

مطالعه اثر آسکوربیک اسید بر باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه جدا شده از ماهیان قزل آلائی رنگین کمان پرورشی در شرایط آزمایشگاهی

• معصومه محمودی

کارشناسی ارشد بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

• امین نعمت‌اللهی (نویسنده مسئول)

بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

• حمدا...مشتاقلی

بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

• مجتبی بنیادیان

بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵-۰۶-۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵-۰۷-۲۵

Email: anematolahi@yahoo.com



چکیده

دستیابی به روش‌های حفظ کیفیت ماهی در هنگام نگهداری و جلوگیری از بروز عوامل بیماری‌زا در محصول مورد مصرف بسیار ضروری است. با توجه به اثرات سوء نگهدارنده‌های شیمیایی بر سلامت انسان، جایگزینی مواد طبیعی با خاصیت ضد باکتریایی برای حفظ کیفیت ماهیان پس از برداشت بسیار مطلوب می‌باشد. مطالعه اخیر به منظور استفاده از آسکوربیک اسید و ارتقای خاصیت ضد باکتری آن تحت شرایط گوناگون pH محیطی بر روی استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه جدا شده از ماهیان قزل آلائی رنگین کمان پرورشی انجام شد. فعالیت ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف آسکوربیک اسید (۰، ۱۹/۵۳، ۳۹/۰۶، ۷۸/۱۳، ۱۵۶/۲۵، ۳۱۲/۵، ۶۲۵، ۱۲۵۰، ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تحت سه اسیدیته ۵/۵، ۶ و ۷ و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از روش‌های میکرودیالوژن و قرائت جذب نوری انجام شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل و در سه تکرار انجام گرفت. میانگین آن‌ها به روش تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار Sigmastat انجام شد. بیشترین اثر مهاري رشد (MIC) در غلظت ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در pH ۵/۵ و ۶ علیه هر دو باکتری به دست آمد. کمترین میزان جذب نوری نیز در غلظت ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک اسید در اسیدیته‌های ۵/۵ و ۶ علیه هر دو باکتری در مقایسه با غلظت‌های کمتر آن بود. در حالی که در اسیدیته ۷ با توجه به بالا بودن میزان MIC (۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کمتر تاثیر گذار بود. کمترین میزان جذب نوری نیز در غلظت ۲۵۰۰ آسکوربیک اسید در اسیدیته‌های ۵/۵ و ۶ علیه هر دو باکتری در مقایسه با غلظت‌های کمتر آن بود. در اسیدیته معادل ۷ نیز در غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک اسید، جذب نوری در مقایسه با سایر غلظت‌های کمتر آن علیه هر دو باکتری به طور معنی‌داری کمتر بود ($p < 0/05$) که نشان از اثر مهاري رشد داشت. نتایج نشان داد که کاهش اسیدیته از ۷ به ۶ و ۵/۵ سبب افزایش اثر مهاري آسکوربیک اسید در غلظت ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر علیه هر دو باکتری شد.

کلمات کلیدی: آسکوربیک اسید، استرپتوکوکوس اینیایی، لاکتوکوکوس گارویه، قزل آلائی رنگین کمان

• Veterinary Researches & Biological Products No 116 pp: 225-231

Study effect of ascorbic acid on *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* isolated from reared *Oncorhynchus mykiss* in invitro condition

By: Mahmoudi, M., M.Sc. in Aquatic Animal Health, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran. Nematollahi, A., (Corresponding Author), Associate Professor at Division of Aquatic Animal Health, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran. Moshtaghi, H., Associate Professor of Food Hygiene and Quality Control, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran. and Boniadian, M., Associate Professor of Food Hygiene and Quality Control, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

Email: anematollahi@yahoo.com

Received: 2016-09-18 Accepted: 2016-10-16

Developing safe methods to maintain quality of harvested fish during storage and inhibiting growth of pathogens is crucial. On the other hand, using chemical preservatives to control the pathogens is a great health concern for us. Therefore, it is desirable to use natural preservatives with antibacterial properties for keeping health the harvested aquatic products. This study was conducted to evaluate effect of separate and synchronized activities of acid ascorbic so their improving anti-bacterial effect by pH alternations on *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* isolated from reared rainbow trout of province. We assessed the antibacterial effects of different concentrations of ascorbic acid (0, 19.53, 39.06, 78.13, 156.25, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 µg/mL), separately and simultaneously, in vitro on growing *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* under different pH 5.5, 6 and 7 by microdilution and spectrophotometrically methods. In microdilution assessment method, the most effect of growth inhibitory on the both of bacteria by ascorbic acid was observed in concentration 2500 µg/L under pH 5.5 and 6; nevertheless less inhibitory was observed in pH 7 by more concentration of the ascorbic acid, as MIC 5000 µg/mL. Considering the mentioned results, decreasing pH from 7 to 6 and 5.5 could increase inhibitory effect of ascorbic acid on both growing *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* activities.

Key words: *Streptococcus iniae*, ascorbic acid, Rainbow trout, *Lactococcus garvieae*

به دلیل ویژگی حذف‌کنندگی و جاذب بودن، می‌تواند از طریق اتصال با ترکیباتی همچون یون‌های فلزی و گروه‌های آمینی سولفیدریلی پروتئین‌ها اثرات مہاری بر میکروارگانیسم‌ها داشته باشد. ویژگی جذب اکسیژن به‌وسیله ویتامین ث ممکن است به‌عنوان یک سد ممانعتی مهم در مقابل میزان نیاز به اکسیژن برای باکتری‌ها مطرح باشد (۲۲). استرپتوکوکوزیس در ماهی به شکل مجموعه‌ای از بیماری‌های مشابه می‌باشد و توسط جنس‌ها و گونه‌های مختلفی از باکتری‌های کوکسی که در رنگ‌آمیزی گرم مثبت هستند و از باکتری‌های لاکتیک می‌باشند ایجاد می‌شود (۴). این کوکسی‌های گرم مثبت کوچک بی‌هوازی اختیاری می‌باشند که اغلب در زنجیره‌های طولانی به‌اندازه ۰/۳-۰/۵ میکرومتر دیده می‌شوند (۲۰ و ۱۹). از علائم مشخص این بیماری بیرون‌زدگی دو طرفی چشم‌ها و یا فرورفتگی آن‌ها، تیرگی و سیاه شدن رنگ پوست، خونریزی‌های سرسوزنی روی دیواره داخلی سرپوش آب‌ششی و شکم ماهی مبتلابه استرپتوکوکوزیس، متسع شده و در محوطه صفاقی مایع آسیتی همراه با خون وجود دارد (۱۱ و ۱). لاکتوکوکوس گارویه عامل بیماری

مقدمه

بیماری‌های غذازاد با منشا آبزیان یک مشکل بهداشت عمومی بزرگ و در حال رشد است. امروزه با توجه به اینکه درصد قابل‌توجهی از غذای مصرفی به‌صورت آماده یا فرآوری شده تهیه می‌شود، در نتیجه نیاز به حفظ کیفیت در محصولات غذایی و جلوگیری از رشد جمعیت باکتری‌ها امری مهم و غیرقابل‌چشم‌پوشی است (۱۲). از طرف دیگر استفاده بیش‌ازحد نگره‌دارنده‌های شیمیایی سبب افزایش نگرانی مصرف‌کنندگان شده است (۲). ویتامین‌ها ترکیباتی آلی غیر از گلوکسید، لیپید و پروتئین‌اند که در طبیعت توسط تک‌یاخته‌ای‌ها، سلول‌های گیاهی تکامل‌یافته ساخته می‌شوند. آسکوربیک اسید باعث تأخیر در ایجاد رنگ تیره و ترشیدگی در فرآورده‌های گوشتی، میوه و سبزی‌های کنسرو شده می‌گردد (۱۷ و ۱۶، ۱۵، ۵، ۳). در صنایع غذایی از آسکوربیک اسید به‌عنوان نگره‌دارنده و تثبیت‌کننده استفاده می‌شود و در صنایع پلی‌مر، عکاسی، چاپ و مواد آرایشی و در زمینه پزشکی هنگام نگه‌داری خون ذخیره‌شده و داروهای ضدبارداری استفاده می‌شود (۷). ویتامین ث علاوه بر خاصیت اسیدی

تعیین خاصیت ضد باکتریایی آسکوربیک اسید

روش سنجش رقت میکرو برات (Microdilution broth assay) برای بررسی اثر مهار آسکوربیک اسید بر روی باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه تحت سه اسیدیته به ترتیب ۵/۵، ۶ و ۷ و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد مورد استفاده قرار گرفت. پلیت‌های استریل ۹۶ خانه‌ای پلی استرین با ظرفیت ۳۰۰ میکرو لیتر استفاده شده و محلول آسکوربیک اسید با غلظت ۱۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با عبور از فیلتر استریل غشایی با منافذ ۰/۴۵ μm صاف شده و ۱۵۰ میکرو لیتر از محلول آسکوربیک اسید به هر چاهک از ستون اول با استفاده از یک پیپتور چندکاناله اضافه شد. سپس ۱۵۰ μl از محیط آگوست TSB به ستون اول اضافه شده و به‌طور کامل با مایع داخل چاهک‌های متناظر از ستون دوم ده بار مخلوط شد. پس از آن ۱۵۰ μl نمونه برداشته و به ستون کناری اضافه و مخلوط شد. برای تمامی چاهک‌های دو برابر رقت انجام گردید. از یک ستون به‌عنوان شاهد باکتری و ستون دیگری نیز به‌عنوان شاهد محیط کشت استفاده شد. در نتیجه این‌گونه رقت سازی، گرادیان غلظت آسکوربیک اسید از ۰ تا ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سراسر پلیت به دست آمد. ۱۰ میکرو لیتر از محیط کشت هر کدام از باکتری‌های مورد آزمایش پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در هر چاهک پلیت به‌جز چاهک ۱۰ که شاهد ماده مورد مطالعه بود و چاهک ۱۲ با غلظت حاصل نهایی ۱۰^۵ cfu/ml اضافه شدند. میکرو پلیت در انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت در ۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و رشد باکتریایی به‌وسیله ELISA reader و تغییر در جذب با طول موج ۶۳۰ nm اندازه‌گیری شد (MIC (Minimum Inhibitory Concentration)) به‌عنوان کمترین غلظت آسکوربیک اسید در مهار رشد باکتری‌های مورد آزمایش مشخص شد. سنجش MIC برای هر باکتری سه بار انجام شد (۲۵). برای تعیین MBC (Minimum Bactericidal Concentration) نیز تعداد کلونی‌های باکتری بر روی محیط کشت Muller Hinton agar شمارش گردید. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل انجام شد. برای آنالیز نتایج حاصله از نرم‌افزار Sigmapst و روش آزمون چند

لاکتوکوکوزیس می‌باشد این باکتری کوکوباسیل گرم مثبت و فاقد تحرک با همولیز آلفا است که در بسیاری از گونه‌های ماهی و به‌ویژه قزل آلائی رنگین‌کمان به‌عنوان عامل بیماری‌زا گزارش شده است (۱۸). این باکتری از عوامل بیماری‌های مشترک محسوب می‌شود و می‌تواند منجر به بروز اندوکاردیت در انسان شود که اهمیت بیماری را دوچندان می‌کند (۲۴). با بروز سپتی سمی در ماهی مبتلا همراه است که معمولاً با علائمی چون شنای غیرعادی، تیرگی بدن، اگزوفتالمی، خونریزی در داخل و یا اطراف کره چشم یا خونریزی‌های سطحی بدن در نواحی سرپوش آب‌ششی، قاعده باله‌ها و همچنین خونریزی‌های وسیع داخلی ظهور پیدا می‌کند (۱۳ و ۶). هدف از این مطالعه اثر آسکوربیک اسید تحت شرایط گوناگون اسیدیته محیطی علیه باکتری‌های زئونوز شامل استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه جدا شده از ماهیان قزل آلائی رنگین‌کمان پرورشی با استفاده از روش‌های میکرودایلوشن و قرائت جذب نوری بود.

مواد و روش‌ها**تهیه آسکوربیک اسید و آماده‌سازی آن**

ابتدا پودر آسکوربیک اسید از شرکت سیگما آلدریج (Sigma-Aldrich) خریداری شده و در آب مقطر استریل حل شد و توسط فیلتر میکروبیولوژیک ۴۵ درصد میکرومتر استریل گردید.

جداسازی و شناسایی باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه

به‌منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه، نمونه‌گیری از ماهیان ۳۳ مزرعه پرورش ماهی در استان چهارمحال و بختیاری که در تابستان ۱۳۹۶ به‌عنوان موارد مشکوک به بیماری گزارش شده بودند انجام شد و همچنین باکتری‌های ایزوله شده جهت شناسایی دقیق‌تر گونه به آزمایشگاه مرجع ارجاع داده شد. در مجموع ۱۰۰ ماهی دارای علامت مشکوک به بیماری در مجاورت یخ و در حداقل زمان ممکن به مرکز تحقیقات شیلات دانشگاه آزاد واحد شهرکرد منتقل شد.

جدول ۱- حداقل غلظت مهار رشد و حداقل غلظت کشندگی محلول آسکوربیک اسید (میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر لاکتوکوکوس گارویه و استرپتوکوکوس اینیایی در اسیدیته‌های مختلف

باکتری	غلظت (μg/mL)	آسکوربیک اسید		
		pH		
		۵/۵	۶	۷
لاکتوکوکوس گارویه	حداقل غلظت مهار رشد	۲۵۰۰	۲۵۰۰	۵۰۰۰
	حداقل غلظت کشندگی	*	*	*
استرپتوکوکوس اینیایی	حداقل غلظت مهار رشد	۲۵۰۰	۲۵۰۰	۵۰۰۰
	حداقل غلظت کشندگی	*	*	*

※: مشاهده نشد.

میزان جذب نوری در غلظت ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در اسیدیتته های ۵/۵ و ۶ در مقایسه با غلظت‌های کمتر از آن به‌طور معنی‌داری پایین بود که حاکی از مهار رشد باکتری می‌باشد. در اسیدیتته ۷ در غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز در مقایسه با مقادیر کمتر آسکوربیک اسید میزان جذب نوری اختلاف آماری معنی‌داری داشت ($p < 0/05$).

بحث

در گذشته اغلب تولیدکنندگان مواد غذایی برای جلوگیری از رشد و بقای میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و فساد و نیز راستای افزایش ماندگاری از نگهدارنده‌های شیمیایی استفاده می‌کردند؛ اما در سال‌های اخیر به علت ترجیح دادن مصرف‌کننده‌ها به استفاده از غذای ایمن و عاری از مواد شیمیایی، مطالعات فراوانی در زمینه مصرف نگه‌دارنده‌های طبیعی در محصولات غذایی صورت گرفته است از جمله این ترکیبات ضد میکروبی طبیعی آسکوربیک اسید می‌باشد. در این مطالعه اثر ضد باکتریایی آسکوربیک اسید بر استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه با استفاده از روش میکرودايلوشن و قرائت تغییرات جذب نوری موردسنجش قرار گرفت.

دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال $p < 0/05$ برای مقایسه میانگین داده‌ها استفاده شد. کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام شدند.

یافته‌ها

نتایج حاصل از روش میکرودايلوشن نشان داد که مهار رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه در اسیدیتته های ۵/۵ و ۶ در غلظت ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد در حالی که مهار رشد در اسیدیتته ۷ در غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (جدول ۱).

یافته‌های حاصل از بررسی رشد باکتری با استفاده از تغییرات جذب نوری (جدول ۲، ۳ و ۴) نشان داد که در تمامی اسیدیتته‌ها با افزایش میزان غلظت آسکوربیک اسید میزان جذب نوری کاهش یافت به‌گونه‌ای که کمترین میزان جذب نوری در اسیدیتته های ۵/۵ و ۶ در غلظت ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در اسیدیتته ۷ در غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که به‌طور معنی‌داری با میزان جذب نوری سایر غلظت‌ها در اسیدیتته‌های مختلف اختلاف داشت ($p < 0/05$).

قرائت تغییرات جذب نوری در غلظت‌های مختلف و اسیدیتته‌های مورد مطالعه حاکی از کاهش آن با افزایش غلظت آسکوربیک اسید بود.

جدول ۲- اثر ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک بر روی استرپتوکوکوس اینیایی در محیط کشت TSB در اسیدیتته‌های مختلف

اسید آسکوربیک			
pH			گروه‌های شاهد
۷	۶	۵/۵	
۰/۳۶۲±۰/۰۰۵	۰/۳۷۵±۰/۰۱۰	۰/۳۶۸±۰/۰۰۵	شاهد TSB
a ۱/۰۹±۰/۰۳۲	a ۰/۹۶۲±۰/۰۱۲	a ۰/۶۹۴±۰/۰۱۸	شاهد استرپتوکوکوس اینیایی
b ۰/۳۹۲±۰/۰۲۷	b ۰/۳۹۸±۰/۰۲۵	b ۰/۳۹۵±۰/۰۱۷	اسید آسکوربیک شاهد
گروه‌های درمان بر حسب غلظت اسید آسکوربیک (µg/ml)			
ac ۱/۱۲۷±۰/۰۰۷	ac ۰/۹۷۵±۰/۰۲۳	ac ۰/۷۴۰±۰/۰۲۱	۱۹/۵۳
ac ۱/۰۷۲±۰/۰۱۴	ac ۰/۹۵۳±۰/۰۱۷	ac ۰/۷۳۵±۰/۰۲۰	۳۹/۰۶
ac ۰/۹۷۰±۰/۰۲۲	ac ۰/۹۲۰±۰/۰۱۵	ac ۰/۶۴۰±۰/۰۳۵	۱۵۶/۱۲۵
ac ۰/۹۲۱±۰/۰۱۶	ac ۰/۸۶۵±۰/۰۲۵	ac ۰/۶۱۱±۰/۰۳۴	۳۱۲/۵
ac ۰/۸۸۵±۰/۰۲۳	ac ۰/۸۳۵±۰/۰۱۴	ac ۰/۵۳۵±۰/۰۱۵	۶۲۵
ac ۰/۸۵۵±۰/۰۳۸	ac ۰/۷۷۲±۰/۰۱۵	ac ۰/۵۰۸±۰/۰۳۵	۱۲۵۰
acd ۰/۷۲۸±۰/۰۲۲	bdefghi ۰/۴۴۶±۰/۰۰۵	bdefghi ۰/۲۸۱±۰/۰۱۵	۲۵۰۰
bdefghi ۰/۳۸۷±۰/۰۱۹	bdefghi ۰/۳۱۸±۰/۰۲۲	bdefghi ۰/۲۶۲±۰/۰۲۱	۵۰۰۰

اعدادی که در هر ستون با حروف متفاوت مشخص شده‌اند، نشان‌دهنده اختلاف معناداری هستند ($p < 0/05$).

ث به پیراشکی‌های تهیه‌شده از گوشت گاو منجر به کاهش معنی‌دار رشد باکتری‌ها در مقایسه با گروه شاهد شد (۱۰). یافته‌های تاباک و همکاران بر روی نقش آسکوربیک اسید و مشتقات آن از قبیل پالمیتول آسکوربات نشان داد که آسکوربیک اسید در محدوده غلظت (۵۰-۱۰۰ mM) ۱۰-۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در محیط کشت مایع تحت شرایط میکروانروفلیک مانع رشد هلیکوباکتر پیلوری شد. در مقابل تحت شرایط هوازای آسکوربیک اسید در محدوده غلظت (۱۰-۱۰۰ mM) ۲۰-۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری بقای هلیکوباکتر پیلوری را افزایش داد. مشتق آب‌گریز آسکوربیک اسید تحت دو شرایط هوازی و میکروانروفلیک در محدوده غلظت (۰/۱-۱ mM) ۰/۴-۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر قوی ضد باکتریایی نشان داد. نتایج پیشنهاد می‌کنند که مشتقات مهم آسکوربیک اسید در از بین بردن هلیکوباکتر پیلوری در محیط آزمایشگاه و در بدن مورداستفاده قرار گرفته و خطر بیماری‌های معدی را کاهش می‌دهد و همچنین با استفاده از غلظت‌های ۰/۲ تا ۲ درصد ویتامین ث رشد چندین میکروارگانیزم از جمله هلیکوباکتر پیلوری، باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس را مهار کنند (۲۱). Khezri and etal در سال ۲۰۱۲ اثر آسکوربیک اسید به همراه

بررسی اثر آسکوربیک اسید در مقایسه با سیتریک اسید و لاکتیک اسید در اسیدیته ۳ الی ۶/۵ به‌منظور ممانعت از لیستریا مونوسیتوژنز در دماهای ۴ تا ۱۰ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت تریپتون سویا براث نشان داد که در اسیدیته ۴ آسکوربیک اسید بیشترین اثر ممانعت‌کننده را نسبت به سیتریک اسید و لاکتیک اسید از خود نشان داد که می‌توان آن را به pKa بالای آسکوربیک اسید نسبت داد (۸). Ibrahim Tajkarimi و Cliver در سال ۲۰۱۰ اثر ضد میکروبی آسکوربیک اسید به‌تنهایی یا در ترکیب با لاکتیک اسید روی اشریشیا کلی در محیط کشت آب‌گوش Brain Heart Infusion و در آب هویج به‌عنوان یک مدل غذایی مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آن‌ها پیشنهاد می‌کند که کاربرد آسکوربیک اسید در ترکیب با لاکتیک اسید ممکن است به‌عنوان نگه‌دارنده اثری بالقوه داشته باشد تا از رشد اشریشیا کلی O157Hv در غذا جلوگیری کند. مطالعات انجام‌شده پیشنهاد می‌کنند که آسکوربیک اسید در ترکیب با ارگانیک اسیدهای انتخابی مثل پروپیونیک اسید در گوشت‌های قطعه‌قطعه شده گاو و در ترکیب با لاکتیک اسید تاثیر ضد باکتریایی علیه لیستریا مونوسیتوژنز دارد (۲۳). مطالعه Giroux and etal در سال ۲۰۰۱ نشان داد که افزودن ویتامین

جدول ۳- اثر ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک بر روی لاکتوکوکوس گارویه در محیط کشت TSB در اسیدیته‌های مختلف

اسید آسکوربیک			
pH			گروه‌های شاهد
۷	۶	۵/۵	
۰/۳۶۲±۰/۰۰۳	۰/۳۷۵±۰/۰۰۵	۰/۳۶۸±۰/۰۰۲	شاهد TSB
a ۰/۹۹۸±۰/۰۲۸	a ۰/۹۴۸±۰/۰۱۸	a ۰/۶۸۵±۰/۰۱۰	شاهد لاکتوکوکوس گارویه
b ۰/۳۸۰±۰/۰۲۰	b ۰/۳۸۵±۰/۰۱۵	b ۰/۳۸۱±۰/۰۱۱	اسید آسکوربیک شاهد
گروه‌های درمان برحسب غلظت اسید آسکوربیک (µg/ml)			
ac ۱/۱۰۵±۰/۰۳۰	ac ۰/۹۵۰±۰/۰۲۰	ac ۰/۷۲۵±۰/۰۱۵	۱۹/۵۳
ac ۱/۰۵±۰/۰۲۰	ac ۰/۹۳۵±۰/۰۱۵	ac ۰/۷۱۵±۰/۰۱۵	۳۹/۰۶
ac ۰/۹۴۵±۰/۰۱۵	ac ۰/۸۹۰±۰/۰۱۱	ac ۰/۶۲۵±۰/۰۲۵	۱۵۶/۱۲۵
ac ۰/۸۹۵±۰/۰۰۵	ac ۰/۸۳۵±۰/۰۱۵	ac ۰/۵۸۵±۰/۰۲۰	۳۱۲/۵
ac ۰/۸۲۵±۰/۰۱۵	ac ۰/۸۰۱±۰/۰۱۱	ac ۰/۵۰۱±۰/۰۱۱	۶۲۵
ac ۰/۷۸۹±۰/۰۲۹	ac ۰/۷۷۲±۰/۰۰۸	acde ۰/۴۸۵±۰/۰۱۵	۱۲۵۰
acdef ۰/۶۷۵±۰/۰۱۵	bdefghi ۰/۴۰۵±۰/۰۰۵	bdefghi ۰/۲۶۸±۰/۰۱۲	۲۵۰۰
bdefghij ۰/۳۴۵±۰/۰۱۵	bdefghi ۰/۲۹۵±۰/۰۱۵	bdefghi ۰/۲۵۶±۰/۰۱۶	۵۰۰۰

اعدادی که در هر ستون با حروف متفاوت مشخص شده‌اند، نشان‌دهنده اختلاف معناداری هستند ($p < 0/05$).

9. Gill, A. O., Holley, R. A. 2003. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 C. *International Journal of Food Microbiology*, 80(3):251-9.
10. Giroux, M., Ouattara, B., Yefsah, R., Smoragiewicz, W., Saucier, L., Lacroix, M. 2001. Combined effect of ascorbic acid and gamma irradiation on microbial and sensorial characteristics of beef patties during refrigerated storage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(2):919-25.
11. Haghighi, M., Sharif Rohani, M., Samadi, M., Tavoli, M., Eslami, M., Yusefi, R. 2014. Study of effects *Aloe vera* extract supplemented feed on hematological and immunological indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(6):2143-54.
12. Imoto, T., Johnson, L. N., North, A. C. T., Phillips, D. C., & Rupley, J. A. 1972. 21 Vertebrate Lysozymes. *The enzymes*, 7:665-868.
13. Raissy, M., Ansari, M. 2011. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran fish farms. *African Journal of Biotechnology*, 10(8):1473-6.
14. Khezri Ahmadabad, M., Rezaei, M., Ojagh, M. 2012. The effect of ascorbic acid combined with whey protein coating on the shelf-life of rainbow trout stored at refrigerator temperature: Microbial and chemical analyzes. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & amp. Food Technology*, 7(3):69-78.
15. Leonhardt, C. W. M., Scheeder, MR. 2000. Monogastric Nutrition and Potential for Improving Muscle Quality. Antioxidants in Muscle Foods: Nutritional Strategies to Improve Quality:199.
16. MacLeod, D., Ozimeck, L., & Kennelly, J. J. 1996. Supplemental vitamin C may enhance immune function in dairy cows. In Proc. Western Canadian Dairy Seminar, *Advances in Dairy Technology*, 8:227-235.
17. Prieto, N., Andrés, S., Giráldez, FJ., Mantecón, A., Lavín, P. 2008. Ability of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to estimate physical parameters of adult steers (oxen) and young cattle meat samples. *Meat Science*, 79(4):692-9.
18. Ravelo, C., Magariños, B., López-Romalde, S., Toranzo, A. E., Romalde, J. L. 2003. Molecular fingerprinting of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of clinical microbiology*, 41(2):751-6.
19. Reno, P., Woo, P., Bruno, D. 1999. Fish diseases and disorders: viral, bacterial, and fungal infections. *Fish Diseases and Disorders: Viral, Bacterial and Fungal Infections*.
20. Ronald, J., R. Roberta. 2001. Fish diseases by bacterial pathogens.

پوشش پروتئین آب‌پنیر بر ماندگاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دمایی یخچال به‌منظور ارزیابی بار میکروبی و ویژگی‌های شیمیایی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاصل نشان‌دهنده تأثیر ضد باکتریایی پوشش خوراکی پروتئین آب‌پنیر حاوی ویتامین ث بود که توانست زمان نگهداری فیله‌های پوشش داده‌شده را به مدت ۴ روز افزایش دهد. به‌طور کلی بین تیمارهای مختلف حاوی ویتامین ث اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (۱۴).

نتیجه گیری

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد کاربرد آسکوربیک اسید در اسیدیت‌های ۵/۵، ۶ و ۷ بر باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گاریوه دارای اثر مہاری رشد بود، توان مہاری آسکوربیک اسید علیه هر دو باکتری فوق در اسیدیت‌های ۵/۵ و ۶ در مقایسه با اسیدیت‌های ۷ به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ($p < 0.05$). نتایج به‌دست‌آمده حاکی از بالا بودن توان ضد میکروبی آسکوربیک اسید در اسیدیت‌های پایین‌تر در مقایسه با pH قلیایی بوده است، بنابراین خاصیت ضد میکروبی اسید آسکوربیک در این پژوهش در ماهی مورد نظر به اثبات رسید، لذا پیشنهاد می‌شود که از آسکوربیک اسید به‌عنوان نگهدارنده‌ی طبیعی در ماهی‌ها به‌ویژه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌توان استفاده کرد.

منابع مورد استفاده

1. Agnew, W., Barnes, A.C. 2007. *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary microbiology*, 122(1):1-15.
2. Akhond Zade Basti, A., Ebrahim zade Moosavi, H. 2012. Food stuff hygiene with the Field of aquatic. Tehran University publication:132-150.
3. Bendich, A. Vitamins and Immunity1. *The Journal of nutrition*. 1992;122(3S):601.
4. Bercovier, H., Ghittino, C., Eldar, A. 1996. Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. *Developments in biological standardization*, 90:153-60.
5. Brubacher, D., Moser, U., Jordan P. 2000. Vitamin C concentrations in plasma as a function of intake: a meta-analysis. *International journal for vitamin and nutrition research*, 70(5):226-37.
6. Chen, S.C., Liaw, L.L., Su, H. Y., Ko, S. C., Wu, C. Y., Chung, H. C., et al. 2002. *Lactococcus garvieae*, a cause of disease in grey mullet, *Mugil cephalus* L., in Taiwan. *Journal of fish diseases*, 25(12):727-32.
7. Davies, M. B., Austin, J., Partridge, D. A. 1991. Vitamin C: its chemistry and biochemistry: royal society of chemistry.
8. Giannuzzi, L., Zaritzky, N. E. 1996. Effect of Ascorbic Acid in Comparison to Citric and Lactic Acid on *Listeria monocytogenes* Inhibition at Refrigeration Temperatures. *LWT-Food Science and Technology*, 29(3):278-85.

- In: Fish Pathology. 3rd Edition. New York: W. B. Saunder. 234 -235.
21. Tabak, M., Armon, R., Rosenblat, G., Stermer, E., Neeman, I. 2003. Diverse effects of ascorbic acid and palmitoyl ascorbate on *Helicobacter pylori* survival and growth. *FEMS microbiology letters*, 224(2):247-53.
22. Tajkarimi, M., Ibrahim, S.A. 2011. Antimicrobial activity of ascorbic acid alone or in combination with lactic acid on *Escherichia coli* O157: H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Control*, 22(6):801-4.
23. Tajkarimi, M., Ibrahim, S. A., Cliver, D. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, 21(9):1199-218.
24. Wang, C. Y. C., Shie, H. S., Chen, S. C., Huang, J. P., Hsieh, I. C., Wen, M. S., et al. 2007. *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks. *International journal of clinical practice*, 61(1):68-73.
25. Zhang, G., Darius, S., Smith, S., Ritchie, S. 2006. In vitro inhibitory effect of hen egg white lysozyme on *Clostridium perfringens* type A associated with broiler necrotic enteritis and its α -toxin production. *Letters in applied microbiology*, 42(2):138-43.

