Food Hygiene, Vol. 14, No. 55, Autumn 2024

"Research article" **DOI: 10.71876/jfh.2024.1104954**

Investigating the potential of combined use of plant essential oil and biotechnological product of *Lactococcus lactis* for inhibiting *Listeria monocytogenes* in minced fish meat

Hadian, R., Bahram, S.*

Department of Fisheries Science, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran
*Corresponding author: bahramsomi@gmail.com
(Received: 2024/5/19 Accepted: 2024/9/29)

Abstract

The main objective of this research was to investigate the potential of combining fennel essential oil and biotechnological products derived from *Lactococcus lactis* to control the pathogen *Listeria monocytogenes* in minced fish meat. Minced fish samples were inoculated with *L. monocytogenes* at a concentration of 10^4 CFU/g, and then divided into four treatment groups: (1) control group, (2) group containing *L. lactis* (1×10^4 CFU/g), (3) group containing fennel essential oil (0.9%), and (4) group containing a combination of fennel essential oil and *L. lactis*. The treatment groups were packaged and subjected to microbial evaluation (total count, psychrotrophic bacteria) and enumeration of *L. monocytogenes*, as well as sensory analysis (odor, color, texture, and overall acceptability) on days 0, 4, 8, 12, and 16. The results demonstrated that the groups treated with fennel essential oil and *L. lactis* effectively controlled the increase in microbial counts ($p < 0.05$). Notably, the combination of fennel essential oil and *L. lactis* resulted in a more significant reduction in the growth of total bacteria, psychrotrophic bacteria, and *L. monocytogenes* compared to the other treatments. The highest sensory scores were also recorded in the combined treatment group at the end of the storage period. In conclusion, the results of this study suggest that the combination of fennel essential oil and *L. lactis* is an effective strategy for controlling *L. monocytogenes* in minced fish and improving its microbial quality.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, Minced fish meat, Plant essential oil, Biological preservation

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.71876/jfh.2024.1104954

بررسی پتانسیل استفاده ترکیبی از اسانس گیاهی و فرآورده بیوتکنولوژیک باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* جهت مهار *لیستریا مونوسیتوژنز* در گوشت چرخ شده ماهی

بسته‌بندی ماهی توسط اسانس گیاهی و پروبیوتیک

رضا هادیان، سمیه بهرام*

گروه شیلات، واحد قائمشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائمشهر، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: bahramsomi@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۲/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۷/۸)

چکیده

هدف اصلی این تحقیق بررسی پتانسیل استفاده ترکیبی از اسانس گیاه رازیانه و فرآورده‌های بیوتکنولوژیک باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس*به‌منظور مهار پاتوژن *لیستریا مونوسیتوژنز* در گوشت چرخ شده ماهی است. در این تحقیق، نمونه‌های گوشت چرخ شده ماهی با باکتری لیستریا مونوسیتوژنز به میزان 1×10^4 CFU/g تلقیح شدند سپس نمونه‌های گوشت چرخ شده تلقیح شده به چهار گروه تیمار شاهد، تیمار حاوی *لاکتوکوکوس لاکتیس* (1×10^4 CFU/g)، تیمار حاوی اسانس رازیانه (۰/۹٪) و تیمار ترکیبی اسانس و باکتری پروبیوتیک تقسیم شد. سپس تیمارهای بسته‌بندی شده مورد ارزیابی میکروبی (شمارش کلی، باکتری سرمادوست) و شمارش باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* و ارزیابی حسی (بو، رنگ، بافت و پذیرش کلی) در روزهای ۰، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تیمارهای حاوی اسانس و *لاکتوکوکوس لاکتیس* قادر به کنترل افزایش پارامترهای میکروبی بودند ($P<0/05$) و استفاده از ترکیب اسانس رازیانه و *لاکتوکوکوس لاکتیس* منجر به کاهش رشد مؤثرتر باکتری‌های کلی، سرمادوست و *لیستریا مونوسیتوژنز* نسبت به سایر تیمارها شد. در انتهای دوره نگهداری بالاترین امتیاز حسی نیز در تیمار ترکیبی مشاهده شد. بنابراین، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که استفاده از ترکیب اسانس رازیانه و باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* می‌تواند به‌عنوان یک روش مؤثر برای مهار *لیستریا مونوسیتوژنز* در گوشت ماهی چرخ شده و بهبود کیفیت میکروبی آن، مورداستفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: *لیستریا مونوسیتوژنز*، گوشت چرخ شده ماهی، اسانس گیاهی، نگهداری بیولوژیکی

مقدمه

ماهیان منبع مهمی از اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه و متعلق به خانواده امگا ۳ ازجملهایکوزاپنتانوئیک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید می‌باشند. این اسیدها نقش مهمی در رشد و توسعه شبکیه چشم و سلول‌های مغزی دارند و همچنین در پیشگیری از بیماری‌های قلبی عروقی تأثیرگذارند. بدن انسان قادر به تولید این اسیدها نیست و نیازمند مصرف آن‌ها از طریق جیره غذایی است (Ozogul *et al*., 2005; Maghami *et al*., 2019). ماهیان تازه به دلیل ترکیب بیولوژیکی خاص خود بسیار فسادپذیر هستند. فساد عضله ماهی ناشی از تغییراتی است که توسط واکنش‌های بیولوژیکی، ازجمله اکسیداسیون چربی، واکنش‌های آنزیمی و فعالیت متابولیکی میکروارگانیسم‌ها، ایجاد می‌شود (Ojagh *et al*., 2010; Valipour *et al*., 2017). ماهیان تازه با pH بالای عضله (بیشتر از ۶)، مقادیر بالای نیتروژن غیر پروتئینی، مقادیر بالای اسیدهای چرب غیراشباع، حضور آنزیم‌های اتولیز کننده و عوامل دیگر، به‌عنوان غذاهای بسیار آسیب‌پذیر در نظر گرفته می‌شوند و عمر ماندگاری کوتاه‌تری نسبت به سایر محصولات گوشتی دارند (Karami *et al*., 2019).

لیستریا مونوسیتوژنز یک باکتری گرم مثبت است که فاقد توانایی رنگ‌بری اسیدی و تشکیل اسپور است. این باکتری کاتالاز و اکسیداز مثبت بوده و قادر به تخمیر گلوکز است. قدرت *لیستریا مونوسیتوژنز* برای رشد در دمای یخچال، تحمل شرایط اسیدی و غلظت بالای کلرید سدیم، تشکیل بیوفیلم در سطح تجهیزات کارخانه‌های فرآوری و مقاومت نسبت به شستشو و ضدعفونی سطحی سبب می‌شود که به‌راحتی بتواند باعث آلودگی، بقا و رشد در مواد غذایی شود. تاکنون گزارش‌های متعددی در ارتباط با آلودگی انواع ماهیان تازه و ایجاد عفونت لیستریایی در اثر مصرف آن‌ها گزارش‌شده است (Ojagh *et al*., 2017; Modaresi *et al*., 2011; Souza *et al*., 2008; Basti *et al*., 2006). در حال حاضر، برای کنترل *لیستریا مونوسیتوژنز* در مواد غذایی و همچنین فساد میکروبی مواد غذایی از ترکیبات شیمیایی مثل نیترات سدیم و لاکتات سدیم استفاده می‌شود. به دلیل اثرات مضر مواد نگهدارنده سنتتیک و شیمیایی امروزه افراد بیشتر تمایل دارند از نگهدارنده‌های طبیعی مانند اسانس‌های گیاهی و ترکیبات طبیعی استفاده کنند (Ojagh *et al*., 2017; Salimirad *et al*., 2022).

اسانس‌های گیاهی، ترکیبات آروماتیک روغنی می‌باشند، که باعث ارتقا ایمنی غذایی و بهبود خصوصیات ارگانولپتیک (عطر و طعم) فرآورده‌های غذایی می‌شوند. تاکنون تقریباً ۳۰۰۰ نوع اسانس شناسایی شده است، اما ۳۰۰ نوع از آن‌ها اهمیت تجاری دارند. برخی از اسانس‌ها خواص ضدباکتریایی، ضدانگلی و ضدقارچی دارند. ترکیبات فنولی به طور عمده مسئول خواص ضدباکتریایی این اسانس‌ها هستند. مطالعات نشان داده است که اسانس‌های گیاهی می‌توانند به عنوان جایگزینی طبیعی و ایمن به مواد نگهدارنده شیمیایی در محصولات غذایی استفاده شوند (Burt, 2004; Maghami *et al*., 2019; Zarandi *et al*., 2020). با استفاده از اسانس‌های گیاهی می‌توان دوره ماندگاری محصولات غذایی را افزایش داد و کیفیت آن‌ها را بهبود بخشید. اسانس رازیانه (*Foeniculum vulgare*)، که از بذر گیاه رازیانه (متعلق به خانواده چتریان) به دست

می‌آید، دارای ترکیبات ضد باکتریایی مناسبی است. رازیانه یک گیاه چندساله است که به صورت وحشی و زراعی در ایران یافت می‌شود. تمام قسمت‌های این گیاه خاصیت‌های درمانی دارند، اما بیشترین استفاده مربوط به بذر آن است که حاوی روغن اسانسی با خواص فرار است. ترکیب شیمیایی اصلی این اسانس شامل آنتول، فنکون، استراگول و آلفا-فلاندرن است که بیشترین خواص این گیاه به این ترکیب مرتبط است (Maghami *et al*., 2019; Rather *et al*., 2016; Alipour *et al*., 2016).

مطالعات در زمینه خواص ضدمیکروبی ترکیبات گیاهی نشان داده‌اند که می‌توان خواص اسانس‌ها را در ماتریکس غذایی افزایش داد. تحقیقات جدید نشان می‌دهند که ترکیبات سینرژیستی ما بین کارواکرول و تیمول (ترکیبات فعال برخی اسانس‌ها) با باکتریوسین‌ها (فرآورده‌های حاصل از تخمیر باکتری‌های اسید لاکتیک) وجود دارد. در حوزه بیوتکنولوژی، باکتری‌های لاکتیک اسید (LAB) نیز توانایی تولید ترکیبات ضدمیکروبی را در برابر باکتری‌های گرم مثبت نظیر *کلستریدیوم* و *لیستریا* دارند. باکتری‌های لاکتیک می‌توانند ترکیباتی از جمله باکتریوسین‌ها، آنزیم‌ها و پروتئین‌های کاتیونیک را تولید کنند که خواص ضدمیکروبی قابل توجهی دارند. استفاده از این ترکیبات بیولوژیکی به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی در مواد غذایی، به منظور بهبود ایمنی غذا و کاهش فساد غذایی، مورد توجه قرار می‌گیرد. باکتریوسین‌ها به عنوان ترکیبات زیست‌فعال پپتیدی، به واسطه تخمیر باکتری‌ها تولید می‌شوند و مکانیسم عمل آن‌ها شامل ناپایدارسازی سلول و افزایش نفوذپذیری غشای سلولی است (Khanjani *et al*., 2023; Ojagh *et al*., 2017; Salimirad *et al*., 2022; Mozaffarzogh *et al*., 2020). در مطالعه‌ای محققان موفق به جداسازی سویه‌ای از باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* شدند که قادر به تولید ترکیبات ضدمیکروبی به نام باکتریوسین است. آزمایش انجام شده نشان داد که این باکتریوسین دارای اثرات قوی ضدمیکروبی، ضدبیوفیلم (مهار تشکیل لایه‌های باکتریایی) و همچنین خاصیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد (DPPH) است. این یافته‌ها پتانسیل کاربردی این سویه باکتری را در صنایع غذایی و دارویی مطرح نمودند (Krishnamoorthi *et al*., 2022). به دلیل عوارض جانبی آنتی‌بیوتیک‌ها و نگهدارنده‌های شیمیایی، استفاده از ترکیبات طبیعی مانند باکتریوسین‌ها در صنعت غذا به عنوان جایگزین مناسب مورد توجه است.

بنابر مطالب بیان شده، هدف این مطالعه بررسی قابلیت استفاده از اسانس گیاه رازیانه و باکتریوسین‌های تولید شده توسط باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* برای کنترل بار میکروبی و مهار پاتوژن *لیستریا مونوسیتوژنز* در گوشت چرخ شده ماهی فیتوفاگ است.

مواد و روش‌ها

- آماده‌سازی باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز*

برای تلقیح باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* (PTCC 1163)، آمپول‌های لیوفیلیزه باکتری از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شده و در شرایط استریل باز شدند. سپس، آمپول‌ها به محیط کشت مایع TSB Merck, (Tryptic Soy Broth Germany) منتقل شدند و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند.

سپس، مایع حاوی باکتری به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده و با محلول رینگر جایگزین شد. برای جداسازی کامل محیط کشت از باکتری‌ها، محلول حاصل دوباره به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. تعداد باکتری‌ها در مایع حاصل با استفاده از روش کدورت سنجی در طول موج ۵۷۰ نانومتر تخمین زده شد و تقریباً معادل CFU/g ۱×۱۰^{۸} بود؛ به طوری که جذب نوری ۰/۰۸ تا ۰/۱ باکتری در هر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. برای دستیابی به این محدوده جذب نوری، رقیق سازی با استفاده از محلول رینگر استریل انجام شد. برای تأیید نتایج، شمارش باکتریایی با استفاده از روش کشت سطحی روی محیط مولر هینتون آگار (MHA: Muller Hinton Agar, Merck, Germany) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه انجام شد. پس از رقیق سازی، میزان CFU/g ۱×۱۰^{۴} باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* به گوشت ماهی تلقیح شد (Abdollahzadeh *et al*., 2014).

- آماده‌سازی باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس*

باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* (PTCC 11454) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. این باکتری ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت گوشت-عصاره مخمر (NB, Merck, Germany) کشت داده شد و سپس در محلول ۵۰٪ گلیسرول در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس باکتری در محیط کشت MRS (De Man, Rogosa and Sharpe, Merck, Germany)کشت داده شد. این کشت مجدداً در محیط MRS برای رسیدن به غلظت CFU/mL $۱۰^{۴}$ انجام شد (Abbaspour *et al*., 2024).

- آماده‌سازی تیمارها

برای انجام آزمایش، ۲۵ عدد ماهی فیتوفاگ با میانگین وزنی ۵۰ ± ۷۰۰ گرم از مزارع پرورش ماهی صید و با رعایت شرایط بهداشتی و مناسب به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از سرزنی، تخلیه امعا و احشاء، کندن پوست و استخوان‌گیری ماهیان، نمونه‌ها با آب سرد شست‌وشو داده شدند و سپس توسط چرخ‌گوشت دوبار چرخ شدند. در مرحله بعد، به نمونه‌های گوشت چرخ‌شده، به میزان CFU/g ۱×۱۰^{۴} *لیستریا مونوسیتوژنز* تلقیح شد. نمونه‌های تلقیح‌شده کاملاً هموژن شدند و از این گوشت تلقیح شده برای تهیه تمامی تیمارهای مورد آزمایش استفاده گردید.

سپس گوشت چرخ‌شده به چهار تیمار تقسیم و به شرح زیر با اسانس رازیانه و باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ترکیب شدند:

تیمار ۱: شاهد

تیمار ۲: باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* (CFU/g ۱×۱۰^{۴})

تیمار ۳: اسانس رازیانه (باریج اسانس، کاشان) با غلظت ۰/۹ درصد

برای تعیین غلظت مناسب در مطالعه حاضر، غلظت‌های ۰/۳، ۰/۶، ۰/۹ و ۱/۲ درصد اسانس به نمونه‌های ماهی افزوده شدند. ارزیابی حسی این نمونه‌ها با استفاده از روش هدونیک ۵ نقطه‌ای توسط شش فرد آموزش‌دیده انجام شد. امتیازدهی شامل بررسی ویژگی‌هایی مانند بافت، رنگ، بو و مقبولیت کلی بود. نتایج نشان داد که غلظت ۰/۹ درصد بهترین امتیاز را کسب کرده و مورد تأیید ارزیاب‌ها قرار گرفت.

تیمار ۴: ترکیب اسانس رازیانه (۰/۹ درصد) و باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* (CFU/g ۱×۱۰^{۴})

تمام تیمارها در کیسه‌های پلاستیکی بسته‌بندی شده و در طول دوره آزمایش در دمای ۴ ± ۱ درجه سلسیوس نگهداری شدند. شمارش باکتریایی هر چهار روز یک بار صورت گرفت (Solomakos *et al.*, 2008 a, b).

- شمارش باکتری کل و سرمادوست

برای آزمون‌های میکروبی ۱۰ گرم از نمونه گوشت فیله در شرایط استریل با ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل ۰/۸۵ به مدت ۶۰ ثانیه در یک مخلوط کن آزمایشگاهی هموژن شد. از هر نمونه سه بار به صورت جداگانه نمونه‌برداری شد. برای شمارش تعداد باکتری‌های کل و باکتری‌های سرمادوست نمونه‌های تهیه شده، از محیط تریپتیک سویا آگار (Tryptic Soy Agar) استفاده شد. پلیت‌های کشت داده شده مربوط به تعداد باکتری‌های کل بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سلسیوس و پلیت‌های مربوط به باکتری‌های سرمادوست بعد از ۱۰ روز انکوباسیون در دمای ۴ درجه سلسیوس شمارش شد (AOAC, 2005).

- تعیین وشمارش لیستریا مونوسیتوژنز

برای شمارش *لیستریا مونوسیتوژنز* از محیط انتخابی CHROMagar™ Listeria (محیط کشت کروموژنیک، شرکت میکروبیولوژی کروم اگارفرانسه) و مکمل آن (CHROMagar Listeria supplement) استفاده شد. برای شمارش باکتری در هر بار زمان نمونه‌گیری، ۱ گرم گوشت نمونه با ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه و سپس هموژن شد. بسته به نوع نمونه رقت‌ها از 10^{-2} تا 10^{-4} متغیر بود. ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه رقیق شده را روی محیط کشت CHROMagar™Listeria کشت سطحی داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* روی این محیط، کلنی هایی به رنگ آبی با هاله سفید تشکیل داد. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد که پس از کشت پلیت‌های استاندارد، انتخاب و شمارش شدند Hegde (*et al.*, 2010).

جهت بالا بردن دقت کار در ارزیابی‌های میکروبی، سه تکرار از هر نمونه و برای هر تکرار چهار رقت مناسب در هر روز ارزیابی، در نظر گرفته شد. نهایتا شمارش‌های انجام شده به صورت لگاریتم تعداد کلنی‌های تشکیل شده (log CFU) ثبت شد.

-ارزیابی حسی نمونه‌ها

ارزیابی نمونه‌ها توسط ۶ فرد که قبل از آزمون نمونه‌ها آموزش دیده بودند (افراد نیمه آموزش دیده) و با ارزیابی هدونیک ۵ نقطه‌ای انجام شد. امتیاز هر یک از نمونه‌ها به‌صورت زیر انجام شد بافت (۵: بافت محکم و سفت؛ ۱: بافت خیلی نرم)، رنگ (۵: بدون تغییر رنگ؛ ۱: کاملاً بی رنگ)، بو (۵: کاملاً مطبوع ، ۱: بوی فساد)، مقبولیت کلی (۵: کاملاً مقبول، ۱: کاملاً نامقبول). نقطه بحرانی مقبولیت هر یک از ویژگی‌ها ۴ در نظر گرفته شد و پایین‌تر از آن به معنای رد خصوصیات حسی مورد نظر بود (Valipour *et al.*, 2017).

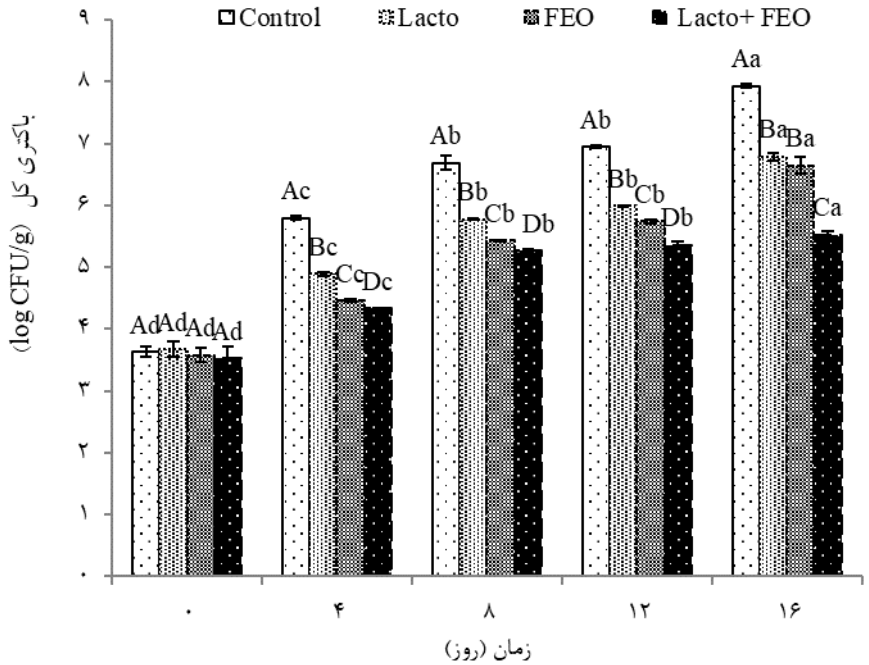
-تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها، با توجه به نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس، با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) استفاده شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. تمام داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد و ارزیابی‌ها در ۳ تکرار

صورت پذیرفت. از نرم افزار (SPSS version 18) برای آنالیز داده‌ها و Excel برای رسم نمودارها استفاده گردید.

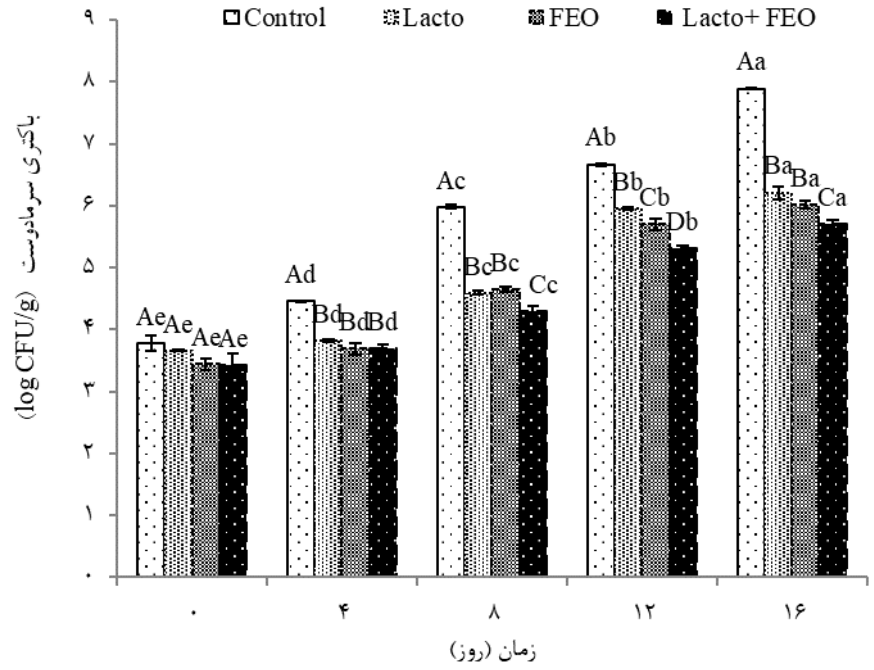
یافته‌ها

تغییرات باکتری کل گوشت ماهی فیتوفاگ در طول دوره نگهداری (۱۶ روز) در نمودار (۱) نشان داده شده است. میزان باکتری کل اولیه گوشت چرخ شده ماهی فیتوفاگ در این تحقیق ۰/۵۳±۳/۶۳ log CFU/g بوده که نشان دهنده کیفیت مطلوب ماهی می‌باشد. طبق نتایج حاصله، میزان باکتری کل در تمامی تیمارها در طول زمان نگهداری روندی افزایشی داشت. یعنی در روز صفر کمترین و در روز ۱۶ بیشترین مقدار (log ۸/۰۳CFU/g در تیمار شاهد) را داشت، همچنین اختلاف معنی‌دار بین زمان‌های مختلف آزمون‌ها مشاهده شد (p<۰/۰۵). از روز ۳ تا ۱۶ آزمون‌ها تیمار شاهد به طور معنی‌داری بیشترین میزان باکتری کل را در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد. همچنین از روز ۳ تا ۱۶ تیمار ترکیبی حاوی باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* و اسانس رازیانه دارای بیشترین تاثیر مهار کننده بر جمعیت باکتری کل بوده است. در آخرین روز نگهداری، تیمار ترکیبی بهترین نتیجه را نشان داد.



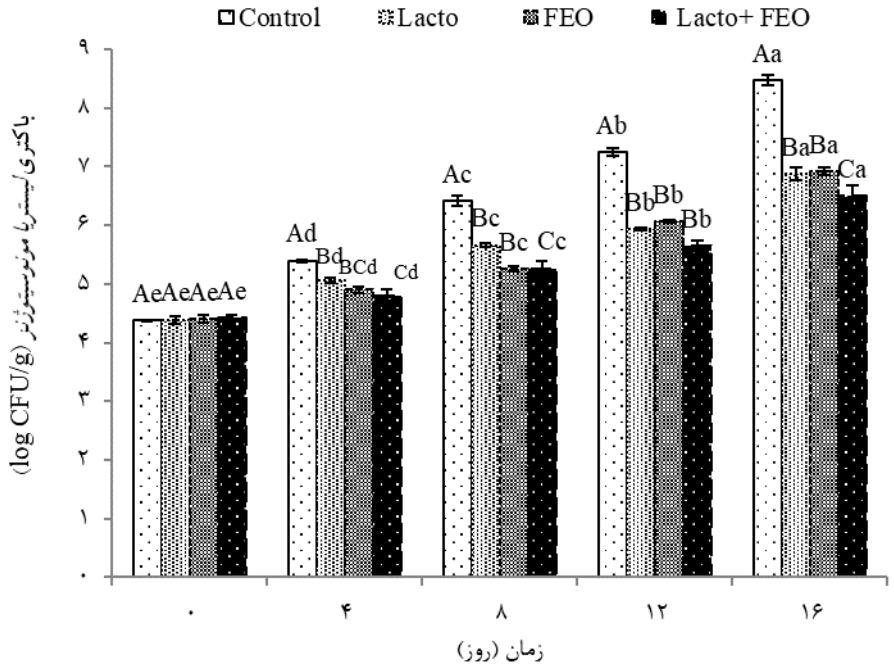
نمودار (۱)- مقادیر باکتری کل در تیمارهای مختلف طی زمان نگهداری (حروف بزرگ (.. A, B,) نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در یک روز، حروف کوچک (..a,b,) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار تیمار در روزهای مختلف می‌باشد) (control: شاهد، Lacto: *لاکتوکوکوس لاکتیس*، FEO: اسانس رازیانه)

تغییرات باکتری سرمادوست گوشت چرخ شده ماهی فیتوفاگ در طول دوره نگهداری (۱۶ روز) در نمودار (۲) نشان داده شده است. میزان باکتری سرمادوست اولیه گوشت چرخ شده ماهی در این تحقیق ۳/۷۸±۰/۰۳ log CFU/g بوده که نشانه تازگی ماهی باشد. طبق نتایج حاصله، میزان باکتری سرمادوست در تمامی تیمارها در طول زمان روندی افزایشی داشت یعنی در روز صفر کمترین و در روز ۱۶ بیشترین مقدار را داشت، همچنین اختلاف معنی‌دار بین زمان‌های مختلف آزمون‌ها مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). تغییرات باکتری‌های سرمادوست در تیمار شاهد و سایر تیمارها پائین‌تر از شمارش کلی باکتری‌ها بود. از روز ۳ تا ۱۶ آزمون‌ها،تیمار شاهد به طور معنی‌داری بیشترین میزان باکتری سرمادوست را در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد ($p<۰/۰۵$). کمترین تغییرات مربوط به تیمارهای ترکیبی *لاکتوکوکوس لاکتیس* و اسانس رازیانه بود. *لاکتوکوکوس لاکتیس* به تنهایی کمترین اثر را پس از تیمار شاهد، بر روی باکتری‌های سرمادوست گرم منفی داشت. استفاده همزمان از *لاکتوکوکوس لاکتیس* و اسانس رازیانه تاثیر بیشتری در کنترل باکتری سرمادوست داشت ($p<۰/۰۵$). در آخرین روز نگهداری (روز ۱۶)، تیمار ترکیبی بیشترین تاثیر مهارکننده را نشان داد.



نمودار (۲)- مقادیر باکتری سرمادوست در تیمارهای مختلف طی زمان نگهداری (حروف بزرگ (A, B, ..) نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در یک روز، حروف کوچک (a,b,..) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار تیمار در روزهای مختلف می‌باشد) (control: شاهد، Lacto:*لاکتوکوکوس لاکتیس*، FEO: اسانس رازیانه)

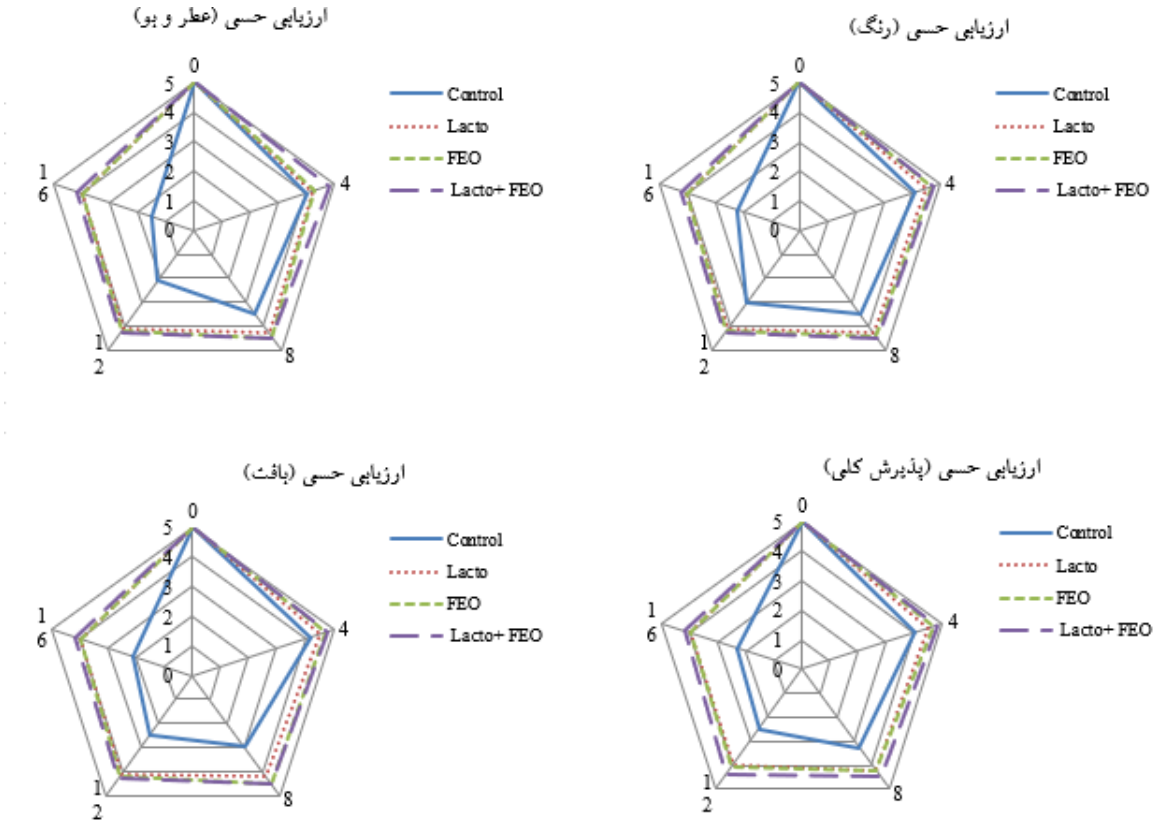
در نمودار (۳)، تغییرات باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در گوشت چرخ شده ماهی فیتوفاگ در تیمارهای مختلف طی زمان نگهداری نشان داده شده است. از آنجاکه میزان تلقیح باکتری به گوشت چرخ شده ماهی در ابتدای آزمایش ۱×۱۰^{۴}CFU/g بود، شمارش اولیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در زمان صفر آزمایش ۰/۰۱±۴/۳۸ بود. به منظور اطمینان از عدم آلودگی اولیه نمونه‌ها به لیستریا، بطور تصادفی از ۸ نمونه، نمونه‌برداری شد تا وجود یا عدم وجود *لیستریا* مشخص گردد. نتایج حاکی از عدم وجود باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در نمونه‌های ماهی بود. نتایج نمودار (۳) نشان می‌دهد که روند رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در نمونه‌های شاهد و دارای مواد نگهدارنده افزایشی بوده با این تفاوت که نمونه شاهد روند سریعتری داشته است. مطابق نتایج نشان داده شده، مقدار باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در تمامی تیمارهای این آزمایش در روز ۱۶ بیشترین میزان و در روز صفر کمترین میزان را داشته و بین زمان‌های مختلف آزمایش در بیشتر تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). در بین تیمارهای مورد بررسی تیمار ترکیبی (*لاکتوکوکوس لاکتیس* و اسانس رازیانه) بیشترین تاثیر را در کاهش *لیستریا مونوسیتوژنز* نسبت به سایر تیمارها نشان دادند ($p<۰/۰۵$).



(حروف بزرگ (A, B, ..) نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در یک روز، حروف کوچک (a,b,..) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار تیمار در روزهای مختلف می‌باشد) (control: شاهد، Lacto: *لاکتوکوکوس لاکتیس*، FEO: اسانس رازیانه)

تغییرات خصوصیات حسی شامل عطر، رنگ، بافت و پذیرش کلی گوشت ماهی نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در نمودار (۴) ارائه شده است. با گذشت زمان نگهداری، نتایج خواص حسی در تمامی

تیمارها به صورت معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). در گروه شاهد، ویژگی‌های حسی نامطبوع پس از ۴ روز نگهداری در دمای یخچال قابل استشمام بود و نمونه‌های شاهد پس از ۴ روز کاملا غیر قابل استفاده بودند. تغییرات خصوصیات حسی با نتایج میکروبی همسو بوده است، به طوری که در روز ۱۶ نگهداری بالاترین مقادیر امتیاز حسی در تیمار ترکیبی (*لاکتوکوکوس لاکتیس* و اسانس رازیانه) مشاهده شد.



نمودار (۴)- ارزیابی حسی در تیمارهای مختلف طی زمان نگهداری
(control: شاهد، Lacto: *لاکتوکوکوس لاکتیس*، FEO: اسانس رازیانه)

بحث و نتیجه‌گیری

رشد میکروب‌ها یکی از عوامل اصلی فساد مواد غذایی می‌باشد. کمیته بین المللی تعیین ویژگی‌های میکروبیولوژی مواد غذاییحد مجاز برای میزان بار باکتریایی کل را در ماهی ۷ log CFU/g تعیین کرده است (ICMSF, 2005). با افزایش زمان نگهداری مقادیر باکتری کل در تمامی تیمارها افزایش یافت و این تغییرات در تیمار شاهد بیشتر بود. در روز شانزدهم نگهداری میزان بار باکتریایی کل تنها در تیمار شاهد (۸/۳log CFU/g) از حد قابل قبول برای ماهی گذشت. استفاده از باکتری پروبیوتیک سبب مهار رشد باکتری‌های کل نسبت به تیمار شاهد شد. باکتری پروبیوتیک *لاکتوکوکوس لاکتیس*، از طریق قابلیت‌هایی مانند تولید اسیدهای آلی شامل اسیدلاکتیک، اسیدپروپیونیک، اسیداستیک و اسیدفرمیک یا اسیدهای

چرب آزاد، آمونیاک، بنزوات، پراکسید هیدروژن، دی استیل و سنتز باکتریوسین‌ها می‌تواند از رشد باکتری‌های ناخواسته جلوگیری کند که برخی از این مواد بازدارنده اثر آنتاگونیستی در مقابل طیف وسیعی از میکروارگانیزم‌های عامل فساد و بیماریزا دارند (Salimirad *et al*., 2022). استفاده از اسانس رازیانه نیز تاثیر مثبتی بر مهار رشد باکتری کل داشت. هر دو ترکیب فوق دارای خواص ضد میکروبی مناسبی می‌باشند. کمتر بودن بار کل باکتری در تیمارهای حاوی اسانس می‌تواند ناشی از ترکیبات فنولی نظیر تیمول باشد. ترکیبات فنولی موجود در اسانس‌های گیاهی غشای خارجی میکروارگانیسم‌ها را تخریب کرده و سبب خروج لیپوساکاریدها و افزایش نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی به ATP می‌شود. خروج ATP منجر به تمام شدن ذخیره انرژی سلول و مرگ سلول می‌شود (Burt, 2004; Jan *et al*, 2017). مهمترین ترکیب شیمیایی اسانس رازیانه، آنتول، فنکون است که بیشترین خواص این گیاه مربوط به این ترکیب است (Rather *et al*, 2016). در بین تیمارهای محافظتی نیز تیمار ترکیبی (*لاکتوکوکوس لاکتیس* و اسانس رازیانه) بیشترین تاثیر را در کاهش بار باکتریایی کل نسبت به سایر تیمارهای محافظتی نشان داد که ممکن است به دلیل اثر هم افزایی این دو ترکیب در کاهش رشد باکتری باشد. در مطالعات قبلی نیز اعلام شد استفاده از اسانس و عصاره رازیانه سبب مهار رشد مقادیر باکتری کل در فیل ماهی (*Huso huso*) و ماهی فیتوفاگطی دوره نگهداری می‌شوند (Maghami, 2019; Alipour, 2016). در مطالعه‌ی دیگری نیز محققین اعلام نمودند فیلم‌های کربوکسی متیل سلولز سدیم کازئینات حاوی باکتری پروبیوتیک روند افزایشی باکتری کل ماهی قزل آلا (*Oncorhynchus mykiss*) را نسبت به تیمار شاهد و فیلم خالص کندتر می‌نماید (Mozaffarzogh *et al*., 2020).

گوشت ماهی حاوی ترکیبات مناسبی برای رشد باکتری‌ها می‌باشد، بنابراین حضور باکتری‌ها به عنوان یکی از دلایل اصلی کاهش کیفیت فیله ماهی در طول دوره نگهداری، خسارت‌های اقتصادی و مسمومیت‌های غذایی فراوانی را باعث می‌شود. باکتری‌های سرمادوست میکروارگانیسم‌هایی به شدت هوازی هستند و در غیاب اکسیژن نمی‌توانند بقا داشته باشند (Mexis et al., 2009). با افزایش زمان نگهداری مقادیر باکتری سرمادوست در تمامی تیمارها افزایش یافت و این تغییرات در تیمار شاهد بیشتر بود. به طوری‌که در انتهای دوره نگهداری در تیمار شاهد برابر با log ۷/۸۹CFU/g بود. استفاده از باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* و اسانس رازیانه سبب کند شدن روند افزایشی عدد باکتری سرمادوست شد و استفاده از تیمار ترکیبی تاثیر مثبتی بر این روند داشت و نتایج بهتری در اکثر زمان‌های نگهداری در تیمار ترکیبی مشاهده شد. ساختار شیمیایی ترکیبات فنولی بر مکانیسم ضدمیکروبی آن‌ها اثرگذار بوده و گروه‌های هیدروکسیل موجود در ترکیبات فنولی اثر مهمی در خاصیت ضدمیکروبی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی دارد. وجود گروه هیدروکسی فنولیک فعال باعث شده است که این ترکیبات بتواند به آسانی با جایگاه‌های فعال آنزیم‌ها، باند هیدروژنی تشکیل دهند (Burt, 2004; Maghami,2019; Zarandi, 2020). همچنین حضور باکتری اسیدلاکتیک (*لاکتوکوکوس لاکتیس*) سبب

رقابت با میکروارگانیسم‌های عامل فساد می‌شود، تولید متابولیت‌هایی نظیر اسیدهای آلی (اسید لاکتیک و استیک)، و سایر ترکیبات با وزن مولکولی پایین توسط باکتری پروبیوتیک و مهاجرت این ترکیبات به محصول، منجر به ایجاد خواص ضدمیکروبی می‌گردد (Khanjani *et al.*, 2023). همچنین می‌تواند به فاز تأخیر طولانی‌تر میکروارگانیسم‌های فسادزا در نتیجه بازدارندگی رقابتی توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک و همچنین اثر اسیدی‌سازی باکتری‌های اسیدلاکتیک نسبت داده شود (Abbaspour *et al.*, 2024). نتایج این تحقیق با نتایج سایر محققین در ارتباط با استفاده از پوشش نانوکیتوزان به همراه اسانس رازیانه بر فیله فیل ماهی ، استفاده از اسانس رازیانه بر فیله فیتوفاگ ، استفاده از فیلم‌های کربوکسی متیل سلولز سدیم کازئینات حاوی باکتری پروبیوتیک بر فیله قزل آلای رنگین کمان و در ارتباط با نانوفیلم مرکب به همراه باکتری پروبیوتیک بر فیله مرغ هم خوانی داشت، به طوریکه استفاده از اسانس‌های گیاهی و باکتری پروبیوتیک در مطالعه آن‌ها سبب کند شدن روند افزایشی باکتری سرمادوست شد (Alipour, 2016; Maghami, 2019; Mozaffarzogh , 2020; salimirad, 2022).

کمیته بین‌المللی تعیین ویژگی‌های میکروبیولوژی مواد غذایی ۷ log CFU/g را حد مجاز برای باکتری‌های سرمادوست در ماهی تعیین کرده است (ICMSF, 2005). با توجه به نتایج در انتهای دوره نگهداری مقادیر باکتری سرمادوست در تمامی تیمارها به جز تیمار شاهد از محدوده مجاز برخوردار بود.

لیستریا مونوسیتوژ باکتری گرم مثبت، هوازی تا بی‌هوازی اختیاری و میله‌ای شکل است که باعث بیماری لیستروزیس در انسان می‌شود و به جرات می‌توان گفت که از نظر نقش تهدید کنندگی، لیستریوزیس خطرنا ترین نوع عفونت غذایی است (Chen *et al.*, 2010). با افزایش زمان مقادیر باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*در تمامی تیمارها افزایش یافت و بیشترین تغییرات در تیمار شاهد بود، به طوریکه در انتهای دوره نگهداری در تیمار شاهد برابر با ۸/۴۷ log CFU/g بود. استفاده از باکتری پروبیوتیک *لاکتوکوکوس لاکتیس* سبب مهار رشد باکتری *لیستریا* شد. بر اساس مطالعه‌ای، فعالیت ضدمیکروبی باکتری پروبیوتیک علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در ارتباط با تولید باکتریوسین گزارش شد (Mahmoudi *et al.*, 2011). همچنین در مطالعات دیگری نیز اعلام شد استفاده از فیلم‌های خوارکی حاوی باکتری‌های *پروبیوتیک* سبب کاهش تعداد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* تلقیح شده در فیله ماهی فیتوفاگ و فیله مرغ نسبت به تیمار شاهد شد (Ojagh, 2017; Salimirad, 2022). آن‌ها علت این امر را تولید اسیدهای آلی توسط پروبیوتیک‌ها گزارش نمودند. همچنین اسانس رازیانه نیز علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* خاصیت ضدمیکروبی داشت. اجزای اصلی اسانس رازیانه شامل آنتول، فنکون، استراگول و آلفا-فلاندرن می‌باشد که گزارش شده است این ترکیبات علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* خاصیت ضدمیکروبی دارند (Berthold-Pluta, 2019; Rather, 2016). علاوه بر این خاصیت آبگریزی اسانس‌های روغنی می‌تواند باعث نفوذ آسان آن‌ها در غشای لیپیدی باکتری‌ها شود. این خاصیت به اسانس‌ها امکان می‌دهد به طور موثر در سلول‌های باکتری نفوذ کرده و باعث نشت مواد درونی آن‌ها به بیرون شود. این نشت مواد می‌تواند باعث ضربه

زدن به عملکرد سلولی و فعالیت‌های ضروری باکتری‌ها گردد و در نهایت موجب مرگ و نابودی آن‌ها شود. این مکانیسم از طریق تخریب غشای سلولی، تخریب پروتئین‌ها و اختلال در فعالیت آنزیمی باکتری‌ها می‌تواند اثرات ضدباکتریایی را ایجاد کند (Shannon, 2011; Rahnama, 2018).

ارزیابی حسی بعنوان یکی از شاخص‌های سنجش کیفیت ماهی طی دوره نگهداری استفاده می‌شود. علی‌رغم تلاش‌های زیادی که برای توسعه استانداردهای آزمایشگاهی برای ماهی انجام گرفته است، هنوز بهترین روش ارزیابی درجه تازگی، ارزیابی ارگانولپتیکی است (Bahram *et al*, 2016). یک علامت واضح فساد ایجاد رنگ، بو، طعم نامطلوب، تولید گاز و تغییر در بافت می‌باشد. توسعه این شرایط فساد، به‌علت ترکیبی از فعالیت‌های اتولیتیک، شیمیایی و میکروبیولوژیکی است. البته فساد عمده در ماهی به‌علت رشد باکتریایی می‌باشد. بررسی‌ها نشان داد امتیاز حسی تمامی نمونه‌ها با گذشت زمان کاهش یافت. در این میان نمونه شاهد در تمامی روزها کمترین امتیاز حسی را کسب کرد و از روز چهارم به بعد غیر قابل قبول بود. ولی تمامی نمونه‌های حاوی نگهدارنده تا انتهای دوره نگهداری امتیاز ۴ یا بالاتر را کسب نمودند و قابل قبول بودند و بالاترین امتیاز حسی در تیمار ترکیبی (*لاکتوکوکوس لاکتیس* و اسانس رازیانه) مشاهده شد. بهبود خصوصیات حسی در تیمارهای حاوی اسانس رازیانه و *لاکتوکوکوس لاکتیس* می‌تواند به علت خاصیت ضداکسیدانی و ضد میکروبی آن‌ها باشد که به عنوان یک ضداکسیداسیون و ضدمیکروب قوی عمل می‌کند و اکسیداسیون لیپیدها، رشد و فعالیت میکروارگانیسم را کاهش می‌دهد و در نتیجه می‌تواند طعم، بافت، رنگ و مقبولیت کلی را بهبود بخشد (Ghafari, 2024; Khanjani, 2023; Alipour, 2016). نتایج مربوط به آزمون‌های میکروبی با نتایج مربوط به آزمون‌های حسی هم‌خوانی داشت. در مطالعه‌ای نیز بیان شده است، استفاده از *لاکتوکوکوس لاکتیس* سبب بهبود ویژگی‌های حسی ماهی قزل آلای رنگین کمان طی دوره نگهداری شد در آن مطالعه روند تغییرات ارزیابی حسی همسو با سایر پارامترها بوده است (Abbaspour *et al*., 2024).

بر اساس نتایج مربوط به فساد میکروبی و حسی گوشت چرخ شده ماهی فیتوفاگ، استفاده از باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* به همراه اسانس رازیانه سبب کند شدن روند افزایشی شاخص های فساد میکروبی نسبت به تیمار شاهد شد و نتایج تجزیه و تحلیل‌های مربوط به باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* بیانگر این موضوع است که در تمامی تیمارها افزایش بار میکروبی همراه با گذشت زمان وجود دارد، ولی این افزایش در تیمارهای ترکیبی کندتر صورت گرفت. در مجموع استفاده از باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* به همراه اسانس رازیانه دارای ویژگی‌های خوبی می‌باشد که می‌تواند به عنوان یک نگهدارنده طبیعی به منظور ایجاد ماندگاری طولانی برای محصولات غذایی مانند گوشت چرخ شده ماهی فیتوفاگ استفاده شود.

تعارض منافع

نویسندگان تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Abbaspour Anbi, A., Seidgar, M., and Neyriz Naghadehi, M. (2024). Effects of *Lactococcus lactis* (L. lactis) subsp. lactis Supernatant on the shelf life of vacuum-packaged *Oncorhynchus mykiss* fillets. Iranian Food Science and Technology Research Journal, 19(6), 111-124. [In Persian]
- Alipour, H., Javadian, S. and Bahram, S. (2016). The effect of encapsulated fennel extracts on the quality of silver carp fillets during refrigerated storage. Food Science and Nutrition, 4(2): 298-304.
- AOAC. (2005). Official Method of Analysis. (17th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M. and Hosseini, H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control Listeria monocytogenes inoculated in minced fish meat. Food Control, 35(1): 177-183.
- Bahram, S., Rezaei, M. Soltani, M., Kamali, A., Abdollahi, M., Khezri Ahmadabad, M. and Nemati, M. (2016). Effect of Whey Protein concentrate coating cinnamon oil on quality and shelf life of refrigerator beluga sturgeon (*Huso huso*). Journal of Food Quality, 39: 743-749. Basti, A., Misaghi, A., Salehi, T. Z. and Kamkar, A. (2006). Bacterial pathogens in fresh, smoked, and salted Iranian fish. Food Control, 17: 183-188.
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.
- Berthold-Pluta, A., Stasiak-Różańska, L. and Pluta, A., (2019). Antibacterial activities of plant-derived compounds and essential oils against Cronobacter strains. European Food Research and Technology, 245: 1137-1147.
- Chen, H., Neetoo, H. and Juck, G. (2010). Application of an active alginate coating to control the growth of *Listeria monocytogenes* on poached and deli turkey products. International Journal of Food Microbiology, 142: 302-308.
- Hegde, V., Leon-Velarde, C. G., Stam, C. M., Jaykus, L. A. and Odumeru, J. A. (2007). Evaluation of BBL CHROMagar Listeria agar for the isolation and identification of Listeria monocytogenes from food and environmental samples. Journal of Microbiological Methods, 68(1): 82-87.
- Ghafari, E., Ariaii, P. and Bagheri, R. (2024). Investigating the effect of nanochitosan-Iranian tragacanth gum composite film along with *Eryngium campestre* essential oil on the shelf life of goat meat. Journal of Food Measurement and Characterization,18, 1543–1558
- ICMSF. (2005). Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities. (2nd ed.). New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Jan Khan, N., Khan, Z. and Sukhcharn, S. (2017). Stinging nettle (Urtica dioica L.): A reservoir of nutrition and bioactive components with great functional. Journal of Food Measurement and Characterization, 11: 423-433.
- Karami, N., Kamkar, A., Shahbazi, Y. and Misaghi, A. (2019). Edible films based on chitosan-flaxseed mucilage: In vitro antimicrobial and antioxidant properties and their application on the survival of foodborne pathogenic bacteria in raw minced trout fillets. Pharmaceutical and Biomedical Research, 5(2): 10-16.
- Khanjani, M., Ariaii, P. and Najafian, L. (2023). Investigating the effect of polylactic acid-nanocellulose composite film along with *Lactobacillus casei* on the quality and shelf life of beluga sturgeon (*Huso huso*) fillet. Journal of Food Measurement and Characterization, 17: 4161–4174.
- Krishnamoorthi, R., Srinivas, M., Mahalingam, P.U., Malaikozhundan, B., Suganya, P., and Gurushankar, K. (2022) Antimicrobial, anti-biofilm, antioxidant and cytotoxic effects of bacteriocin by *Lactococcus lactis* strain CH3 isolated from fermented dairy products—An in vitro and silico approach. International Journal of Biological Macromolecules, 220, 291-306.
- Maghami, M., Motalebi, A. A. and Anvar, S. A. A. (2019). Influence of chitosan nanoparticles and fennel essential oils (*Foeniculum vulgare*) on the shelf life of Huso huso fish fillets during storage. Food Science and Nutrition, 7(9): 3030-3041.

- Mahmoudi, R., Ehsani, A., Tajik, H. and Akhondzade Basti, A. (2011). The antimicrobial activity of Mentha longifolia L. essential oil and *Lactobacillus casei* on the growth of *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening, and storage of Iranian white cheese. Journal of Medicinal Plants, 10(39): 112-122.
- Mexis, S. F., Chouliara, E. and Kontominas, M. G. (2009). Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4 °C. Food Microbiology, 26: 598–605.
- Modaresi, R., Mardani, K., Tukmechi, A. and Owanagh, A. (2011). Prevalence of *Listeria spp*. in fish obtained from Urmia fish markets. African Journal of Microbiology Research, 5, 5398-5401.
- Mozaffarzogh, M., Misaghi, A., Shahbazi, Y., and Kamkar, A. (2020). Evaluation of probiotic carboxymethyl cellulose-sodium caseinate films and their application in extending shelf life quality of fresh trout fillets. LWT, 126: 109305.
- Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H. and Hosseini, S. M. H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. Food Chemistry, 120: 193-198.
- Ojagh, S., Shabanpour, B., Kordjazi, M., Abdolahzadeh, E. and Gharaei, M. (2017). The Effect of Sodium Caseinate Films Incorporated with *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* Bacteria to Control Listeria monocytogenes Inoculated Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) Fillet. Journal of Food Technology and Nutrition, 14(4): 103-112.
- Ozogul, Y., Ozyurt, G., Ozogul, F., Kuley, E. and Polat, A. (2005). Freshness Assessment of European Eel (*Anguilla anguilla*) by Sensory, Chemical and Microbiological Methods. Food Chemistry, 92: 745-751.
- Rather, M. A., Dar, B. A., Sofi, S. N., Bhat, B. A. and Qurishi, M. A. (2016). *Foeniculum vulgare*: a comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. Arab Journal of Chemistry, 9: S1574-S1583.
- Rahnama, M., Noorijangi, A. and Alipour Eskandani, M. (2018). The effect of *Cuminum Cyminum* essence in preventing the growth of *Listeria monocytogenes* in the minced meat of *Schizothorax Zarudnyi*. Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences, 6(1): 27-36.
- Salimiraad, S., Safaeian, S., Akhondzadeh Basti, A., Khanjari, A. and Mousavi Nadoushan, R. (2022). Characterization of novel probiotic nanocomposite films based on nano chitosan/nano cellulose/gelatin for the preservation of fresh chicken fillets. LWT - Food Science and Technology, 162: 113429.
- Shannon, E. M., Milillo, S. R., Johnson, M. G. and Ricke, S. C. (2011). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by exposure to a combination of nisin and cold-pressed terpeneless Valencia oil. Journal of Food Science, 9: 600-604.
- Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P. and Botsoglou, N. (2008a). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. Meat Science, 80: 159-166.
- Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P. and Botsoglou, N. (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. Food Microbiology, 25: 120-127.
- Soukoulis, C., Behboudi-Jobbehdar, S., Yonekura, L., Parmenter, C. and Fisk, I. D. (2014). Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in prebiotic edible films. Food Chemistry, 159: 302–308.
- Souza, V. M., Alves, V. F., Destro, M. T. and De Martinis, E. C. P. (2008). Quantitative evaluation of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed Surubim fish (*Pseudoplatystoma sp*). Brazilian Journal of Microbiology, 38: 527-528.
- Valipour, F., Ariaii, P., Khademi Shurmasti, D. and Nemati, M. (2017). Effect of chitosan edible coating enriched with eucalyptus essential oil and α-tocopherolon silver carp fillets quality during refrigerated storage. Journal of Food Science and Technology, 37(1): e12295.

- Zarandi, M., Hasani, M. and Shotorbani, P. M., (2022). Assessing edible composite coating of sodium alginate-galbanum gum impregnated with nettle extract on improving the shelf life of rainbow trout fillet. Journal of Food Measurement and Characterization, 16: 2556-2570.