مطالعه فلور میکروبی مولّد آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در ماهی زرده

ولی‌اله کوهدار*[۱]، ودود رضویلر[۲]، عباسعلی مطلبی[۲]

چکیده

مسمومیّت هیستامینی یک مسمومیّت غذایی با گستره جهانی می‌باشد؛ عوامل ایجاد کننده آن، آمین های بیوژن می باشند که بوسیله گونه های مختلفی از باکتری‌ها تولید می شوند. هدف از این تحقیق، شناسایی باکتری‌های تولید کننده آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در ماهی زرده صید شده از آبهای جنوبی ایران بود. از عضلات اطراف آبشش ۲۵ نمونه ماهی زرده منجمد برای انجام آزمایشات میکروبی و تعیین میزان هیستامین استفاده شد. نتایج بدست آمده نشان داد که میانگین ± انحراف معیار شمارش کلی میکروبی و شمارش سرماگراها به ترتیب ۰/۱۸ ±٤/٤٨ و Log_{10} CFU/g ۰/۱۷ ±٤/٤٤ بود. باکتری‌های متنوّعی به عنوان باکتری‌های تولید کننده آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز شناسایی شدند؛ از میان آنها، کلستریدیوم پرفرینجنس با ۲۰/۹ درصد، بیشترین فراوانی را داشت و به دنبال آن گونه های کلبسیلا با ۱٦/۸، گونه های پروتئوس با ۱٤/۱، گونه های انتروباکتر با ۱۰/۵ و سایر باکتری‌ها با ۳۷/۷ درصد فراوانی، در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. هیستامین در مقادیر کمتراز ۲۰، بین ۲۰ تا ۵۰ و بیش از ۵۰ppm به ترتیب در ٤۸، ۸ و ٤٤ درصد نمونه ها یافت شد. بنابراین خطرات بهداشتی در پروسه های صید و پس از صید ماهی زرده وجود دارد و باید از روشهای کنترلی مناسبی به منظور جلوگیری از شکل گیری هیستامین استفاده شود.

واژگان کلیدی: *مسمومیّت هیستامینی، ماهی زرده، باکتری‌های تولید کننده آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز*

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۱۷ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۱۹

مقدمه

مسمومیّت هیستامینی که از آن به عنوان مسمومیّت اسکومبروئیدی هم یاد می‌شود، یک مسمومیّت شیمیایی غذازاد می‌باشد که در سرتاسر جهان اتفاق می‌افتد؛ امّا در اکثر کشورها به دلیل طبیعت ملایم بیماری، اغلب شناسایی نشده و گزارش نمی‌شود. این مسمومیّت غذایی اغلب در اثر مصرف ماهیان خانواده اسکومبروئیده و اسکومبروسوسیده که دارای گوشت تیره‌ای می‌باشند، ایجاد می‌شود. ماهیان این دو خانواده، مقادیر بالایی از اسید آمینه هیستیدین آزاد را در عضلات دارا می‌باشند و اگرتحت شرایط نامناسب صید و نگهداری شوند، در اثر آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز تولید شده بوسیله باکتری‌ها، هیستامین از هیستیدین آزاد تولید خواهد شد(١٤). مصرف ماهیان تازه و منجمد فاسد شده و یا فراورده‌های آنها که حاوی مقادیر زیادی هیستامین می باشند، علت اصلی مسمومیّت هیستامینی می باشد(٦). معمولاً مسمومیّت هیستامینی یک مسمومیّت خفیف و ملایم بوده و با علائمی نظیر سردرد، جوشهای پوستی، خارش، کهیر، التهاب موضعی، سوزش دهان و علائم گوارشی همراه است(۱۰).

گروه بزرگ و متنوّعی از باکتری‌ها توانایی تولید آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز را داشته و قادر به تولید هیستامین می باشند. بطور کلی آنزیمهای دکربوکسیله کننده اسیدهای آمینه مخصوصاً آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز، دربرخی از گونه‌های انتروباکتریاسه، لاکتوباسیلوسها، پسودوموناسها، ویبریوها، کلستریدیوم و فوتوباکتریوم یافت می شود؛ امّا باکتری‌های انتروباکتریاسه نقش مهمی را در تولید این آنزیم ایفاء می کنند(۱۰و٤). عواملی نظیر گونه ماهی، فصل صید، نحوه صید، شرایط نگهداری ماهی از نظر دما و زمان، منطقه جغرافیایی، میزان شوری و دمای آب و فرایندهای پس از صید بر میزان و تنوّع باکتری‌های تولید کننده هیستامین تأثیرگذار می باشند(۲۰). ماهی زرده صید شده از آب‌های جنوبی ایران که متعلّق به خانواده اسکومبروئیده بوده و میزان صید آن در طی سال‌های اخیر به بیش از ۲۰ هزار تن رسیده، برای انجام تحقیق انتخاب گردید. این ماهی در سرتاسر خلیج فارس و

*۱- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران
dr.koohdar@yahoo.com
۲- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

دریای عمان یافت می‌شود و روش‌های صیادی از قبیل قلاب خزنده، تور گوشگیر و تورگردان پیاله ای، روشهای مورد استفاده برای صید آن محسوب میشوند(۲). این ماهی حاوی ۱۰۹۰ میلیگرم اسید آمینه هیستیدین در۱۰۰ گرم گوشت می باشد(۱۷) و لذا پتانسیل ایجاد مسمومیّت هیستامینی را دارا می باشد. این تحقیق جهت بررسی انواع باکتری‌های تولید کننده آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز و تعیین میزان هیستامین موجود در ماهی زرده منجمد، انجام گرفت.

مواد و روش کار

با هماهنگی مؤسسه تحقیقات شیلات، از یکی از شرکت‌های کنسروسازی فعّال موجود در استان تهران جهت نمونه برداری استفاده شد. تعداد ۲۵ نمونه ماهی زرده منجمد با روش نمونه برداری تصادفی ساده، مورد نمونه برداری قرار گرفت و بدلیل اینکه عضلات اطراف آبشش های ماهی، یکی از قسمتهایی است که بیشترین آلودگی میکروبی و هیستامینی را دارا می باشد(۱۸)، نیم کیلوگرم از این قسمت، جهت انجام آزمون‌های میکروبی و همچنین تعیین میزان هیستامین موجود، تحت شرایط استریل نمونه‌برداری و به آزمایشگاه تشخیص دامپزشکی ارسال گردید.

در آزمایشگاه، پس از پوست کنی و استخوان گیری، گوشت باقیمانده بدون اضافه کردن ماده رقیق کننده داخل مخلوط کن قرار گرفت و به مدت ۳ دقیقه، عمل مخلوط کردن به منظور ایجاد یک مخلوط هموژن انجام شد. از مخلوط همگن شده با استفاده از پیتون واتر استریل، رقتهای مورد نظر تهیّه و به صورت کشت مخلوط با استفاده از محیط کشت تریپتیکاز سوی آگار (TSA) تهیه کشت به روش استاندارد انجام شد. به منظور شمارش کلی میکروبی و شمارش سرماگراها، پلیت‌ها به ترتیب در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ ساعت و ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵ روز قرار گرفتند. شمارش باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه با استفاده از محیط VRBA (Violet red bile dextrose agar) پس از گرم خانه گذاری در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ ساعت انجام شد.

برای شمارش باکتری‌های تولید کننده آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز، از محیط کشت نیون(۱۵) و محیط کشت تغییریافته نیون(۲۰) استفاده شد. پس از تهیّه این محیطها، تعداد ٦ پلیت خالی برای هر کدام از رقتهای (10^{-1} تا 10^{-3}) در نظر گرفته شد و با استفاده از محیط کشت نیون و یا محیط کشت تغییر یافته نیون به صورت کشت مخلوط دو لایه و دوبل تهیّه کشت انجام شد؛ پس از آن، ۲ عدد پلیت حاوی محیط کشت نیون در گرم خانه ۳۷°C به مدت ٤۸ ساعت، ۲ عدد پلیت حاوی محیط کشت نیون در گرم خانه ۲۰°C به مدت ۵ روز (تحت شرایط هوازی) و ۲ عدد پلیت حاوی محیط کشت تغییر یافته نیون در °C ۳۷ به مدت ٤۸ ساعت (تحت شرایط بی هوازی) قرار گرفتند. کلنی هایی که دارای هاله بنفش در محیط کشت نیون بوده و یا دارای هاله صورتی در محیط کشت تغییر یافته نیون بودند، بعنوان باکتری‌های تولید کننده آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز شمارش شدند. با استفاده از محیط کشت تریپتیکاز سوی آگار حاوی یک درصد ایزومر L–هیستیدین هیدروکلراید و با pH برابر ٦، از هرکدام از کلنی‌های شمارش شده، تهیه کشت ایزوله انجام شد و سپس باکتری‌های تولید کننده آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز با استفاده از خصوصیاتی نظیر تست کاتالاز، تخمیرکربوهیدراتها، تست‌های بیوشیمیایی، مورفولوژی کلنی‌ها و غیره توصیف شده در کتاب باکتری شناسی برگی(۹)، مورد شناسایی قرار گرفتند.

اندازه‌گیری میزان هیستامین موجود در نمونه ها با استفاده از عضلات اطراف آبشش ها و با روش الیزا (ELIZA) انجام شد. Marcobal وهمکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که روش الیزا همبستگی خوبی با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) در تعیین میزان هیستامین دارد(۱۳). از کیت

مخصوص اندازه گیری هیستامین در ماهیان اسکومبروئیدی، بنام کیت وراتوکس شرکت نئوژن برای این منظور استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار(ver.١٦) SPSS استفاده شد. به منظور بدست آوردن ارتباط بین شاخص میزان هیستامین و شاخص‌های میانگین تعداد باکتری‌های تولید کننده هیستامین و میانگین تعداد انتروباکتریاسه تولید کننده هیستامین، از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) استفاده شد.

نتایج

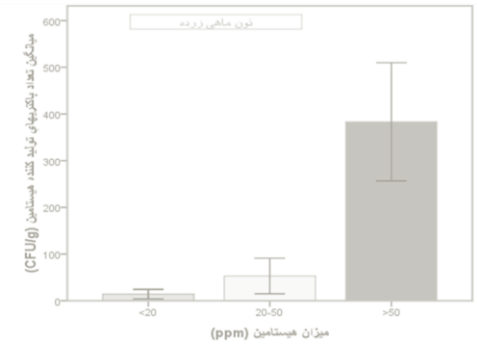
میانگین± انحراف معیار شمارش کلی باکتریایی و شمارش باکتری‌های سرماگرا در ٢٥ نمونه ماهی زرده صید شده از آب‌های جنوبی ایران به ترتیب برابر با ٠/١٨ ± ٤/٤٨ و ٠/١٧ ± ٤/٤٤ Log_{10} CFU/g بود. میانگین شمارش± انحراف معیار باکتری‌های تولید کننده آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز برابر با ٢/٠١±٠/١٤ Log_{10}CFU/g بود و این میزان درحدود ٠/١٣ درصد میانگین شمارش کلی باکتریایی محاسبه گردید. باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه بین ١/٢٣ تا ٣/٦ Log_{10} CFU/g شمارش شدند و میزان میانگین شمارش آنها ٢/٣٥±٠/١٦ Log_{10}CFU/g بود. میزان میانگین شمارش باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه تولید کننده آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز در ماهیان مورد مطالعه، Log_{10} ٢/٠١±٠/١٥ CFU/g تعیین شد.

انواع باکتری‌های تولید کننده هیستامین جداشده در ماهی زرده در جدول ١ آمده است. از میان باکتری‌های تولید کننده هیستامین جدا شده، کلستریدیوم پرفرینجنس با ٢٠/٩ درصد، گونه‌های کلبسیلا با ١٦/٨ درصد و گونه های پروتئوس با ١٤/١ درصد، بیشترین میزان فراوانی را به خود اختصاص دادند.

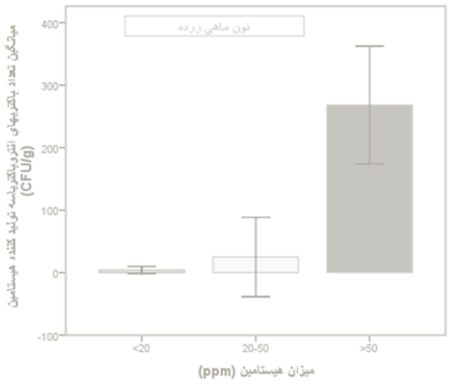
جدول١- انواع باکتری‌های جداشده و میزان فراوانی آنها در ٢٥ نمونه ماهی زرده

شرح / نوع باکتری	تعداد باکتری جدا شده	میزان فراوانی ٪
آئروموناس هیدروفیلا	١٥٨	٣/٥
انتروباکتر آئروجنز	٣١٠	٦/٩
انتروباکتر کلواسه	١٦٠	٣/٦
اشرشیا کلی	٢٤٥	٥/٤
پروتئوس میرابیلیس	٣٧٥	٨/٣
پروتئوس وولگاریس	٢٦٠	٥/٨
سراتیا مارکسنس	٤٠٠	٨/٩
سودوموناس آئروجینوزا	١٤٢	٣/٢
سودوموناس فلورسنس	٢٠٠	٤/٥
سیتروباکتر فروندای	٣٥٠	٧/٨
کلبسیلا نومونیا	٥٦٠	١٢/٥
کلبسیلا اوکسی توکا	١٩٠	٤/٣
کلستریدیوم پرفرینجنس	٩٤٠	٢٠/٩
مورگانلا مورگانی	٢٠٠	٤/٤
مجموع	٤٤٩٠	١٠٠

نمودارهای شماره ١ و ٢ میانگین تعداد باکتری‌های تولید کننده هیستامین و باکتری‌های انتروباکتریاسه تولید کننده هیستامین را در مقادیر مختلف هیستامین در ماهی زرده مورد مطالعه نشان می‌دهند. با افزایش میانگین تعداد باکتری‌های تولید کننده هیستامین و باکتری‌های انتروباکتریاسه تولید کننده هیستامین، میزان هیستامین موجود در ماهی هم افزایش یافت. با انجام آنالیز آماری آنالیز واریانس یک طرفه نیز اختلاف آماری معنی‌داری (p<٠/٠٥) بین میزان هیستامین و میانگین تعداد باکتری‌های تولید کننده هیستامین و همچنین باکتری‌های انتروباکتریاسه تولید کننده هیستامین مشاهده شد.

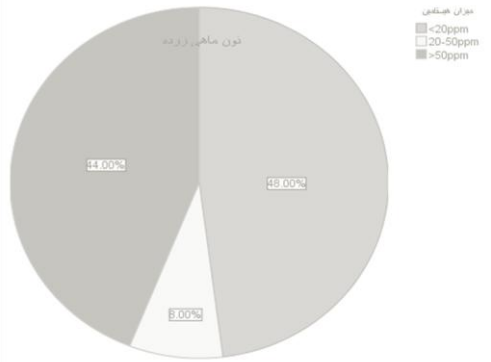


نگاره ١- میزان هیستامین و میانگین تعداد باکتری‌های تولید کننده هیستامین در٢٥ نمونه ماهی زرده



نگاره ۲- میزان هیستامین و میانگین تعداد باکتری‌های انتروباکتریاسه تولید کننده هیستامین در ۲۵ نمونه ماهی زرده

کمترین میزان هیستامین در نمونه های مورد آزمون۹/٤، بیشترین آن ١٤٧/٥ و میانگین± انحراف معیار آن ppm ۵۳/۷±۸/۹ محاسبه گردید. میزان فراوانی هیستامین در مقادیر کمتراز ۲۰، بین ۲۰ تا ۵۰ و بیش از ۵۰ppm در نمودار شماره ۳ آمده است.



نگاره ۳- میزان هیستامین موجود در ۲۵ نمونه تون ماهی زرده صید شده از جنوب ایران

بحث

براساس استانداردهای میکروبی ارائه شده توسط کمیته بین المللی خصوصیّات میکروبی مواد غذایی، حدّ مجاز شمارش کلی میکروب های هوازی در هر گرم از نسج ماهیان تازه، دودی سرد و منجمد دردمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتیگراد (شمارش سرماگراها)، کمتر از 10^5 CFU/g می باشد. این میزان تا 5×10^5 CFU/g نیز قابل قبول می باشد؛ ولی مدت زمان حفظ و نگهداری این چنین ماهیانی محدودتر خواهد بود. مقادیر بالای 5×10^5 CFU/g در هر گرم از نسج غیرقابل قبول می باشد. در بیشتر آبزیان خوراکی خام، تعداد باکتری‌های مزوفیل باید یک دهم تعداد باکتری‌های سرماگرا باشد(۷). با توجه به نتایج حاصل از شمارش کلی میکروبی و شمارش سرماگراها، میانگین شمارش کلی میکروبی در ٤٠ درصد از نمونه های ماهی زرده بیش از حدّ استاندارد موجود می باشد. در مورد باکتری‌های سرماگرا، میانگین شمارش این باکتری‌ها در نمونه‌های ماهی زرده کمتر از حدّ مجاز بوده و فقط در٤ درصد از آنها، شمارش سرماگراها بیش از حدّ استاندارد است.

مقادیر هیستامین به طور معنی داری از نظر آماری ($p<$ ۰/۰۵) در نمونه هایی که شمارش باکتری‌های تولید کننده آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز بالایی داشتند، بالا بود. میانگین تعداد این باکتری‌ها درحدود ۰/۱۳ درصد میانگین شمارش کلی میکروبی محاسبه گردید. Lopez-Sabater و همکاران (۱۹۹٦) میزان شیوع باکتری‌های تولید کننده هیستامین را همواره کمتر از ۰/۱ درصد شمارش کلی میکروبی گزارش نمودند (۱۱)؛ Ababouch و همکاران (۱۹۹۱) این میزان را کمتر از ۱/۰ درصد شمارش کلی میکروبی گزارش نمودند(٤).

با توجه به نتایج آنالیز آماری واریانس یک طرفه، بین پارامترهای میزان هیستامین موجود در ماهی مورد مطالعه و شمارش باکتری‌های انتروباکتریاسه، ارتباط معنی داری مشاهده شد($p<$ ۰/۰۵). با افزایش تعداد باکتری‌های انتروباکتریاسه تولید کننده هیستامین، میزان هیستامین موجود در ماهی هم افزایش می یافت. میانگین تعداد باکتری‌های انتروباکتریاسه در ٤٤ درصد ماهی مورد مطالعه که حاوی مقادیر بالایی از هیستامین (بیش از ۵۰ppm) در عضلات بودند، $2/7x10^2$ CFU/g شمارش شد.

باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه از مهمترین باکتری‌های تولید کننده هیستامین در ماهی محسوب می شوند. در تحقیق حاضر ٦٧/٩ درصد باکتری‌های تولید کننده هیستامین

در ماهی زرده، جزء خانواده انتروباکتریاسه بود. Lopez-Sabater و همکاران (۱۹۹٦) گزارش کردند که ۸۳ درصد باکتری‌های تولید کننده هیستامین جزء خانواده انتروباکتریاسه می باشند(۱۱). در گزارش دیگری که توسط Lopez-Sabater و همکاران در سال ۱۹۹٤ منتشر شده، آمده است که تمام باکتری‌های تولید کننده هیستامین جدا شده در تحقیق آنها، گرم منفی بوده و از ٤۰ ایزوله باکتریایی جدا شده در محیط نیون، ۷۷/۵ درصد از باکتری‌ها، جزء خانواده انتروباکتریاسه بوده اند(۱۲). به این نکته باید توجّه نمود که در این مطالعات فقط باکتری‌های هوازی تولید کننده هیستامین مورد مطالعه قرار گرفته اند و به باکتری‌های بی هوازی تولید کننده هیستامین نظیر کلستریدیوم پرفرینجنس توجّه ای نشده است؛ امّا مطالعه حاضر ضمن بررسی باکتری‌های هوازی تولید کننده هیستامین، به باکتری‌های بی هوازی نیز پرداخته است.

کلستریدیوم پرفرینجنس نیز یکی از باکتری‌های مهم در تولید هیستامین محسوب می شود و حضور آن در نمونه های مورد آزمون، اغلب با مقادیر بالای هیستامین همراه بود. ۲۰/۹ درصد از باکتری‌های تولید کننده هیستامین جداشده در نمونه های ماهی زرده مربوط به کلستریدیوم پرفرینجنس بود. در گزارشی، ۵۰ درصد باکتری‌های تولید کننده هیستامین جدا شده از تون ماهیان، از جنس کلستریدیدم پرفرینجنس بودند(۲۰).

تمام باکتری‌های تولید کننده هیستامین جداشده در این مطالعه، قبلاً بوسیله سایر محققین نیز گزارش شده‌اند (٦،۱۲،۱۸،۱۹،۲۰). با توجه به تقسیم‌بندی انجام شده توسط Behling وTaylor (۱۹۸۲) در خصوص باکتری‌های تولید کننده هیستامین(۵)، باکتری‌هایی نظیرکلستریدیوم پرفرینجنس، مورگانلا مورگانی، گونه های پروتئوس، گونه های کلبسیلا و گونه های انتروباکتر که قدرت تولید مقادیر زیاد هیستامین را دارا هستند، در گروه تولید کنندگان عمده هیستامین قرار می گیرند. این گروه از باکتری‌ها در نمونه هایی که حاوی مقادیر بالایی از هیستامین در عضلات بودند، در مقیاس بالایی جدا شدند. با مقایسه شیوع انواع باکتری‌های تولید کننده هیستامین در ماهی زرده، مشخص گردید که کلستریدیوم پرفرینجنس با ۲۰/۹ درصد، گونه های کلبسیلا با ۱٦/۸ درصد، گونه های پروتئوس با ۱٤/۱ درصد، گونه های انتروباکتر با ۱۰/۵ درصد و مورگانلا مورگانی با ٤/٤ درصد فراوانی در گروه یک تقسیم بندی قرار دارند. از طرف دیگر سایر گونه های جدا شده نظیر سیتروباکتر فروندای، سراتیا مارکسنس، اشرشیا کلی، آئروموناس هیدروفیلا و گونه های سودو موناس در گروه تولید کنندگان کم هیستامین قرار گرفتند.

میزان هیستامین در ماهیان تازه معمولاً کمتر از ۲ppm می باشد. مقادیر بین ۲۰ تا ۵۰ppm نشان دهنده فساد ماهی می باشد و میزان ۵۰ppm به عنوان دوز فعال مطرح می باشد که باعث غیرقابل مصرف شدن محصولات ماهی می شود(۸). براین اساس، این تحقیق نشان داد که ٤۸/۰، ۸/۰ و ٤٤/۰ درصد از ماهیان مورد آزمون به ترتیب حاوی مقادیر کمتراز ۲۰، بین ۲۰ تا ۵۰ و بیش از ۵۰ppm هیستامین در عضلات اطراف آبشش می باشند.

در گزارش کامکار و همکاران (۱۳۸۲) آمده است که در ٤۱/۲۵ درصد نمونه های کنسرو تون ماهیان، میزان هیستامین بالاتر ازحدّ مجاز (۵۰ppm) می باشد(۳). همچنین در گزارش حسینی و همکاران (۱۳۸٦) آمده که ٤٤/۳ درصد کنسروهای تون ماهیان مورد آزمون حاوی مقادیر بیش از حدّ مجاز بوده اند(۱). با توجه به این تحقیقات و تحقیق حاضر، مسمومیّت هیستامینی در کشور ایران اتفاق می افتد ولی به دلیل طبیعت ملایم بیماری و عدم تشخیص دقیق آن، گزارشی از موارد بیماری وجود ندارد. نتایج این تحقیق نشان داد که مخاطرات بهداشتی در روشهای صید و فرایندهای پس از صید مورد استفاده در صنعت ماهی زرده وجود دارد

و استفاده دقیق از روش‌های مناسب پیشگیری تولید هیستامین و سایر آمین‌های بیوژن ضروری به نظر می‌رسد. از آنجا که اغلب باکتری‌های تولید کننده هیستامین از خانواده انتروباکتریاسه و همچنین جنس کلستریدیوم بوده و اکثر سویه‌های آنها در گروه تولید کنندگان عمده هیستامین قرار دارند، مدیریت در مراحل مختلف صید و فرایندهای پس از آن، جهت جلوگیری از آلودگی متقاطع بوسیله این باکتری‌ها و نگهداری و حمل و نقل تون ماهیان در شرایط زمانی و دمایی مناسب (کمتر از $4\ ^{\circ}C$) به منظور جلوگیری از رشد و تکثیر این میکروارگانیسم‌ها و نتیجتاً کاهش شکل‌گیری هیستامین الزامی می‌باشد.

فهرست منابع

۱- حسینی. ه، کشاورز. س.ع، پیرعلی. م، خاکسار. ر، عباسی. م، فکری. م، صفائیان. ش، باقرزاده. ز و تهموزی. س (۱۳۸٦): مطالعه میزان هیستامین کنسرو تون ماهیان تولید شده در ایران در سال ۱۳۸۵ به روش الیزا، مجله علوم وصنایع غذایی ایران، شماره۲، صفحه۸٤- ۷۷.

۲- صادقی. س. ن (۱۳۸۰): ویژگی های زیستی و ریخت شناسی ماهیان جنوب ایران (خلیج فارس و دریای عمّان)، چاپ اول، موسسه تحقیقات و آموزش شیلات ایران، تهران،:۲۹۵-۲۷۵.

۳- کامکار. ا، حسینی. ه و ابوالحسن. گ (۱۳۸۲): مطالعه میزان هیستامین در کنسروهای تن و ساردین، مجله پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان، شماره ٦۰:۵۰-٤٤.

4. Ababouch, I. and Afilal, M.E. (1991): Identification of histamine-producing bacteria isolated from sardine stored in ice and at ambient temperature (25°C). Food Microbiol. 8:127-136.
5. Behling, A.R. and Taylor, S.L. (1982): Bacterial histamine production as a function of temperature and time of incubation. J. Food Sci.47: 1311-1314.
6. Choudhury, M., Kumar Sahu, M., Sivakumar, K., Thangaradjou, T. and Kannan, L. (2008): Inhibition of Actinomycetes to histamine producing bacteria associated with Indian Mackerel fish (*Rastrellinger kanagurata* Cuvier, 1816). J. Fish.Aqua. Sci. 3 (2): 126-136.
7. Connell, J.J. (1995): Control of fish quality. Fishing News Books. Fourth edition. pp:105-127.
8. FDA. (1998): FDA and EPA guidance levels in: Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guide. 2nd Edition. Department Of Health and Human Services. Public Health Service. Food And Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Office of Seafood. Washington. DC. pp: 245-248. Appendix 5.
9. Holt, J.G., Kreig, N.R., Sneath, P.H.A., Stanly, J.T. and Williams, S.T. (1994): Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th edition. Baltimore. Williams & Wilkins.
10. Lehane, L. and Olley, J. (2000): Histamine fish poisoning revisited. Int. J.Food Microbiol. 58: 1-37.
11. Lopez-Sabater, E.I., Rodriguez-Jerez, J.J., Hernandez-Herrero, M. and Mora-Ventura, M.T. (1996): Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in Scombroid fish species from retail markets in the Barcelona area. Int. J.Food Microbiol. 28 (3): 411-418.
12. Lopez-Sabater, E.I., Rodriguez-Jerez, J.J., Hernandez-Herrero, M. and Morana- Ventura, M.T. (1994): Evaluation of histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from sardine (*Sardina Pilchardus*) by an enzymic method. Lett. Appl. Microbiol. 19: 70-75.
13. Marcobal, A., Polo, M.C., Martín-Álvarez, P.J. and Moreno- Arribas, M.V. (2005): Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. Food Research Int. 38: 387-394.
14 .Mlcneryey, J.M.D., Sahgal-Punnet, M.D., Vogel-Mitchell, M.D. and Jones-Ernesto, M.D. (1996): Scombroid poisoning. Annals of Emergency Medicine. 28(2): 235- 238.
15. Niven, C.F., Jeffrey, M.B. and Corlett, D.A. (1981): Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 41(1): 321-322.
16. Önal, A. (2007): Current analytical methods for determination of biogenic amines in foods. Food Chemistry. 103:1475-1486.

17. Takagi, M., Iida, A., Murayama, H. and Soma, S. (1969): On the formation of histamine during loss of freshness and putrefaction of various marine products. Hokkaido Daigaku Suisan Gakubu Kenkyu Iho. 20: 227-234.
18. Taylor, S.L., Speckhard, M.W., 1983. Isolation of histamine- producing bacteria from frozen tuna. Marine and Fishery Reviews. 45 (46): 35-39.
19. Tsai, Y., Kung, H., Lee, T., Lin, G. and Hwang, D. (2004): Histamine-related hygienic qualities and bacteria found in popular commercial Scombroid fish fillets in Taiwan. J. Food Protec. 67: 407-412.
20. Yoshinaga, D.H. and Frank, H.A. (1982) Histamine-Producing bacteria in decomposing skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). Appl. Environ. Microbiol. 44 (2): 447-452.