایلوشن جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) بود.

مواد و روش‌ها: ترکیب شیمیایی اسانس با روش کروماتوگرافی گازی تعیین و تیمارها در شش گروه؛ فاقد پوشش (کنترل)، کیتوزان، نانو امولسیون کیتوزان، نانوامولسیون کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی ۰/۵درصد، نانوامولسیون کیتوزان حاوی اسانس کاکوتی۰/۵درصد و تیمار نانوامولسیون کیتوزان حاوی ترکیب اسانس‌های آویشن شیرازیوکاکوتی تقسیم شدند، سپس نمونه‌ها جهت شمارش باکتری در روزهای صفر، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۲ به یخچال منتقل شدند.

یافته‌ها: کارواکرول ۴۴/۳۶٪، تیمول ۳۰/۱۴٪ و گاماترپینن ۸/۳۱٪ به عنوان مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی و پولگون ۴۸/۱۹٪ به عنوان مهم ترین ترکیب شیمیایی اسانس کاکوتی شناسایی شده و میانگین لگاریتم تعداد باکتری شمارش شده در دوره ۱۲ روزه بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<0/05$). مطالعه حاضر نشان داد که بیشترین اثر مهارکنندگی روی باکتری مربوط به گروه نانوامولسیون کیتوزان حاوی اسانس‌های آویشن شیرازی و کاکوتی در مقایسه با گروه کنترل بود.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد، پوشش های خوراکی نانوامولسیون کیتوزان حاوی اسانس‌های آویشن شیرازی و کاکوتی به طور مؤثری توانایی مهار رشد باکتری بیماری زا *آئروموناس هیدروفیلا* در نمونه‌های گوشت ماهی سالموندر دمای سرد را دارند و استفاده از آن‌ها در صنعت غذا می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: نانوتکنولوژی، کیتوزان، اسانس، *آئروموناس هیدروفیلا*، غذاهای دریایی

• مقدمه

منابع پروتئین دریایی به عنوان یکی از مهمترین موارد تأمین کننده پروتئین حیوانی در سبد غذایی جوامع، سابقه‌ای بسیار طولانی دارند (۱). اکسیداسیون و واکنش هیدرولیتیک چربی‌ها (هیدروپراکسیدها، آلدئیدها، کتونها، اسیدهای چرب و...) مشخصات طعم، بو، رنگ، بافت، ارزش غذایی و به طورکلی کیفیت ماهی را تغییر می‌دهند و باعث عدم مطلوبیت برای مصرف کنندگان می‌شوند (۲).

ماهی سالمون از دسته ماهی‌های آزاد محسوب می‌شود. این ماهی کم کالری بوده ولی سرشار از پروتئین، اسید چرب امگا-۳، کلسترول مفید و ریزمغذی‌هایی نظیر ید، فسفر، کلسیم، سدیم، پتاسیم، سلنیوم، آهن، ویتامین آ می‌باشد. مصرف این ماهی سطح استرس را در بدن انسان کاهش می‌دهد و در حفاظت از پوست، تقویت عملکرد قلب و افزایش سلامت قلب نقش کلیدی دارد (۳).

از آنجا که مهمترین دلیل فساد، رشد میکروبی روی سطح فرآورده‌های غذایی است، به کار بردن عوامل ضدمیکروبی در بسته‌بندی می‌تواند سبب به تأخیر انداختن یا حتی جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های عامل فساد شده و درنتیجه باعث افزایش مدت زمان ماندگاری و بهبود ایمنی فرآورده‌های غذایی شود. برای افزایش ماندگاری و بهبود کیفیت فرآورده‌های غذایی در مدت نگهداری، به طور متداول، آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر هیدروکسی آنیزولبوتیله و هیدروکسی تولوئن بوتیله و عوامل شلاته کننده و ترکیبات ضدمیکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴).

کیتوزان یکی از بهترین زیست بسپارهایی است که تاکنون برای تهیه فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی به کار رفته است که از N-استیل زدایی قلیایی جزیی کیتین به دست می‌آید، کیتین عموماً در اسکلت خارجی یا محافظ پوشش سخت‌پوستان دریایی یافت می‌شود (۵). برای روکش‌های کیتوزان تعدادی از خواص کاربردی شامل: خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و نفوذناپذیری در برابر عبور اکسیژن گزارش شده است. استفاده از اسانس‌های طبیعی به دلیل محتوای گروه‌هایی از ترکیبات پلی‌فنلی که به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند، از تشکیل رادیکال‌های آزاد جلوگیری کرده و موجب حفظ ویژگی‌های گوشت ماهی می‌شود (۶).

آویشن شیرازی (*Zatariamultiflora*Boiss) یکی از گیاهان خانواده نعناعیان می‌باشد که بومی ایران، پاکستان و افغانستان است. از این گیاه در طب سنتی به عنوان آنتی سپتیک، ضد التهاب و ضد اسپاسمیاد شده است و به عنوان طعم دهنده در مواد غذایی کاربرد فراوانی دارد. آویشن شیرازی دارای اثر ضد میکروبی می باشد که این اثر به طور عمده به تر کیبات فنلی آن مربوط می‌باشد. هر چقدر مقدار مواد فنولی در اسانس بالاتر باشد، خواص ضد میکروبی آن بیشتر است. این مواد شامل کارواکرول، تیمول و اوژنول هستند (۷).

گیاه کاکوتی با نام علمی (*Ziziphoraclinopodioides*) متعلق به جنس زیزیفورا و تیره نعناعیان می‌باشد. پراکنش جغرافیایی گیاه کاکوتی در جهان در شبه جزیره بالکان شرقی، جنوب غربی آسیا و آسیای مرکزی تا کوه‌های پامیرآلای و هیمالیا (ایران، عراق و بخش‌های شرقی و مرکزی ترکیه) و آفریقا می‌باشد (۸). گیاهان تیره نعناعیان از زمان‌های گذشته در طب سنتی استفاده می‌شدند و معمولاً در درمان عفونت‌های دستگاه گوارش یا دل درد استفاده مورد استفاده قرار می‌گرفتند و همچنین در معالجه امراض معده و به عنوان ضدعفونی کننده برای رفع سرما خوردگی به کارمی رود. پولگون به عنوان ماده مؤثره این اسانس گزارش داده شده است (۹، ۸).

فناوری نانو در پوشش‌های خوراکی می‌تواند به واسطه کاهش اندازه ذرات و کوچکتر کردن منافذ پوشش‌ها باعث افزایش کارایی آنها در مقایسه با پوشش‌های خوراکی معمولی شود و ارتقای کیفی مواد بسته‌بندی را به دنبال داشته باشد (۱۰). نانوامولسیون‌ها به دلیل اندازه ریزقطرات می‌توانند به صورت کاملا یکنواخت بر روی سطحی که روی آن هستند پخش شوند و همچنین می‌توانند عناصر فعال موجود در یک لایه محافظتی را به یکدیگر مرتبط کنند (۱۱). با توجه به ویژگی‌های ضد میکروبی پوشش‌های نانو، یکی از مهم ترین کاربرد آن ها، در صنایع بسته‌بندی می‌باشد و قراردادن محصولات در بسته بندی نانو، از آلوده شدن آن‌ها با عوامل میکروبی جلوگیری می‌نماید و فرآورده‌های شیلاتی به سادگی و به راحتی می‌توانند به انواع مختلفی از عوامل بیماری‌زا آلوده شوند و تحقیقات انجام شده نشانگر این امر است که کاربرد پوشش‌های نانوامولسیون کیتوزان باعث افزایش ماندگاری در گوشت ماهی می‌شود (۱۲).

توزیع و فراوانی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در اکوسیستم آبی به خوبی اثبات شده و مشخص شده است که این باکتری بخشی از فلور روده آبزیان است که می‌تواند به هنگام ایجاد تنش، بیماری‌زا گردد. *آئروموناس هیدروفیلا* یک باکتری همه جایی، فرصت‌طلب، گرم منفی، میله‌ای شکل، به طور عمده متحرک، بی هوازی اختیاری، اکسیداز مثبت و تخمیر کننده گلوکز است. این باکتری سبب آلودگی زخم‌ها، عفونت خون و گاستروانتریت با منشاء آب و غذا در انسان می‌گردد. به طورکلی باکتری‌های جنس آئروموناس از طریق تولید سموم خارجی نظیر انتروتوکسین، همولیزین (آئرولیزین)، لیپاز و پروتئاز سبب بروز بیماری می‌گردند (۱۳)

هدف از این مطالعه بررسی ترکیب شیمیایی اسانس‌های آویشن شیرازی و کاکوتی در پوشش خوراکی نانوامولسیون کیتوزان روی رشد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* تلقیح شده

برگوشت ماهی سالمون طی یک دوره ۱۲روزه در شرایط نگهداری در دمای یخچال می‌باشد.

• مواد و روش‌ها

باکتری *آئرومونـاس هیدروفیلا*(NCTC۷۹۶۶) از گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل تهیه شد. کلیه محیط کشت‌ها از شرکت مرک خریداری شدند. کیتوزان با وزن مولکولی کم (درجه دی استیلاسیون ۹۱ درصد) از شرکت سیگما آلدریچ (سنت لوئیس، ایالات متحده) استفاده شد.

تهیه اسانس: گیاه تازه آویشن شیرازی و کاکوتی از مرکز فروش گیاهان دارویی شهر آمل، استان مازندران خریداری شد. جهت تهیه اسانس آویشن شیرازی مقدار ۵۰ گرم از گیاه خشک و پاک شده را با استفاده از آسیاب برقی خرد کرده و گیاه پودر شده را به داخل بالن ژوژه دستگاه کلونجر ریخته و به آن ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد، سپس جریان آب سرد مبرد برقرار شد و بالن ژوژه درون هیتر برقی قرار گرفت. دستگاه را روشن کرده و پس از آن اجازه داده شد به مدت چهارساعت فرایند تقطیر انجام شود. جهت تهیه اسانس کاکوتی، گیاه خشک شده را با دستگاه خردکن، آسیاب کرده، سپس روغن اسانس به روش تقطیر با آب در دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت استخراج و جمع آوری شد. نسبت اسانس به وزن خشک گیاه w/w ۰/۵درصد اندازه گیری شد. اسانس‌ها در شیشه‌های دربسته در یخچال برای استفاده نگهداری شد.

آنالیز اسانس‌ها: جهت آنالیز و شناسایی ترکیبات اسانس‌ها از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS) ساخت کشور آمریکا مدل Aglient Technologies 7890A استفاده شد. اسانس‌ها در شرایط مشابه و یکسان به دستگاه تزریق شد تا نوع ترکیب‌های تشکیل دهنده آن‌ها مشخص شود (کل زمان اجرایی دستگاه ۶۰ دقیقه). پس از انجام تزریقات و به دست آوردن کروماتوگرام، شناسایی و تعیین مقدار هریک از ترکیبات با استفاده از طیف جرمی آن‌ها انجام شد. تعیین نوع ماده ورودی به طیف سنج جرمی بر اساس داده‌های کتابخانه‌ای وایلی و همچنین مطابق استاندارد ملی ایران با شماره ۵۶۹۳ تعیین گردید (۱۵، ۱۴).

تهیه و آماده سازی باکتری: برای آماده سازی باکتری*آئرومونـاس هیدروفیلا* در شرایط استریل و با استفاده از آنس استریل از سویه مرجع برداشته و بر روی پلیت حاوی محیط Sheep Blood Agar + ۳۰میلی گرم آمپی سیلین کشت داده شد. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. جهت تهیه سوسپانسون باکتری از کلنی‌های حاصل از کشت ۲۴ ساعته توسط آنس استریل برداشته شد و به لوله‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر Brain Heart Infusion Brothاستریل انتقال داده شد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای رسیدن به فاز لگاریتمی گرمخانه گذاری گردید. برای تنظیم تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر از دستگاه اسپکتروفتومتر از طریق کدورت سنجی برابر با ۰/۵ مک فارلند استفاده شد (میزان جذب نوری برابر با ۰/۱۳۳ تا ۰/۰۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) و تعداد تقریبی^{8}۱۰× ۱/۵ باکتری در هر میلی‌لیتر به دست آمد (۱۶).

آماده سازی نانوامولسیون اسانس‌ها: در این مرحله اسانس‌های آویشن شیرازی و کاکوتی (۰/۵٪) در آب مقطر استریل حاوی توئین۸۰ (۲٪) که به عنوان امولسیفایر استفاده شد، حل شدند. برای رسیدن به یک امولسیون پایدار، یکنواخت و شفاف عمل هم زدن هم به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد سپس فرموله شدن امولسیون اسانس‌ها مطابق با پروتکل‌های پیشنهادی گوش و همکاران(۲۰۱۳) انجام شد. پس از آن امولسیون‌ها در اولتراتوراکس به مدت ۳ دقیقه در دور ۳۰۰۰ قرار گرفتند و به مدت۶ دقیقه هم تحت اولتراسوند (200 W HF-power، شرکت Bandelin آلمان) قرار گرفتند. اندازه‌گیری سایز ذرات هم با دستگاه Dynamic light scattering(DLS) انجام شد (۱۷).

تعیین MIC و MBC مقایسه‌ای: جهت انجام میکرودایلوشن از هر اسانس ۰/۰۳۲ میلی‌گرم وزن شد و در ۱ میلی‌لیترDimethyl Sulfoxide حل گردید که غلظت ۳۲ mg/ml اسانس ایجاد شد. از غلظت mg/ml۳۲ اسانس ۰/۵ میلی‌لیتر برداشته و درون یک میکروتیوب استریل حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر BHI براث استریل ریخته شد که غلظت mg/ml۱۶ اسانس ایجاد گردید. رقت سازی تا رسیدن به غلظت ۰/۱۲۵ mg/ml اسانس انجام شد. در این روش قبل از هر رقت سازی میکروتیوب حاوی اسانس ورتکس گردید (۱۸). سپس در ۳ تکرار برای یک سویه باکتری، در میکروپلیت ۹۶ خانه ای (استریل) میکرودایلوشن انجام شد، به این صورت که درون هر چاهک میکروپلیت ۱۶۰ میکرولیتر محیط کشت BHI براث استریل، ۲۰ میکرولیتر از باکتری *آئرومونـاس هیدروفیلا* با میزان ^{7}۱۰×۱/۵CFU/ml و۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس ریخته شد تا به حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر رسید. میکروپلیت دارای ۸ ردیف می‌باشد که در هر ردیف از غلظت‌های مختلف اسانس از رقت‌های ۳۲ mg/ml تا ۰/۱۲۵ mg/ml استفاده شد. چند دقیقه خیلی آرام به صورت هشت روی سطح صاف میکروپلیت تکان داده شد و سپس به مدت

۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه گرمخانه‌گذاری شدند (۱۹). در این روش ۲ گروه کنترل نیز در نظر گرفته شد که عبارتند از: ۱-۱۸۰ میکرولیتر BHI Broth استریل و ۲۰ میکرولیتر از باکتری درون چاهک‌های میکروپلیت اضافه گردید (کنترل مثبت). ۲- ۱۸۰ میکرولیتر BHI Broth استریل و ۲۰ میکرولیتر اسانس درون چاهک‌های میکروپلیت اضافه گردید (کنترل منفی). چاهک های واجدکدورت از لحاظ رشد مثبت تلقی شدند. در نهایت مقدار MIC به‌صورت چشمی و مشاهده کدورت، بر اساس کمترین غلظت اسانس که رشد باکتری درآن دیده نشد، تعیین گردید (۲۰). از کلیه چاهک‌های بالاتر و فاقد کدورت درمیکروپلیت ۹۶خانه ای نیز،۱۰میکرولیتر توسط سمپلربرداشته شد و در پلیت حاوی محیط کشت BHI آگار کشت داده شد. سپس درگرمخانه ۲۵ درجه به مدت۲۴ساعت نگهداری و بررسی گردید. کمترین غلظت اسانس که با فرم تشکیل پرگنه در پلیت‌ها همراه نبود به عنوان MBC در نظر گرفته شد (۲۱).

تهیه نمونه‌های گوشت ماهی و تلقیح باکتری‌ها: گوشت تازه ماهی سالمون با نام علمی (*Oncorhynchus mykiss*) از بازار ماهی فروشان آمل خریداری شد.ماهی در یونولیت‌های حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل و نسبت به آماده سازی آن اقدام شد. سپس قطعات ۱۰ گرمی از فیله ماهی به عنوان نمونه تهیه و جهت استریل کردن از الکل ۷۰ درجه به مدت ۵-۳ دقیقه استفاده شد. ۱۰۰ ماکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی مورد نظر روی نمونه‌های ۱۰ گرمی فیله ماهی به صورت سطحی تلقیح و با میله L شکل پخش شد (غلظت نهایی $۱/۵\times۱۰^{۶}$). پس از تلقیح باکتری بر روی قطعات گوشت ماهی، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه جهت تثبیت باکتری روی نمونه‌ها حفظ شدند (۲۰، ۱۶).

تهیه پوشش نانوامولسیون کیتوزان حاوی اسانس‌های آویشن شیرازی و کاکوتی

تهیه محلول کیتوزان: برای آماده سازی محلول کیتوزان (w/w) ۲ درصد در اسید استیک، کیتوزان را در محلول آبی اسید استیک ۱ درصد مخلوط کرده و برای ۱۰ دقیقه هم زده شد.پس از حل شدن کامل کیتوزان، PH محلول را با محلول سود ۱ نرمال به ۵/۹ رسانده و در نهایت ۲ میلی‌لیتر توین ۸۰ به یک لیتر محلول ساخته شده اضافه شد (۹، ۸). محلول نانوامولسیون با استفاده از روش اولتراسوند با انرژی بالا تهیه شد. به این منظور پس از آماده سازی محلول کیتوزان۲٪، با استفاده از دستگاه اولتراتوراکس به مدت ۳ دقیقه و استفاده از دستگاه اولتراسوند (200 W HF-power، شرکت Bandelin آلمان) به مدت ۶ دقیقه نانوامولسیون تهیه شد و نانوامولسیون تولید شده مخلوطی از اسانس‌های آویشن شیرازی و کاکوتی ۰/۵ ٪، توئین۸۰ و محلول پوشش کیتوزان می‌باشد و سپس سایز ذرات و Poly Dispersity Index با استفاده از دستگاه اندازه گیری سایز ذرات DLS (Nano، شرکت Malven انگلستان) بررسی شد (۲۳، ۲۲).

تهیه تیمارهای مورد مطالعه: نمونه‌های تلقیح شده به شش گروه تقسیم شدند (جدول ۱) و سپس تحت تیمار قرار گرفتند. به منظور ایجاد پوشش نمونه‌ها به مدت ۱ دقیقه در محلول تهیه شده غوطه ور شدند. سپس فیله‌ها را از محلول خارج کرده و پس از اتمام چکیدن قطرات در زیپ پک‌های استریل به مدت ۱۲ روز در دمای یخچال ۱±۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سرانجام، تحلیل در روزهای ۰، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۲ انجام شد (۲۴، ۹).

جدول ۱. تیمارهای مورد مطالعه در طول دوره نگهداری در دمای یخچال

	تیمارها	شرح
۱	کنترل	قطعات گوشت ماهی بدون پوشش کیتوزان
۲	کیتوزان	قطعات گوشت ماهی+ پوشش کیتوزان۲٪
۳	نانوکیتوزان	قطعات گوشت ماهی+ پوشش نانوامولسیون کیتوزان ۲٪
۴	نانوکیتوزان+اسانس آویشن شیرازی	قطعات گوشت ماهی+ پوشش نانوامولسیون کیتوزان ۲٪ +اسانس آویشن شیرازی ۰/۵٪
۵	نانوکیتوزان+اسانس کاکوتی	قطعات گوشت ماهی+ پوشش نانوامولسیون کیتوزان ۲٪ +اسانس کاکوتی۰/۵درصد
۶	نانوکیتوزان+اسانس آویشن شیرازی+اسانس کاکوتی	قطعات گوشت ماهی+ پوشش نانوامولسیون کیتوزان ۲٪ +اسانس آویشن شیرازی ۰/۵٪ و اسانس کاکوتی ۰/۵٪

شمارش باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*: نمونه‌های مربوط به هر تیمار (در سه تکرار) در روزهای صفر (بلافاصله پس از تلقیح)، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۲ از یخچال خارج شدند. ابتدا نمونه‌های درون زیپ پک با ۹۰ میلی‌لیتر پپتون واتر استریل مخلوط گردید و در دستگاه بگ میکسر با دور ۷ به مدت ۳ دقیقه قرار داده شد تا سوسپانسیون همگنی به دست آید (رقت 10^{-1}). مقدار ۱ میلی‌لیتر از سطح رویی سوسپانسیون به کمک سمپلر برداشته و درون لوله آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر پپتون واتر استریل ریخته شد تا رقت 10^{-2} به دست آمد. پس از رقت سازی متوالی از رقت‌های مورد نظر به روش کشت قطره ای در محیط کشت*آئروموناس هیدروفیلا*کشت داده و پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد شمارش میکروبی انجام گرفت (۲۵، ۱۳، ۹).

آنالیز آماری: میانگین، انحراف معیار، کمترین و بیشترین تعداد شمارش باکتری در هر گروه و در هریک از روزهای مطالعه گزارش شد. روند تغییرات لگاریتم تعداد باکتری در گروه‌های مختلف در دوره ۱۲ روزه توسط آزمون آماری Repeated measure ANOVA مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. مقایسه دو به دوی گروه‌ها توسط Bonferroni post hoc test انجام شد. کلیه آنالیزهای آماری توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد و مقادیر $P<0/05$ معنی‌دار تلقی گردید.

• یافته‌ها

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود کارواکرول با ۴۴/۳۶ درصد، تیمول با ۳۰/۱۴ درصد و گاماترپینن با ۸/۳۱ درصد به ترتیب مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه آویشن شیرازی را تشکیل می‌دهند. در جدول ۳ نیز مشاهده می‌شود مهمترین ترکیب شیمیایی اسانس گیاه کاکوتی پولگون با ۴۸/۱۹ درصد می‌باشد و در اسانس این گیاه ترکیبات مهم دیگری مانند ۱،۸-سینئول با ۱۱/۲۰ درصد و ایزومنتول با ۶/۱۴ درصد و پی-سیمن با ۶/۱۴ درصد وجود دارد.

در این مطالعه اندازه گیری سایز ذرات و PDI مربوط به تیمارهای مختلف به کمک دستگاه DLS انجام شد که جزئیات آن در جدول ۴ مشاهده می‌شود. میانگین سایز ذرات در کلیه تیمارها کمتر از ۵۰۰ نانومتر بوده و کمترین میانگین سایز، مربوط به تیمار نانومولسیون کیتوزان حاوی اسانس‌های آویشن شیرازی و کاکوتی (شکل۱) و بیشترین میانگین سایز مربوط به تیمار کیتوزان (غیرنانو) بود.

جدول۲. نتایج آنالیز اسانس آویشن شیرازی مورد مطالعه با استفاده از روش GC/MS

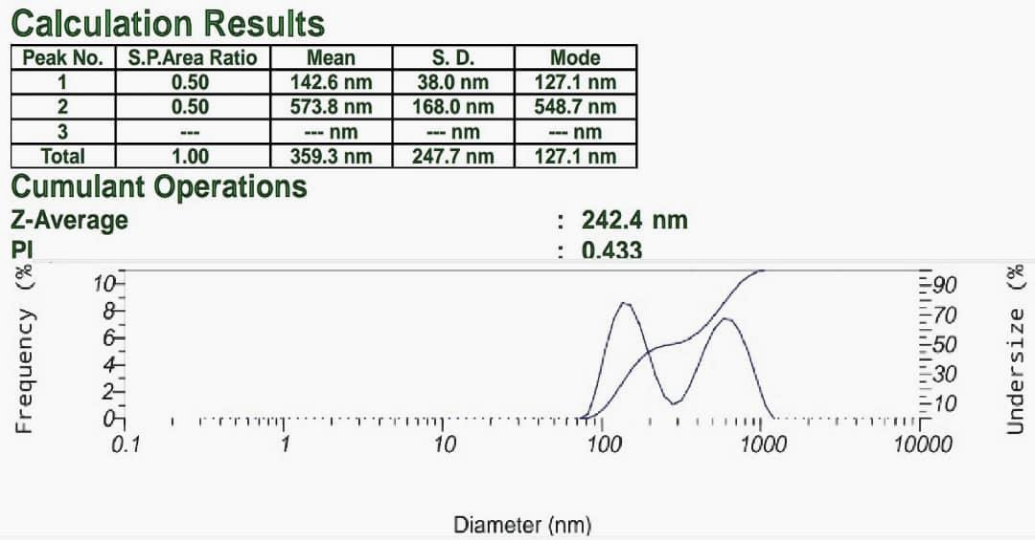
شماره	ترکیبات	درصد نسبی ترکیبات
۱	تیمول	۳۰/۱۴
۲	والنسین	۱/۶۲
۳	گاما ترپینن	۸/۳۱
۴	کارواکرول	۴۴/۳۶
۵	آلفا ترپینئول	۰/۴۷
۶	بورنی استات	۰/۴۸
۷	آلفا پینن	۲/۱۶
۸	بورنل	۱/۱۱
۹	پی-سیمن	۶/۳۸
۱۰	کاریوفیلن اکسید	۱/۶
جمع	-	٪۹۶/۶۳

جدول ۳. نتایج آنالیز اسانس کاکوتی مورد مطالعه با استفاده از روش GC/MS

شماره	ترکیبات	درصد نسبی ترکیبات
۱	کارواکرول	۳/۱۳
۲	آلفا-پینن	۴/۲۱
۳	پیپریتنون	۱/۲۵
۴	پولگون	۴۸/۱۹
۵	بتا-پینن	۰/۶۵
۶	پیپریتون	۲/۸۶
۷	میرسن	۰/۸۸
۸	لیمونن	۲/۳۵
۹	پی-سیمن	۶/۱۴
۱۰	منتون	۲/۷۴
۱۱	۱،۸-سینوئل	۱۱/۲۰
۱۲	۱-اُکتن-۳-اُل	۰/۳۹
۱۳	ایزومنتول	۰/۹۴
۱۴	پی-منتول-۳-اِن-۸-اُل	۱/۴۸
۱۵	۳-اُکتانول	۱/۰۱
۱۶	ایزومنتون	۶/۱۴
۱۷	گاما-ترپینن	۱/۲۳
جمع	-	٪۹۴/ ۷۹

جدول ۴. سایز ذرات و PDI مربوط به تیمارهای مختلف مورد مطالعه

گروه ها	z-average (d.nm)	PDI
کیتوزان ۲٪	۳۱۵۹	۰/۲۵۴
نانوکیتوزان ۲٪	۴۷۰/۱	۰/۲۹۶
نانوکیتوزان+آویشن شیرازی	۴۱۲/۹	۰/۳۶۵
نانوکیتوزان+ کاکوتی	۴۶۱/۲	۰/۵۰۱
نانوکیتوزان+کاکوتی+آویشن شیرازی	۲۴۲/۴	۰/۴۳۳



شکل۱. سایز ذرات تیمار نانوامولسیون کیتوزان حاوی اسانس‌های آویشن شیرازی و کاکوتی

نتایج فعالیت ضد باکتریایی اسانس آویشن شیرازی در جدول ۵ مشاهده می‌شود، مقادیر MIC و MBC در نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی بسیار پایین‌تر از امولسیون آویشن شیرازی است که این می‌تواند نشان دهنده تأثیر سایز ذرات در افزایش فعالیت ضد میکروبی نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی باشد. نتایج فعالیت اسانس کاکوتی علیه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* نیز در جدول ۵ مشاهده می‌شود که مقادیر MIC و MBC در نانوامولسیون اسانس کاکوتی نیز پایین تر از امولسیون کاکوتی است و مقدارMIC اسانس کاکوتی و آویشن شیرازی یکسان است اما مقدار MBC اسانس آویشن شیرازی کمتر از اسانس کاکوتی است و در مقایسه MIC و MBC نانوامولسیون اسانس‌ها مشاهده شد که این مقادیر برای نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی کمتراز نانوامولسیون اسانس کاکوتی است.

در جدول ۶ تأثیر تیمارهای مختلف بر روی رشد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* طی دوره مطالعه نشان داده شده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تعداد باکتری*آئروموناس هیدروفیلا* در نمونه کنترل طی دوره نگهداری ۱۲ روزه در دمای یخچال تا ۸/۷۴ log CFU/g افزایش پیدا کرده است و لگاریتم آن بعد از تلقیح (روز صفر) از ۶/۱۴ به ۸/۷۴ در روز ۱۲ افزایش پیدا کرد که به دلیل سایکروتروف بودن این باکتری می‌باشد. رشد باکتری در تمامی گروه‌های مورد مطالعه (۱۲روزه) نسبت به گروه فاقد پوشش کاهش یافت. به طور کلی در این مطالعه حداکثر و حداقل تعداد باکتری شمارش شده در روز دوازدهم، به ترتیب در نمونه‌های فاقد پوشش (۸/۷۴±۰/۰۷log CFU/g) و نمونه‌های نانوامولسیون کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی و کاکوتی (۰/۱ ± log CFU/g ۴/۴۸) مشاهده شد.

جدول ۷ که بیانگر میانگین کاهش تعداد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* (به صورت مقایسه دو به دو گروه ها) در تیمارهای مختلف است، نشان می‌دهد بیشترین میزان کاهش در مقایسه با تیمار کنترل مربوط به تیمار نانو امولسیون کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی و کاکوتی و پس از آن مربوط به تیمار نانوامولسیون کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی بود.

جدول ۵. MIC و MBC اسانس و نانوامولسیون اسانس‌های آویشن شیرازی و کاکوتی علیه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*

	MIC(mg/ml)	MBC(mg/ml)
اسانس آویشن شیرازی	۴	۴
اسانس کاکوتی	۴	۸
نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی	۱	۲
نانوامولسیون اسانس کاکوتی	۲	۴

جدول ۶. تغییرات تعداد باکتری در نمونه‌های تلقیح شده با باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در طول ۱۲ روزه

روز	کنترل	کیتوزان	نانوامولسیون کیتوزان	نانوامولسیون کیتوزان+اسانس آویشن شیرازی	نانوامولسیون کیتوزان+اسانس کاکوتی	نانوامولسیون کیتوزان+اسانس آویشن شیرازی+ اسانس کاکوتی
۰	۶/۱۴±۰/۱۴	۶/۵۴±۰/۱۹	۶/۳۸±۰/۱۶	۶/۴۶±۰/۱۴	۶/۴۵±۰/۱۵	۶/۵±۰/۰۹
۱	۶/۷۴±۰/۰۵	۶/۴۴±۰/۲۵	۶/۰۸±۰/۱۵	۶/۳۲±۰/۲۴	۵/۰۷±۰/۲۴	۵/۸۹±۰/۱۸
۲	۶/۹۸±۰/۱۹	۶/۳۱±۰/۲۵	۵/۸۰±۰/۰۹	۵/۶۰±۰/۰۷	۵/۶۹±۰/۱۲	۵/۵۲±۰/۰۷
۴	۷/۶۴±۰/۰۵	۶/۲۶±۰/۲۹	۵/۵۸±۰/۰۸	۵/۳۸±۰/۰۹	۵/۴۳±۰/۰۹	۵/۲۷±۰/۰۶
۸	۸/۲۲±۰/۱۷	۵/۸۳±۰/۱۳	۵/۲۴±۰/۱۱	۵/۱۹±۰/۱۲	۵/۲۹±۰/۰۷	۴/۹۸±۰/۱۷
۱۲	۸/۷۴±۰/۰۷	۵/۶۵±۰/۱	۵/۱۵±۰/۱۲	۴/۸۰±۰/۰۴	۴/۹۸±۰/۰۸	۴/۴۸±۰/۱

جدول ۷. اختلاف میانگین کاهش لگاریتم تعداد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

اختلاف میانگین I-J	گروه (J)	کیتوزان۲ درصد	نانو کیتوزان	نانو کیتوزان+ کاکوتی	نانو کیتوزان+ آویشن شیرازی	نانوکیتوزان+ کاکوتی+ آویشن شیرازی
گروه(I)						
کنترل		*۱/۳۱	*۱/۷۶	*۱/۸۱	*۲/۸۴	*۲/۰۲
کیتوزان۲ درصد			*۰/۴۵	*۰/۵۰	*۰/۵۳	*۰/۷۱
نانو کیتوزان				*۰/۰۵	*۰/۰۸	*۰/۲۶
نانو کیتوزان+ کاکوتی					*۰/۰۶	*۰/۲۱
نانوکیتوزان+آویشن شیرازی						*۰/۱۸

*نشان دهنده معنا دار بودن اختلاف میانگین می باشد.

• بحث

استفاده از پوشش نانوامولسیون کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی و کاکوتی، سبب کاهش تعداد باکتری سرماگرای *آئروموناس هیدروفیلا* ماهی سالمون نگهداری شده در یخچال گردید. این نتیجه به ویژه در ترکیب دو اسانس مشهود بود. اثر بیان‌شده در مطالب فوق برای اسانس‌های مختلف بر روی میکروارگانیسم‌ها می‌تواند به دلیل وجود ترکیبات فنولیک مثل کارواکرول، تیمول و پولگون و ... باشد که موجب نابودی و یا کنترل رشد باکتری‌های آسیب رسان همچون *آئروموناس هیدروفیلا* می‌شود. از طرفی نتایج نشان داد استفاده از فناوری نانو در تهیه پوشش‌های خوراکی که حاوی ترکیبات ضد میکروبی طبیعی هستند می‌تواند به طور مؤثرتری موجب افزایش ماندگاری مواد غذایی به خصوص فرآورده‌های دریایی شود.

نتایج آنالیز اسانس‌ها توسط دستگاه کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی در جداول ۲ و ۳ آمده است که باتوجه به این جداول ترکیب عمده اسانس آویشن شیرازی را کارواکرول و تیمول و ترکیب عمده اسانس کاکوتی را پولگون تشکیل می‌دهد. مطالعات مختلفی بر روی ترکیبات و اثرات مختلف گیاه آویشن شیرازی و کاکوتی در شرایط آزمایشگاهی، توسط محققان انجام‌شده است که با نتایج گزارش شده در این بررسی مطابقت نزدیک دارند.

مهربان و همکاران (۲۰۰۸) طرح استخراج وشناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس زیرگونه‌های مختلف گیاه (*Ziziphora clinopodioides Lam.*) در رویشگاه‌های مختلف

در ایران را مورد مطالعه قرار داده و نشان دادند که ترکیب اصلی این گیاه در اکثر مناطق کشور پولگون بوده و ۴۰ تا ۴۵ درصد از اسانس حاصل را تشکیل می‌دهد (۲۶).

Eliza و همکاران (۲۰۱۳) اسانس آویشن شیرازی به دلیل فعالیت ضد باکتریایی قوی(قوی‌تر از اسانس‌های دارچین، میخک و یا پونه کوهی) انتخاب شد. مطالعات نشان می‌دهد که MIC پایین این اسانس‌ها علیه پاتوژن‌های مواد غذایی به علت نسبت بالایی از کارواکرول در اسانس آویشن شیرازی است که این ترکیب موجب بی‌ثباتی غشاء میکروبی می‌شود (۲۷).

Govaris و همکاران (۲۰۱۱) آنالیزترکیبی اسانس آویشن و پونه کوهی نشان دادکه فنل غالب هر دو اسانس کارواکرول وتیمول است (۲۸).

چیست ساز و همکاران (۲۰۰۵)، دو گونه گیاه کاکوتی (*Z.taurica* و*Z.clinopodioide*) را مورد بررسی و شناسایی قرار داد و به ترتیب ۱۸ و ۳۳ ترکیب در اسانس آن‌ها شناسایی نمود که بیشترین ترکیبات شناسایی‌شده پولگون و منتون بود (۲۹).

در این مطالعه اندازه گیری سایز ذرات به کمک دستگاه DLS انجام شد که میانگین سایز ذرات در کلیه تیمارها کمتر از ۵۰۰ نانومتر بود. Hatanaka و همکاران (۲۰۱۰) و همچنین Severino و همکاران (۲۰۱۵)، در بررسی اندازه‌گیری سایز ذرات نیز در مطالعاتشان محدوه کمتر از ۵۰۰ نانومتر را به عنوان نانو در نظر گرفتند (۱۱، ۱۰).

در آزمایش تعیین MIC و MBC که نشان‌دهنده‌ی حداقل غلظت اسانس‌ها و نانوامولسیون اسانس‌های آویشن شیرازی و کاکوتی جهت مهاررشد یا نابودی باکتری*آئروموناس هیدروفیلا* می‌باشد MIC وMBC پایین نانوامولسیون اسانس‌ها در مقایسه با اسانس‌ها می‌تواند نشان دهنده تأثیر سایز ذرات در افزایش فعالیت ضدمیکروبی نانوامولسیون اسانس‌ها باشد. نتایج حاضر با مطالعه گهرویی و همکاران در مورد حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) و میکروب کشی (MBC) عصاره آویشن شیرازی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و مطالعه مهربان و همکاران در مورد حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و میکروب کشی (MBC) عصاره کاکوتی کوهی برای باکتری‌های گرم منفی، مطابقت دارد (۳۰، ۲۶).

باتوجه به اینکه اثر ۶ تیمار مختلف بر روی باکتری*آئروموناس هیدروفیلا* بررسی شد، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تعداد باکتری*آئروموناس هیدروفیلا* در نمونه کنترل طی دوره نگهداری ۱۲ روزه در دمای یخچال افزایش یافت که به دلیل سایکروتروف بودن این باکتری می‌باشد ولی رشد باکتری در تمام گروه‌های مورد مطالعه کمتر از گروه کنترل بود . محققان بسیاری نظیر Severino و همکاران (۲۰۱۵) که اثر ضد میکروبی پوشش کیتوزان حاوی نانوامولسیون اسانس راعلیه باکتری*اشریشیا کلی* O157:H7 در لوبیا سبز مورد بررسی قرار دادند، مشخص کردند که پوشش کیتوزان به تنهایی و همراه با اسانس، اثر ضدمیکروبی دارد (۱۱).

خانزادی و همکاران (۲۰۱۹) که اثر ضد میکروبی تیمار کیتوزان و تیمار نانوامولسیون کیتوزان را به صورت مقایسه‌ای بر روی رشد باکتری*اشریشیا کلی* $O_{157}:H_7$مورد ارزیابی قرار دادند، متوجه اثر ضد میکروبی بهتر تیمار نانوامولسیون کیتوزان شدند (۳۱).

مهربان و همکاران (۲۰۰۸) اثرضدمیکروبی عصاره کاکوتی کوهی بر باکتری‌های مولد فساد و بیماری‌زای موادغذایی را مطالعه نموده و نشان دادند عصاره کاکوتی کوهی بر باکتری‌های گرم منفی وگرم مثبت اثر مهارکنندگی و ضد میکروبی دارد (۲۶).

گهروئی و همکاران (۲۰۱۷) اثرات ضد میکروبی فرم نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی افزوده شده به مواد بسته‌بندی مبتنی بر مواد پلیمری را بررسی کردند و نتایج آن‌ها مشخص نمود که با کاهش سایز ذرات نانو امولسیون، اثرات ضد میکروبی اسانس افزایش می‌یابد و با نتایج تیمار نانوامولسیون کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی که موجب کاهش تعداد باکتری پاتوژن *آئروموناس هیدروفیلا* شد مطابقت دارد (۳۰).

با توجه به مقایسه دو به دو گروه‌ها مشخص شد که بیشترین میزان کاهش رشد باکتری مربوط به تیمار استفاده همزمان از اسانس‌ها و پس از آن تیمار نانوامولسیون کیتوزان حاوی اسانس شیرازی بود که با نتایج عروجعلیان و همکاران(۲۰۱۰) مطابقت دارد که آن‌ها به بررسی اثر ضد باکتریایی و خاصیت سینرژیستی اسانس سه گیاه دارویی علیه برخی از پاتوژن‌های مهم مواد غذایی به روش میکرودایلوشن پرداختند و در مجموع نتایج این تحقیق نشان دادکه کاربرد همزمان این دو اسانس به ویژه علیه باکتری‌های گرم منفی دارای اثرهای بازدارنده قابل توجه بوده است (۳۲).

سپاسگزاری: بدینوسیله از حمایت مالی دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل در انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را دارم.

References

1. Cagri A, Ustunol Z, Ryser ET. Antimicrobial edible films and coatings. Journal of Food Protection. 2004;67(4): 833-848.
2. Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2003;43(1): 89-143 24.
3. Simopolos AP. Evolutionary aspects of omega_3 fatty acids in The food suply. Prostaglandis Leukot Essent Fatty Acids.1999; 60: 421-429
4. Fan W, Sun J, Chen Y, Qiu J, Zhang Y, Chi Y. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. Food Chemistry. 2009;115(1): 66-70.
5. Peniche C, Argüelles-Monal W, Goycoolea FM. Chitin and chitosan: major sources, properties and applications. Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources. 2008: 517-542.
6. Sathivel S, Liu Q, Huang J, Prinyawiwatkul W. The influence of chitosan glazing on the quality of skinless pink salmon. 2007.
7. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int J Food Microbiol. 2004; 94(3): 223-53.
8. Azizian A, Khanzadi S, Hashemi M, Azizzadeh M. Inhibitory Effect of Nano-gel/Emulsion of Chitosan Coating Incorporated with *ZiziphoraClinopodioides*Essential Oil and Nisin on *Escherichia Coli* O157: H7 Inoculated in Beef at Cold Storage Condition. Journal of Nutrition, Fasting and Health. 2019; 7(2): 103-109.
9. Kazemeini H, Azizian A, Shahavi MH. Effect of Chitosan Nano-Gel/Emulsion Containing BuniumPersicum Essential Oil and Nisin as an Edible Biodegradable Coating on *Escherichia Coli* O157: H7 in Rainbow Trout Fillet. Journal of Waterand Environmental Nanotechnology. 2019; *4*(4): 343-349.
10. Hatanaka J, Chikamori H, Sato H, Uchida S, Debari K, Onoue S, Yamada S. Physicochemical and pharmacological characterization of α-tocopherol-loaded nano-emulsion system. International Journal of Pharmaceutics. 2010; 396(1-2): 188-193.
11. Severino R, Ferrari G, Vu KD, Donsì F, Salmieri S, Lacroix, M. Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against *Escherichia coli* O157: H7 and Salmonella Typhimurium on green beans. Food Control. 2015; 50: 215-222.
12. Asadi GH, Hosseini SE, Mogadam AD. Nanotechnology and the future of food science, Congress of Innovation in Traditional Foods (INTRADFOOD) Congress Proceedings, UNIVERSIDAD POLITECNICA DEOzturk S, Ercisli S. Antibacterial activity and chemical constitutions of *Ziziphoraclinopodioides*. Food Control. 2005;18(5): 535-540.
13. Yogananth N, Bhakyaraj R, Chanthuru A, Anbalagan T, Nila KM. Detection of virulence gene in *Aeromonashydrophila* isolated from fish samples using PCR technique. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry. 2009; 4: 51-53.
14. Shibamoto, T. 1987. Retention indices in essential oil analysis: 259-274. In: Sndra, P. and Bicchi, C., (Eds.). Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis. Verlagsgruppe Huthig Jehle Rehm GmbH, New York. 435 pp.
15. Zangiabadi M, Sahari MA, Barzegar M, NaghdiBadi H. *Zatariamultiflora* and Buniumpersicum essential oils as two natural antioxidants. Journal of MedicinalPlants. 2012; 1(41): 8-21.
16. Rabiey S, Hosseini H, Rezaei, M. The hurdle effect of Buniumpersicum essential oil, smoke and NaCl for controlling the *Listeria monocytogenes* growth in fish modelsystems. Journal of Food Safety. 2013; 33(2): 137-44.
17. Ghosh V, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Ultrasonic Emulsification of Food-Grade Nanoemulsion Formulation and Evaluation of its Bactericidal Activity. Ultrasonic Sonochemistry. 2013; 20(1): 338-44.
18. Sharifi F. Effect of Sodium Alginate Containing Lactoperoxidase and *zatariamultiflora* essential oiles on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 inoculated on rainbow trout fillet. mashhad, iran: ferdowsi university of mashhad faculty of veterinary Medicine; 2016.
19. Moshafi MH, Mansouri SH, Sharififar F, Khoshnoodi M. Antibacterial and antioxidant effects of the essential oil and extract of Zataria Multiflora Boiss. Journal of Kerman University of Medical Sciences. 2007;14(1):33-4.
20. Iturriaga L, Olabarrieta I, de Marañón IM. Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeriainnocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. International journal of food microbiology. 2012; 158(1):58-64.
21. Ehsani A, Hashemi M, Naghibi.S, Mohammadi S, Khalili Sadaghiani S. Properties of Bunium Persicum Essential Oil and Its Application in Iranian White Cheese against *Listeria Monocytogenes* and Escherichia Coli. Food Safety. 2016: 36(4):563–70.
22. Fu YZY, Chen L, Shi X, Wang Z, Sun S, et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. Phytotherapy Research. 2007; 21(10):989-94.
23. Rafati H, Moghimi R, Ghaderi L, Aliahmadi A, McClements DJ. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of Thymus daenensis essential oil against E. coli. Food chemistry. 2016; 194:5-410.
24. Zainol M, Abd-Hamid A, Yusof S, Muse R. Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of Centellaasiatica (L.) Urban. Food Chemistry. 2003; 81(4): 81-575.
25. Hao Y, Brackett R, Doyle M. Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonashydrophila* and *Listeriamonocytogenes* in refrigerated, cooked poultry. Food Microbiology. 1998; 15(4):367-78.
26. Mehraban M, Karazhyan R, Beyhaqi B. *Ziziphora* antimicrobial effect of extracts of radish (*Ziziphora*

Clinopodioides) the bacteria causing food spoilage and disease. Journal of Food Science and Technology. 2008; 4 (3): 9-13.

27. Elizaquível P, Azizkhani M, Sánchez G, Aznar, R. Evaluation of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil activity against Escherichia coli O157: H7, Salmonella enterica and *Listeria monocytogenes* by propidium monoazide quantitative PCR in vegetables. Food Control. 2013; 34(2):770-6.

28. Govaris A, Botsoglou E, Sergelidis, D, Chatzopoulou, PS. Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and Escherichia coli O157: H7 in feta cheese packaged under modified atmosphere. LWT-Food Science and Technology.2011; 44(4):1240-4.

29. Chitsaz M, Afsane P, Mohseni, N and Kamalnegad M. Hydroalcoholic extracts and essential oil composition andantibacterial effects Thyme narrow (*Ziziphoraclinopodiodes*) of the bacteria. Journal.2005; 14 (68): 15-22.

30. Gahruie H, Ziaee E, Eskandari MH, Hosseini SM.Characterization of basil seed gum-based edible films incorporated with *zataria multiflora* essential oil nanoemulsion. carbohydrate polymers. 2017;166:93-103.

31. Khanzadi S, Azizian A, Hashemi M, Azizzadeh M. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Emulsion and Nano-emulsion of *Ziziphoraclinopodioides* Essential Oil against *Escherichia Coli* O157:H7. J Hum Environ Health Promot. 2019; 5(2): 94- 7.

32. Oroojalian, F., et al. "Synergistic antibacterial activity of the essential oils from three medicinal plants against some important food-borne pathogens by microdilution method." Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 26.2 2010:133-146.

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

Aghababaei M[1], Kazemeini H.R[2], Shahavi M.H[3]*

1- Graduated MSc Student, Dept. of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

*2-*Corresponding author: Assistant Professor, Dept. of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine , Amol University of Special Modern Technologies , Amol, Iran. Email: hamid.kazemeini@gmail.com*

3- Assistant Prof., Nano Technology Department Faculty of Engineering Modern technologies, , Amol University of Special Modern Technologies , Amol, Iran

Received 1 Sept, 2020 **Accepted 15 Dec, 2020**

Background and Objectives: Foodborne diseases have been the most important human health risks and the present study was carried out to investigate how to decrease these risks. The objectives of this paper were to investigate chemical compositions of *Zataria multiflora* Boiss and *Ziziphora clinopodioides* essential oils in chitosan nanoemulsion coating on growth of *Aeromonas hydrophila* inoculated in salmon fillets within 12 days of storage at cold temperatures (4 °C ±1) and antibacterial activity of the essential oils (emulsion and nanoemulsion) against highlighted bacteria using minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration methods.

Materials & Methods: Chemical composition of the essential oil was assessed using gas chromatography and the treatments were divided into six major groups of no cover (control), chitosan, chitosan nanoemulsion, chitosan nanoemulsion containing 0.5% *Zataria multiflora* Boiss, chitosan nanoemulsion containing 0.5% *Ziziphora clinopodioides* and chitosan nanoemulsion containing *Zataria multiflora* Boiss and *Ziziphora clinopodioides*. Samples were stored in refrigerator for bacterial counting on Days 0, 1, 2, 4, 8 and 12.

Results: Carvacrol (44.36%), thymol (30.14%) and γ-terpinene (8.31%) were identified as the most important compounds in chemical composition of *Zataria multiflora* Boiss essential oil. The most important compound in chemical composition of *Ziziphora clinopodioides* essential oil was pulegone (48.19%). The mean logarithm of the bacterial number within 12 days showed significant differences between the groups ($p < 0.05$). The present study showed that the highest inhibitory effects on the bacteria were in treated samples with chitosan nanoemulsion containing *Zataria multiflora* Boiss and *Ziziphora clinopodioides* essential oils, compared to control group.

Conclusion: Results of this study have shown that nanoemulsion of chitosan edible coating is effectively capable of inhibiting growth of *Aeromonas hydrophila* in salmon fillets at cold temperatures. Furthermore, the nanoemultion can be used in food industries.

Keywords: Nanotechnology, Chitosan, Essential oil, *Aeromonas hydrophila*, Seafood