تعیین مقادیر هیستامین و رابطه آن با بار میکروبی در ماهی شوریده *(Otolithes ruber)* نگهداری شده در یخ

امیرمجتبی ستوده، سهراب معینی، مژگان نبی‌اردلانی

گروه شیلات، دانشکده علوم وفنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

چکیده

در این مطالعه، در ماهیان شوریده نگهداری شده در یخ طی یک دوره ۱۸ روزه، غلظت آمین بیوژن هیستامین و ارتباط آن با تغییرات بار باکتریایی (باکتری‌های سرمادوست و مزوفیل) در بازه‌های زمانی ۳ روزه مورد بررسی قرار گرفت (روزهای صفر، ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵ و ۱۸). آمین بیوژن هیستامین در روز اول نگهداری ماهیان بوسیله دستگاه HPLC تشخیص داده نشد (ردیابی نشد) و ردیابی این آمین از روز پنجم نگهداری بود. بهترین میزان همبستگی (R۲=%۹۸) بین آمین هیستامین و بار باکتریایی مزوفیل یافت شد و این باکتری‌ها، در طول دوره تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۵) را نشان دادند. غلظت اولیه هیستامین ۱/۴۹ میکروگرم بر گرم بود و در انتهای دوره به ۱۴/۲۱ میکروگرم بر گرم رسید که در این زمان بار باکتریایی مزوفیل به بیش از ۱۰۷CFU/g رسیده بود. بنظر می‌رسد که تغییرات سطوح هیستامین شاخص مناسبی برای ارزیابی تازگی ماهی شوریده بر اساس نتایج این تحقیق باشد.

کلمات کلیدی

آمین بیوژن، پوترسین یا هیستامین، ماهی شوریده، بار باکتریایی، نگهداری در یخ

مقدمه

آمین‌های بیوژن (BAS) مولکول‌های کوچک آلی با پایهٔ ساختاری آلیفاتیک، آروماتیک و هیدروسیکلیک می‌باشند. آنها توسط آنزیم‌های دکربوکسیلاز باکتریایی از اسیدهای آمینه آزاد در مواد غذایی شکل می‌گیرند (Taylor & Summer, 1987)

این پدیده در مواد غذایی و به خصوص در گوشت و ماهی تولیدی در نتیجهٔ پدیده‌های فیزیولوژیک یا در نتیجهٔ رشد باکتری‌ها همراه با دورهٔ تخریبی آنها به وفور رخ می‌دهد.

باکتری‌های مستعد مختلف که قادر به دکربوکیلاسیون اسیدهای آمینه می‌باشند در عضله ماهی در محیطی ایزوله وجود دارند (Taylor 1989, Yoshinaya and Frank 1982, Moori *et al*., 1986, Okuzumi *et al*., 1990). آنها شامل باکتری‌های مزوفیلیک و سایکروفیلیک بوده و بیشتر آنها دارای آنزیم دکربوکسیلاز می‌باشد. در بین آمین‌ها، هیستامین به صورت غالب در مسمومیت غذایی نقش دارد و آمین‌های مشابه پرترسین و کدورین در تشدید و ازدیاد حالت منفی هیستامین معروفند (Bjeldanes *et al*, 1978). عضله ماهی مستعد شکل‌گیری مجموعه وسیعی از نژاد خاص باکتریایی و ترکیبی آمین‌های بیوژن که از دکربوکیلاسیون اسیدهای آمینه بوجود می‌آیند، می‌باشد.

شکل‌گیری آمین‌های بیوژن در ماهی و محصولات دریایی مربوط به اسیدهای آمینه موجود در ماهی و وجود باکتری‌های تولیدکننده آنها و شرایط مساعد محیطی می‌باشد (Shalaby, 1996; Silla-Santos, 1996).

در طول نگهداری ماهی در یخ، میکروفلورها بواسطه عوامل مختلفی تغییر می‌یابند. باکتری‌های گرم منفی تخمیرکننده (Vibrionacea) در فساد نگهداری نامناسب ماهی در جاییکه باکتری‌های گرم منفی سایکرو تولرانتها (مانند جنس *Pseudomonas* و جنس *Shewanella*) بر روی ماهی رشد می‌کنند دیده می‌شود (Gram & Hass, 2000). مفهوم خاص تخریب ارگانیکی SSO کمک قابل ملاحظه‌ای به درک مفهوم فساد غذایی در ماهی می‌نماید. فساد ارگانیسمی غذای دریایی تولید آمونیاک، آمین‌های بیوژن، اسیدهای آلی و ترکیبات سولفور از اسیدهای آمینه و استات از لاکتات و هیپو گزانتین در نتیجه تولید کم ATP، می‌نماید.

هیستامین‌ها در نتیجهٔ دکربوسیکلاسیون اورنتین بوجود آمده و به عنوان یک شاخص مطرح در مورد تازگی ماهی مطرح می‌باشد و در مراحل اولیه فساد آن ظاهر می‌شود (Dawood *et al*., 1988, Fernanadez-Salyucro *et al*., 1987, Yamanaka, 1989). ذخیره‌سازی ماهی و سایر آبزیان خوراکی در یخ روش متداولی از نگهداری ماهی برروی عرشهٔ کشتی و ساحل دریا می‌باشد. مطالعات علمی زیادی تأثیر دما بر شکل‌گیری آمین‌ها در ماهی را نشان دادند (Behling and Taylor 1982, Lopez-Sabater *et al*., 1996 Koutsoumanis *et al*., 1999). گزارش‌هایی از فرم‌های متعدد آمین‌ها در ماهی در طول ذخیره‌سازی آن در یخ ارائه شده است، چنین اختلافاتی اساساً نتیجهٔ گونه میکرو فلورای موجود در ماهی و مرحله زیستی آن می‌باشد (Middlebrooks *et al*., 1968; Loperz-Sabater *et al*., 1996). به محض ورود هیستامین به جریان خون،اثرات سمی بروز می‌نمایند. اثر روده‌ای درانسان شامل آنزیم‌های دی آمین اکسیداز (DAO) و هیستامین -N- متیل ترنسفراز (HMT) که هیستامین را به محصولات بی‌ضرر فساد تبدیل می‌کند، می باشد. هر چند در مورد غلظت‌های بیشتر هیستامین ظرفیت DAO و HMT برای سم‌زدایی هیستامین محدود شده و به محض ورود هیستامین به جریان خون، سبب بروز اثرات سمی می‌شود (Taylor, 1986). پوتر سین و کاداورین می‌توانند این واکنش‌های آنزیمی را متوقف ساخته و بنابراین سمیت هیستامین را تقویت نمایند (Eitenmilfer et al., 1980).

روش‌هایی از قبیل تکنیک‌های فلور سنجی، آنزیمی و کروماتوگرافی مانند کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) (Chin & Kochler. 1983; Fleischer), 1979 و کروماتوگرافی گاز مایع (GLC) (Starusckiewicz & Bond, 1981) و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) (Mietz & Karmas 1977; Yen & Hsich, 1991) برای آنالیزو تجزیه آمین‌های بیوژنی مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و میکروبی

حلال‌های استاندارد آمین با درصد تعریف شده در دستگاه HPLC و سایر موادی که برای HPLC مورد استفاده قرار گرفتند مانند تری‌کلرو استیک اسید (TCA)، HCL، MaoH، NaCl، n- هپتان، متانول، آب مقطر، آب غیر یونیزه آگار مغزی و بنزوئیل کلرید که برای ایجاد مشتقات و سنتز مورد استفاده واقع شده، نیز فراهم شدند.

تهیه نمونه‌های ماهی و شرایط ذخیره

ظرفیت آمین بیوژن (پوترسین) در ماهی شوریده (Otolithes ruber) در طول دوره ۱۸ روزه ذخیره در یخ (روزهای صفر، سوم، ششم، نهم، دوازدهم، پانزدهم و هیجدهم) کنترل شده و تغییرات بار باکتریایی مربوطه (سایکروفیل‌ها و مزوفیل‌ها)نیز مطالعه گردید. ماهی تازه شوریده از هندیجان (استان خوزستان) به دست آمده و سریعاً به آزمایشگاه منتقل گردید. میانگین طول و وزن ماهی‌ها به ترتیب برابر با ۳۳۰ میلی‌متر و ۴۰۰ گرم بود. ماهی‌ها در فروردین ۱۳۸۷ نمونه‌گیری شدند. ماهی‌ها تحت شرایط یخ‌گذاری در جعبه‌های عایق‌بندی شده که مجهز به خروجی‌هایی برای خارج ساختن آب حاصل از ذوب یخ بود ذخیره شدند. یخ‌های جایگزین روزانه اضافه شده ودر نتیجه دما به صورت یکنواخت حفظ شد. نسبت یخ به ماهی (۳ به ۱) در طول آزمایش ثابت نگه داشته شد. نمونه‌های ماهی در روزهای صفر و سپس ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸ ماهی که منجمد نبوده است. جهت انجام آنالیز خارج و از لحاظ مجموع بار باکتریایی و از لحاظ آمین‌های بیوژنی آنالیز شدند.

آنالیز میکروبیولوژیکی

مقدار ۲۵ گرم از عضله بخش پشتی- شکمی هر ماهی گرفته شد و با ۲۲۵ میلی لیتر سرم استریل فیزیولوژیک (Nad ۰/۸۵ درصد) همگن شده و توالی رقت‌های اعشاری هر نمونه همگن با همان سرم رقیق‌کننده انجام شد. برای تعیین بار میکروبی، نمونه‌های ۵/۱ میلی لیتری از ردیف رقت‌های (رقیق‌کننده ۱:۱۰، ۰/۱ درصد آب- پپتون) همگن ماهی در سطح محیط کشت خشک پخش شدند. پلیت‌ها در دماهای ۲۰برای باکتری‌های سایکروتروفی و ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای باکتری‌های مزوفیلی انکوبه و جداسازی شدند. پس ازدوره مناسب انکو باسیون (۴۸ ساعت) داده‌های میکروبیولوژیکی جمع‌آوری شده و به لگاریتم تعداد واحدهای شکل کلونی ($cfug^{-1}$) تبدیل شدند.

آنالیز شیمیایی

روش HPLC

کروماتوگرافی مایع شامل توالی‌ها (سری‌های) Shimadzu مدل ۱۰AD برای HPLC بوده که مجهز به دستگاه آشکارساز طول موج‌های متغییر قابل رؤیت فرابنفش در طول موج ۲۵۴ نانومتر می‌باشد. در تمام تفکیک‌ها از یک لیکروسفر RP-۱۸ ۱۰۰ [۲۴۴۳۴/۴ میلی لیتر I.D ستون ۵ میلی لیتری مرتبط با پیش ستون ضامن لیکرو سفر (۱۰۳۴/۶ میلی‌متر I.D)] و ترموستات در دمای ۳۰Ċ در یک آون ستون شیمادزو CTO -۱۰A استفاده شد. جمع‌آوری داده‌ها و انجام تغییرات بر روی آنها با استفاده از نرم‌افزار اتوماتیک شیمادزو CLASS-VP برای کروماتوگرافی انجام شد. برای اختلاط کامل محلول‌ها از یک مخلوط‌کننده سینتیفیکا Velp استفاده شد. برای تفکیک BAها (آمین‌های بیوژنی) از نمونه‌های ماهی از یک سانتریفوژ منجمد با حداکثر سرعت (سوروال RC-5B) استفاده شد.

آنالیز آمین‌های بیوژنی(آنالیز شیمیایی)

تهیه محلول‌های استاندارد

محلول استاندارد ذخیره از طریق حل کردن دقیق ۰/۱ گرم هیستامین (سیگما) در ۱۰ میلی لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۵٪ (TCA) به دست آمد. محلول‌های استاندارد در مورد استفاده از طریق رقیق کردن ۱ میلی‌متر از هر محلول استاندارد ذخیره در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شدند.

تهیه نمونه برای آنالیز آمین بیوژن

استخراج

۵۰ گرم از ماهیچه کناری نیمه پشتی- شکمی هر ماهی در ۷۵ میلی لیتر از محلول ۵ درصد اسید تری کلرو استیک (TCA) به مدت ۲ دقیقه به صورت همگن مخلوط شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۴۰۰۰ سانتریفوژ گردید. به این ترتیب محلول supernatant به دست آمده و با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۱ فیلتر شده و به داخل بالون ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. ماده باقیمانده در لوله آزمایش به دستگاه همگن‌کننده بازگردانده شده و این روش سه بار تکرار شد. در مرحله بعد ۱۰ میلی لیتر از محلول استخراج شده با ۴ گرم NaCl، ۱ میلی‌لیتر NaOH (۵۰ درصد) و ۵ میلی لیتر ترکیب کلروفرم- بوتانول (۱ به ۱) در لوله آزمایش مخلوط شده و به مدت ۲ دقیقه بر روی دستگاه لرزاننده قرار گرفت. سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰rpm سانتریفوژ شد و لایه آلی رویی به دست آمد. این مرحله سه بار تکرار و ۱۵ میلی متر n- هپتان و ۱ میلی لیتر HCL ۰/۲ نرمال به آن اضافه شده و بر روی دستگاه لرزاننده قرار گرفت. این روش نیز سه بار تکرار شد. در نهایت ۱ میلی‌لیتر آب به آن افزوده شده و محلول تحت گاز N2 یا حمام تبخیر خشک شد (Mietz and Karmas, 1978).

تهیه مشتقات

یک میلی‌لیتر از محلول ۲ مولار NaOH و ۵ میکرو لیتر بنزوئل کلراید به ماده خشک استخراج شده اضافه شدند. این ترکیب در یک مخلوط‌کننده گردابی به شدت تکان داده شد و این عمل به مدت ۲۰ دقیقه ادامه یافت. ۲ میلی‌لیتر محلول NaCl اشباع برای جلوگیری از بنزوئیلاسیون افزوده شد. در نهایت ۲ میلی‌لیتر دی اتیل اتر اضافه گردید و سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰rpm سانتریفوژ شد. لایه آلی به این ترتیب به دست آمده و تحت گاز N2 یا حمام تبخیر خشک گردید (Dawood, 1988).

تزریق به HPLC

ماده خشک استخراج شده در روش‌های گفته شده در ۲۰۰ میکرو لیتر متانول با درجه HPLC حل و از صافی میلی‌پور (۰/۴۵ میکرومتر) عبور داده شد و ۲۰ میکرو لیتر از ماده فیلتر شده با استفاده از سرنگ همیلتون به HPLC تزریق شد. آمین‌ها تحت پرتو فرابنفش (UV) در طول موج ۲۵۴ نانو متر آشکار شده و تفکیک تحت فاز معکوس با شرایط ایزو کراتیک و با استفاده از یک فاز متحرک ساخته شده از متانول/ آب (با نسبت ۷۰ به ۳۰) و سرعت جریانی معادل ۱/۱ میلی لیتر در دقیقه صورت گرفت (Dawood, 1988).

تجزیه آماری

آزمایش‌ها با موقعیت‌های مختلف و با نمونه‌های متفاوت صورت گرفتند. تجزیه آماری برای هر تکرار انجام شد. داده‌های حاصل تحت تجزیه واریانس (ANOVA) قرار گرفتند. روش حداقل تفاوت معنی دار (LSD) در Spss برای آزمون تفاوت‌های بین میانگین‌ها مورد استفاده قرار گرفت. نتایج آنالیزهای آمین‌های میکروبیولوژیکی و بیوژنی به صورت میانگین ارزش‌ها ± خطای استاندارد گزارش شدند.

نتایج

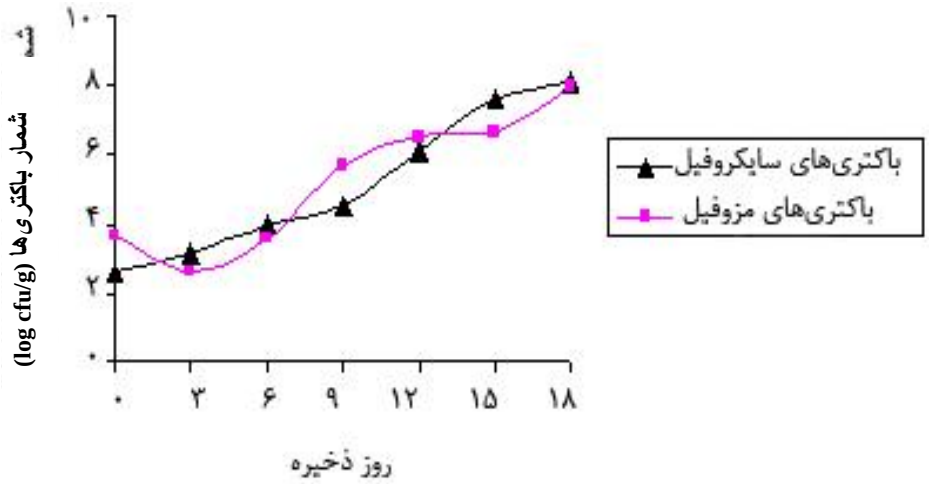
تغییرات حاصل در کل شمارش باکتریایی (لگاریتم cfu/g) در ماهی Otolithes ruber در طول دوره ذخیره در جدول (۱) نشان داده شده است. شمارش‌های اولیه قابل رؤیت مزوفیلی و سایکروفیلی Otolithes ruber به ترتیب معادل ۳/۶ و ۲/۶ log cfu/g بودند. مجموع باکتری‌هایی مزوفیلی در ماهی‌های تازه در ذخیره انجماد یا یخ به اندازه یک واحد لگاریتمی در دوره اولیه (۳ روز) کاهش یافته و سپس به طور ثابت تا $۱۰^{۳}cfug^{-1}$ در ۶ روز ذخیره افزایش یافت. کاهش اولیه در مجموع باکتری‌های مزوفیلی احتمالاً به دلیل تأثیر شوک سرما بوده است (Ingram, 1951) مجموع باکتری‌های سایکروتروفی که در ابتدا یک واحد لگاریتمی کمتر از باکتری‌های مزوفیلی بودند به طور ثابت در ذخیره افزایش یافتند و به سطحی معادل $۱۰^{۸}cfug^{-1}$در روز هیجدهم رسیدند. در بین مجموع باکتری‌های سایکروتروفی، ظرفیت باکتری‌ها در تولید آمین‌ها در ماهی در ابتدا بسیار کم بوده اما در طول دوره ذخیره به سرعت افزایش یافته و به سطح $۱۰^{۸}cfug^{-1}$ رسید. افزایش معادل ۲ واحد لگاریتمی در مجموع بار مزوفیل‌ها و سایکروفیل‌ها به ترتیب در روزهای نهم و دوازدهم ذخیره مشاهده گردید. مجموع بار باکتریایی مزوفیلی و سایکروفیلی در روز پانزدهم و هیجدهم هیچ تفاوت معنی داری در سطح ۹۵ درصد نداشت ($P \geq ۰/۰۵$).

جدول ۱- مجموع شمارش باکتریایی در ماهی شوریده (*Otolithes rubber*) در طـول دوره ذخیـره در یـخ بـر حسـب $log\ cfug^{-1}$ (Mean±SD)

زمان ذخیره (d)	باکتری سایکروفیلی	باکتری مزوفیلی
۰	۲/۶۰ ± ۰/۴۲	۳/۶۰ ± ۰/۱۹
۳	۳/۱۸ ± ۰/۰۸	۲/۵۷ ± ۰/۱۱
۶	۳/۹۷ ± ۰/۴۲	۳/۵۸ ± ۰/۱۵
۹	۴/۵۵ ± ۰/۲۱	۵/۶۹ ± ۰/۲۵
۱۲	۶/۰۹ ± ۰/۰۷	۶/۵۱ ± ۰/۰۲
۱۵	۷/۶۲ ± ۰/۱۶	۶/۶۳ ± ۰/۰۳
۱۸	۸/۰۹ ± ۰/۱۲	۷/۹۵ ± ۰/۰۰

نتایج آزمون حداقل معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ (P<۰/۰۵)

در طول دوره ذخیره اولیه به صورت نگهداری در یخ، یک واحد لگاریتمی کاهش در بار باکتریایی مزوفیلی دیده شدو سپس تا $۱۰^{۷}cfug^{-1}$ در روز هجدهم افزایش یافت. در طول دوره ذخیره باکتری‌های سایکروتروفی تکثیر یافته و تعداد آنها غالب شد زیرا دمای کم بر رشد آنها تأثیر مثبت داشته و در روز هیجدهم تعداد آنها تا $۱۰^{۸}cfug^{-1}$ افزایش یافت. تجزیه آماری تفاوت‌های معنی‌داری را بین بار اولیه و نهایی (روز هجدهم) باکتریایی در شرایط یخ‌گذاری نشان داد (P<۰/۰۵). همبستگی زیادی (R^2=۰/۹۸) بین بار باکتری‌های مزوفیلیکی ($۱۰^{۷}$ در روز نهایی) و آمین بیوژنی هیستامین مشاهده گردید. تغییرات حاصل در بار کل باکتریایی مزوفیل و سایکروفیل در کل ماهی‌های ذخیره شده در شکل (۱) نشان داده شده است.



شکل ۱- نمودار میانگین بار باکتریایی مزوفیل و سایکروفیلی در ماهی *Otolithes ruber* در طول دوره ذخیره در یخ

غلظت‌های پوترسین در ماهی Otolithes ruber نگهداری شده در یخ به مدت ۱۸ روز در جدول ۲ نشان داده شده است. هیستامین در روز اول (روز صفر) ذخیره آشکار نشده و برای اولین بار در روز پنجم ذخیره آشکار شد. تغییرات و نوسانات زیادی در سطوح هیستامین در سرتا سر دوره ذخیره در ماهی Otolithes ruber مشاهده گردید.

جدول ۲- میانگین آمین بیوژن هیستامین در ماهی شوریده (*Otolithes ruber*) نگهداری شده در یخ (µgr/gr) (Mean±SD)

زمان ذخیره (روز)	هیستامین
۰	غیر قابل تشخیص
۳	غیر قابل تشخیص
۶	۱/۴۹ ± ۰/۰۵
۹	۷/۶۳ ± ۰/۰۴
۱۲	۱۰/۰۲ ± ۰/۲۲
۱۵	۱۰/۳۷ ± ۰/۵۳
۱۸	۱۴/۲۱ ± ۰/۰۹

سطح این آمین در طول ذخیره ۱۸ روزه افزایش یافت. دو ۱، ۲ در غلظت هیستامین در روزهای ۹ و ۱۸ ذخیره یعنی وقتی که بار باکتریایی مزوفیلی به ترتیب به ۱۰۵ و $۱۰۸cfug^{-1}$ رسید. مشاهده گردید تجزیه آماری، تفاوت‌های معنی‌داری را بین اولین و آخرین روز ذخیره نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری

در آنالیز انجام گرفته بر روی ماهی شوریده نگهداری شده در یخ هیستامین در روز اول تا پنجم آشکار نشد که دلیل احتمالی آن عدم بیان فعالیت باکتریایی مزوفیلیک تحت شرایط خاص ذخیره در این تحقیق می‌باشد. در تحقیق مشابهی ایجاد آمین بیوژنی و رابطه آنان با تغییرات حسی و میکروبی کل و بخش صاف شده (عبور داده شده از صافی) قزل‌آلای رنگین کمانی که به صورت نگهداری در یخ بود نشان داد که غلظت هیستامین در طول ۱۸ روز یعنی هنگامی که باکتری‌های مزوفیلی به سطحی معادل $۱۰۷cfug^{-1}$ رسیدند افزایش یافت (Chytiri *et al*., 2004). هر چند گزارش‌هایی در دست است که نشان می‌دهند انواع و سطوح BAهای شکل گرفته به میکروفلورها و شمارش بستگی دارند (Vrciana-Noques *et al*., 1997). داهار و سیماردر سال ۱۹۸۵ نشان دادند که در مورد گوشت گاو شمارش باکتریایی مزوفیلی همبستگی خوبی با

ایجاد هیستامین دارد که با نتایج به دست آمده در این آزمایش در مورد ماهی Otolithes ruber تحت شرایط ذخیره منجمد سازگار می‌باشد. در تحقیقی نشان داده‌شده که باکتری‌های مزوفیلی مسئول دکربوکسیلاسیون آمینو اسید هیستیدین هستند که منجر به ایجادهیستامین می‌شود (Okuzumi *et al*., 1990). در تحقیقی مشابه بهترین همبستگی بین هیستامین با بار باکتریایی مزوفیلی در قزل‌آلای رنگین کمانی در طول دوره ۱۸ روزه ذخیره به صورت منجمد تعیین گردید (منتظری،۱۳۸۴). به طور کلی آمین‌ها در ماهی‌ها توسط باکتری‌های متعلق به خانواده انترو باکتریاسه مانندلاکتوباسیلوس و کلوستریدیوم ایجاد می‌شوند (Taylor, 1986). اما این مطلب فقط در مورد ماهی‌هایی صادق است که در دمای ۲۰ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند. در مورد ماهی‌هایی که در یخ ذخیره می‌شوند. باکتری‌های متعلق به خانواده انتروباکتریاسه (مزوفیلی) بسیار اندک بوده و بنابراین این گروه از باکتری‌های اصلی ایجادکننده آمین نیستند. از طرفی بیان شده که در دمای پایین باکتری‌های متعلق به خانواده انترو باکتریاسه در ایجاد آمین‌ها خیلی فعال نیستند (Moori *et al*., 1986). هر چند، باکتری‌های متعلق به خانواده ویبر یوناسه، ویبریو، آئروموناس و فتو باکتریوم (سایکروفیلی) در ذخیره یخ، بقای خود را حفظ کرده، به کندی تکثیر یافته و به باکتری‌های غالب ایجادکننده آمین در مراحل بعدی در ماهی‌های ذخیره شده در یخ تبدیل می‌شوند. ارزشی از هیستامین معادل ۱۲ تا ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم که برای تمام قزل‌آلاهای رنگین کمانی که پس از ۱۲ روز ذخیره به دست آمد ممکن است به عنوان حد بالایی برای آغاز فساد (باز دارنده تازگی) در قزل‌آلای رنگین کمانی، در نظر گرفته شود که این مطلب براساس داده‌های حسی و میکروبیولوژیکی (مجموع شمارش زیست پذیر معادل ۱۰۶ تا ۱۰۷) عنوان می‌گردد (Chytiri et al., 2004).

سطحی از هیستامین معادل ۵ میکروگرم در گرم اولین علامت فرآیندهای استفاده در عضله‌های ماهی است. (Rodriguez *et al*., 1999). در این تحقیق، غلظت اولیه هیستامین معادل ۱/۴۹ میکروگرم در گرم بوده و در نهایت به ۱۴/۲۱ میکروگرم در گرم رسید یعنی زمانیکه بار باکتریایی مزو فیلی به بیش از $۱۰۷cfug^{-1}$ رسید و احتمالاً سطح پوترسین برای نشان دادن تازگی ماهی Otolithes ruber مناسب بود. هر چند گزارش‌های مختلفی حاکی از آن هستند که تفاوت‌هایی در ایجاد آمین‌ها در ماهی‌ها وجود دارد که عمدتاً به دلیل نوع و سطح میکروفلور موجود در ماهی است. عضله‌های ماهی سبب بقاء باکتری‌های ایجادکننده آمین بیوژن پس از مرحله قرارگیری در یخ می‌شوند که این نشان‌دهنده آن است که باکتری‌هایی که در محیط سرد تکثیر می‌یابند قادر به دکربوکسیله کردن آمینو اسیدها جهت ایجاد آمین‌ها می‌باشند. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که در مورد ماهی emperor، باکتری‌هایی تولیدکننده، هیستامین و پوترسین می‌توانند در طول دوره ذخیره در یخ به بقا وجود ادامه دارد و به سرعت تکثیر یابند و در ایجاد آمین‌ها نقش داشته باشند (Lopez-sabater *et al*., 1996). در این تحقیق به نظر می‌رسد که باکتری‌های غالب ایجادکننده آمین هیستامین عمدتاً به باکتری‌های مزوفیلی تعلق دارند. هر چند، جهت تعیین میزان سمیت تمام آمین‌های بیوژن و حفظ آنها در سطوح مطمئن در مواد غذایی مورد استفاده انسان، به تحقیقات بیشتری نیاز داریم.

منابع

منتظری، نعیم، ۱۳۸۴. اندازه‌گیری میزان تغییرات آمین‌های بیوژن و رابطه آنها با بار میکروبی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نگهداری شده در یخ. پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد لاهیجان.

Behling, A.R. & Taylor, S.L. (1982). Bacterial histamine production as a function of temperature and time of incubation. J Food Sci., 47: 1311-1314, 1317.

Bjeldanes, L.F., Shutz, D.E. & Morris,M.M. (1978). Etiology of scombroid poisoning Fcadaverine potentiation of histamine toxicity in guinea pigs. Food Cosmet.Toixicol., 16: 157-162.

Chin, K. D. H., & Koehler, P. E. (1983). Identification and estimation of histamine, tryptamine, phenylethylamine and tyramine in soy sauce by thin-layer chromatography of dansyl derivatives. Journal of Food Science, 48: 1826–1828.

Chytiri, S., Paleologos, E., Savvaidis, I.N. & Kontominas, M.G. (2004). Relation of biogenic amines with microbial and sensory changes of whole and filleted freshwater Rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) stored on ice. Journal of Food Protection, 67: (5) 960-965.

Daher N.S. & Simard R.E. (1985). Putrefactive amine changes in relation to microbial counts of ground beef during storage. J. Food Protect., 48: 54-58.

Dalgaard, P.(1995). Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. Int J Food Microbiol, 26: 319-333.

Dawood, A.A., Karkalas, J., Roy, R.N. & Williams, C.A. (1988). The occurrence of non-volatile amines in chilled-stored Rainbow trout (*Salmo irideus*). Food Chem., 27, 33-45.

Eitenmiller, R. Orr, J. & Wallis, W. (1980). “Histamine formation in fish: Microbiological and biochemical conditions.” From Chemistry and biochemistry of Marine Food Products, Publisher-AVI, Connecticut, USA, edited by R. Martin, pp39-50.

Fernandez-Salguero, J. & Mackie, I.M. (1987). Comparative rates of spoilage of Cllets and whole fish during storage of haddock (*Melanogrammes aegie-finus*) and herring (*Clupea herengus*) as determined by the formation of non-volatile amines. Int. J. Food Sci.Technol. 22, 385^390.

Fleischer, H.R. (1979). Diamines and polyamines. In J.C. Touchstone, & J. Sharma (Eds.), Densitometry in thin layer chromatography: practice and applications (pp. 241–250). New York: John Wiley.

Gram, L. & Huss, H.H.(2000). Fresh and processed fish and The Microbiological Safety and Quality of Foods, edn 1. Editedshellfish. In by Lund BM, Baird-Parker AC, Gould GW. London: Chapman & Hall; :472-506.

Ingram, M. (1951). The elect of cold on microorganisms in relation to food. Proc. Soc.Appl. Bacteriol. 14, 243-249.

Koutsoumanis, K., Lampropoulou, K. & George-John, E.N. (1999). Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial £ora of Mediterranean gilt-head sea bream (Sparus aurata) stored aerobically at 0, 8 and 151C. J. Food Prot., 62: 398-402.

Lopez-Sabater, E.I., Rodriguez-Jerez, J.J., Roig-Sagueus, A.X. & Mora-Ventura, M.A.T. (1996). Bacteriological quality of tuna fish (Thunnus thynnus) destined for canning: e¡ect of handling on the presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. J. Food Prot. 57: 318-323.

Middlebrooks, B.L., Toom, P.M., Douglas, W.L., Harrison, R.E. & McDowell, S. (1988). E¡ects of storage time and temperature on the micro£ora and amine development in Spanish mackerel (Scomberomorousmaculatus). Journal of Food Science, 53: 1024-1029.

Mietz, J.L. & Karmas, E. (1978). Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster, and shrimp as an indicator of decomposition. JAOAC61(1): 139-145.

Mietz, J.L. & Karmas, E. (1977). Chemical quality index of canned tuna as determined by high pressure liquid chromatography. Journal of Food Science, 42, 155-158.

Moori, H., Cann, D.C., Taylor, L.Y. & Murray, C.K., (1986). Forma-tion of histamine by luminous bacteria isolated from scombroid fish. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 52: 2135–2141.

Okuzumi, M., Fukumoto, I. & Fujii, T. (1990). Changes in bacterial flora and polyamine contents during storage of horse mackerel meat. Nippon Suisan Gakkaishi 56: 1307-1312.

Rodriguez, C.J., Besteiro, I. & Pascual, C. (1999) Biochemical changes in freshwater rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) during chilled storage. J. Sci. Food Agric. 79 (1999), pp. 1473–1480.

Shalaby, A.R. (1996). Significance of biogenic amines in food safety and human health, Food Res. Int. 29 (1996), pp. 675–690.

Silla-Santos, M.H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. International J.Food Microbiology, vol29, Issue 2-3.

Starusckiewicz Jr., W.F., & Bond, J.F. (1981). Gas chromatographic determination of cadaverine, putrescine and histamine in food. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64: 584–591.

Taylor, S.L., & Sumner, S.S. (1987). Determination of histamine, putrescine and cadaverine. In D.E. Kramer, & J. Liston (Eds.), Seafood quality determination (pp. 235–246). B.V., Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers.

Taylor, S.L. (1986). Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. CRCCrit. ev.Toxicol. 17: 91-117.

Taylor, S.L. & Sumner, S.S. (1989). Determination of histamine, cadaverine and putrescine. In Seafood Quality Determination (Eds D.E. Kramer and J. Liston) pp. 253-245. Proceedings of an International Symposium. New York, Elsevier Science Publishers.

Veciana-Nogues, M.T., Marine-Font, A., & Vidal-Carou, M.C. (1997). Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 45: 2036–2041.

Yamanaka, H. (1989). Changes in polyamines and amino acids in scallop adductor muscle during storage. J. Food Sci. 54: 1113-1115.

Yen, G., & Hsieh, C. (1991). Simultaneous analysis of biogenic amines in canned fish by HPLC. Journal of Food Science, 58: 158-180.

Yoshinaga, D.H. & Frank, H.A. (1982). Histamineproducing bacteria in decomposing skipjack tuna (Katsuwonus pelamis). Appl. Environ. Microbiol. 44: 447-452.