Bull. Korean Fish. Soc. 19(4), 356~362, 1986 韓水誌 19(4), 356~362, 1986

魚肉에 接種한 衛生指標細菌의 凍結貯藏中 變化

崔鍾德・張東錫・金榮萬*
釜山水産大學 微生物學科・*東義工業專門大學 食品工業科
(1986년 4월 18일 수리)

Survival of Sanitary Indicative Bacteria Inoculated in Fish Muscle Homogenates during Freezing and Frozen Storage

Jong Duck CHOI, Dong Suck CHANG
Department of Microbiology, National Fisheries University of Pusan.
Nam-gu, Pusan 608, Korea
and
Young Man KIM
Department of Food Industry, Dong Eui Technical Junior College
Pusanjin-gu, Pusan 601, Korea
(Received April, 18, 1986)

This experiment was designed to evaluate effects of freezing and frozen storage on survival of sanitary indicative bacteria in seafoods.

Culture of bacteria such as *Escherichia coli* type Ⅰ, *Citrobacter freundii* type Ⅰ, *Klebsiella aerogenes* type Ⅰ and *Streptococcus faecalis* was inoculated into homogenates of pollack, shrimp, and sardine frozen in a contact plate freezer at −40°C and chest freezer at −20°C, stored at −20°C, and then survival of the inoculated bacteria was determined over a period of 95 days.

Coliform group was highly sensitive to freezing and frozen storage showing survival of about 2% after 95 days of frozen storage at −20°C, whereas *Streptococcus faecalis* was relatively resistant with 20% survival rate.

The sanitary indicative bacteria count was rapidly decreased in the early stage of frozen storage revealing 90 to 95% loss of coliform group and 40 to 70% loss in case of *Streptococcus faecalis* after 10 days storage.

In determining recovery rate, most probable number (MPN) method gave more reproducible recovery of the tested strain than did the selected agar plate method.

緖 論

最近 冷凍技術의 發達과 生活水準의 向上으로 食品의 동결저장 및 냉동품의 流通과 販賣가 보편화되어 있다. 따라서, 冷凍食品에 있어 食品衛生上 問題가 되는것은 冷凍에 依하여 病原性微生物이 完全히 死滅되지 않는다는 점에서 冷凍前에 原料의 衛生的인 取扱管理와 凍結 및 貯藏條件이 매우 重要한 것이다.

魚貝類에 對한 細菌學的研究報告中衛生指標細菌에 關하여 Horie 등(1959, 1960a, 1960b, 1960c, 1973, 1974), Chang 등(1973a, 1973b, 1975), Bear 등(1976), Swartzentruber 등(1980)은 冷凍魚貝類의 細菌學的品質을 判定하기 위하여 大腸菌과 腸球菌의 分布를 報告한 바 있다.

凍結이 細菌의 生育에 미치는 影響에 關한 硏究로서 Kiser와 Beckwith(1942)는 魚體를 凍結하여 −28°C에서 10日間 貯藏하였을 때 生菌數는 顯著히 減少하였으나 球菌類는 凍結에 대한 耐性이 강하다고 報告하였고 Digirolamo 등(1970)은 네가지 凍結方法에 依한 *E. coli*와 *Salmonella* 屬은 生殘率 比較檢討

에서 *Salmonella* 屬은 凍結에 對한 抵抗이 弱하다고 報告하였다. Okuzumi 등(1974)은 冷凍魚貝類에서 分離同定된 菌株를 脫脂乳에 接種하여 −20°C 에서 20일간 저장하였을 때 *Micrococcus* 屬과 *Staphylococcus* 屬은 거의 변동이 없었다고 報告하였다.

凍結에 依하여 生理的으로 損傷을 입은 細菌의 檢出에 關하여 Ray 와 Speck (1972)는 −78°C 에서 損傷을 입은 *E. coli* 는 培地組成에 따라 檢出率에 差異가 있었다고 하였으며 Oliver(1981)는 低溫損傷을 입은 *Vibrio vulnificus* 의 檢出에 있어서도 培地의 組成에 따라 差異가 있었다고 報告하였다. 그 밖에도 Matches 등(1971), Johnson 등(1973), Johnson과 Liston(1973), Ray 등(1978)이 *Vibrio parahaemolyticus*의 저온에 의한 損傷과 檢出에 對한 培地組成의 影響에 關하여 報告한 바 있다.

그러나 生鮮魚貝類에 汚染된 衛生指標細菌이 凍結貯藏中에 그 生殘率이 魚種別 菌種別 또는 凍結方法別로 어떻게 다른가를 檢討한 報告는 적다.

그래서 本 研究에서는 冷凍魚肉의 細菌學的品質管理에 必要한 기초자료를 얻기 위하여 凍結 및 貯藏이 衛生指標細菌에 미치는 影響을 檢討하고자 인산염완충액과 명태, 새우 및 정어리육 homogenates 에 순수배양한 大腸菌群과 腸球菌을 接種시켜 凍結貯藏하면서 凍結方法 및 貯藏期間中에 따른 菌種別 生殘率을 比較 考察하였다.

材料 및 方法

1. 材　　料

(1) 試料處理

本實驗에 使用한 試料는 日本北海道近海에서 어획하여 凍結된 채 운반된 명태와 부산 共同魚市場에서 購入한 新鮮한 새우와 정어리를 사용하였다. 各生試料에서 無菌的으로 肉 100 *g*을 取하고 菌배양액을 접종한 인산염완충액 희석수를 肉무게의 4배가 되도록 加하여 均質化시킨 다음 멸균된 aluminium can(內徑 65.4 *mm*, 높이 58 *mm*, 內容積 160 *ml*)에 約 80 *g*씩 넣고 接觸式凍結機(−40°C)속에서 凍結한 후 冷凍庫(−20°C)에 貯藏하면서 貯藏期間別로 取하여 實驗에 使用하였다.

(2) 接種菌株

使用된 菌株中 大腸菌群類는 下水에서 分離된 大腸菌群을 A.P.H.A.(1970)의 標準方法에 따라 *E-scherichia coli* type Ⅰ, *Citrobacter freundii* type Ⅰ, *Klebsiella aerogenes* type Ⅰ을 同定하였고 腸球菌은 日本冷凍食品協會(1978)의 檢査方法에 따라서 *Streptococcus faecalis* 를 同定하였다. 分離同定된 菌株의 生化學的 性狀은 Table 1, 2와 같다. 分離된 菌株中 大腸菌群은 nutrient broth 에서 *S. faecalis* 는 glucose broth 에서 18時間 배양한 후 시료당 $10^7/g$정도가 되도록 接種하였다.

Table 1. Characteristics of the used coliform bacteria isolated from waste water

	EC broth 44.5°C	Indole	Methyl red	Voges-Proskauer	Citrate
E. coli	+	+	+	−	−
C. freundii	−	−	+	−	+
K. aerogenes	−	−	−	+	+

Table 2. Characteristics of the used *S. faecalis* isolated from waste water

Test	Result	Test	Result
Acid from		Hydrolysis of	
Mannitol	+	Gelatin	−
Sorbitol	+	Starch	−
Arabinose	−	Hippurate	+
Glycerol	+	Esculin	+
Melezitose	+	Arginine	+
Melibiose	−		

2. 實驗 方法

(1) 大腸菌群의 菌數測定

大腸菌群數는 A.P.H.A.(1970)의 方法에 따라 3個

Table 3. Composition of azide esculin (AE) agar medium

Polypepton	10	*g*
Yeast extract	5	*g*
NaCl	5	*g*
K_2HPO_4	4	*g*
KH_2PO_4	1.5	*g*
NaN_3	0.5	*g*
Esculin	1.0	*g*
Ferric ammonium citrate	0.5	*g*
Agar	1.5	*g*
Distilled water	100	*ml*
pH	8.0	

Polypepton, yeast extract, NaCl, K_2HPO_4 and KH_2PO_4 are dissolved in 500 *ml* of distilled water, to which 10 *ml* of 5% NaN_3 solution, 10 *ml* of 5% ferric ammonium citrate solution and esculin are added.

Then the solution is adjusted to pH 8.0. On the other hand agar is dissolved in 500 *ml* of distilled water. After mixing the two parts, the medium is sterilized at 121°C for 15 min.

試驗管法으로 最確數를 求하였고 desoxycholate agar 平板培養法에 依한 菌數測定을 병행 실시하였다.

(2) *S. faecalis*의 菌數測定

腸球菌數는 日本冷凍食品協會(1978)의 檢査方法에 따라 3個 試驗管法으로 最確數를 求하였고, Horie 등(1974)의 方法에 따라 azide esculin(AE) 한천 平板培養法에 의한 菌數測定을 병행하여 실시하였다(Table 3).

結果 및 考察

1. 凍結中의 菌數變化

試驗菌을 接種한 인산염완충액과 명태, 새우, 정어리肉 homogenates를 접촉식 동결기(−40°C)와 Chest 동결기(−20°C)에서 各各 5時間凍結한 것과 凍結하지 않은 各 試料에 대한 生菌數變化는 Table 4와 같다.

凍結後 細菌의 生殘率을 보면 凍結溫度에 따라서는 큰 差異가 없었다. 菌株別로는 腸球菌이 30~50%로서 大腸菌群보다 높았으며 大腸菌群中에서는 *K. aerogenes* 24~43%, *C. freundii* 18~38%, *E. coli* 10~39% 順으로 나타났다. Chang 등(1975)이 명태 fillet 을 급속동결하였을 때 大腸菌群은 47.8~83.8% 腸球菌은 22~65%의 減少率을 보였다고 지적한 것과 거의 一致하였다.

試料에 따른 細菌의 減少率은 凍結溫度에 따라 별 差異는 없었으며, 인산염완충액에서 72.8~76.3%, 명태肉 69.9~70.4%, 새우肉 67.2~71.7%, 정어리肉 56.2~60.6% 순으로 감소율을 나타내었다.

즉, 有機物이 없는 인산염완충액의 경우가 魚肉에서 보다 減少率이 높았으며 魚種에 따라서도 差異가 있었는데 지방분이 많은 정어리肉에서는 지방분이 적은 명태육에서 보다 감소율이 10%정도 낮았다.

2. 凍結貯藏中 衛生指標細菌의 菌數變化

(1) 貯藏期間에 따른 菌數變化

菌株를 接種한 各 試料를 凍結하여 −20°C에 貯藏하였을 때의 菌數變化는 Table 5와 같다.

菌數의 減少傾向은 貯藏初期에 顯著하여 貯藏 10日後에 大腸菌群은 모든 試料에서 80% 이상의 減少를 나타내었고 그 以後는 서서히 減少하여 95日後에는 거의 95% 이상에 이르렀다. 凍結中에 일어난 約 80%의 菌數減少를 감안하면 貯藏 5日에는 5%, 10日 後에는 10% 그 以後 85日間 貯藏後에는 불과 15%에 지나지 않았다.

한편, 腸球菌은 魚肉에 있어 貯藏 10日 後에 40~70%, 95日 以後에는 50~75%로 大腸菌群보다 低溫

Table 4. Comparison of bacterial viability in most probable number (MPN) by freezing method

Strains	Inoculated Sample	Before freezing	Immediately after freezing			
			In contact freezer(−40°C)		In chest freezer(−20°C)	
		Bacterial count/100g	Bacterial count/100g	Survival rate(%)	Bacterial count/100g	Survival rate(%)
E. coli	Buffer solution	2.4×10^{9}	2.4×10^{8}	10.0	4.6×10^{8}	19.2
	Pollack	1.1×10^{10}	2.4×10^{9}	21.8	2.4×10^{9}	21.8
	Shrimp	9.3×10^{8}	9.3×10^{7}	10.0	9.3×10^{7}	10.0
	Sardine	2.4×10^{9}	9.3×10^{8}	39.0	8.3×10^{8}	34.6
C. freundii	Buffer solution	4.6×10^{8}	1.1×10^{8}	24.0	9.3×10^{7}	20.2
	Pollack	2.4×10^{10}	4.6×10^{9}	19.2	9.7×10^{7}	19.2
	Shrimp	5.2×10^{8}	9.2×10^{7}	17.7	1.0×10^{8}	19.2
	Sardine	7.4×10^{8}	2.8×10^{8}	38.0	2.5×10^{8}	28.3
K. aerogenes	Buffer solution	4.6×10^{9}	1.4×10^{9}	30.4	1.1×10^{9}	23.9
	Pollack	$2.4\sim10^{9}$	7.8×10^{8}	32.5	6.7×10^{8}	27.9
	Shrimp	6.7×10^{8}	2.6×10^{8}	39.0	2.5×10^{8}	37.3
	Sardine	8.3×10^{8}	3.5×10^{8}	42.2	3.6×10^{8}	43.4
S. faecalis	Buffer solution	9.3×10^{8}	2.8×10^{8}	30.1	4.3×10^{8}	46.2
	Pollack	2.4×10^{10}	1.0×10^{10}	45.8	1.2×10^{10}	52.7
	Shrimp	4.3×10^{9}	2.0×10^{9}	46.5	1.8×10^{9}	50.0
	Sardine	4.3×10^{9}	2.4×10^{9}	55.8	2.2×10^{9}	51.2

Table 5. Survival counts of sanitary indicative bacteria in fish muscle homogenates during the frozen storage period at −20°C

Strains	Inoculated sample	Storage time (days)					
		0	3	5	11	25	95
E. coli I	Buffer solution	2.4×10^{8}	1.9×10^{8}	1.5×10^{8}	1.4×10^{8}	9.4×10^{7}	4.6×10^{7}
	Pollack	2.4×10^{9}	1.1×10^{9}	9.3×10^{8}	9.4×10^{8}	9.4×10^{8}	4.4×10^{8}
	Shrimp	9.3×10^{7}	1.8×10^{8}	1.5×10^{8}	1.5×10^{8}	3.5×10^{7}	3.7×10^{7}
	Sardine	9.3×10^{8}	4.3×10^{8}	2.4×10^{8}	2.4×10^{8}	4.8×10^{7}	4.8×10^{7}
C. freundii I	Buffer solution	1.1×10^{8}	4.6×10^{7}	2.4×10^{9}	9.3×10^{6}	9.5×10^{6}	4.6×10^{6}
	Pollack	4.6×10^{9}	2.3×10^{9}	9.3×10^{8}	2.4×10^{8}	9.5×10^{7}	7.5×10^{7}
	Shrimp	9.2×10^{7}	4.2×10^{7}	2.1×10^{7}	4.2×10^{7}	2.9×10^{7}	1.5×10^{7}
	Sardine	2.8×10^{8}	1.5×10^{8}	1.5×10^{8}	4.6×10^{7}	1.5×10^{7}	7.5×10^{6}
K. aerogenes I	Buffer solution	1.4×10^{9}	6.4×10^{8}	4.3×10^{8}	2.3×10^{8}	3.7×10^{8}	9.3×10^{7}
	Pollack	7.8×10^{8}	3.9×10^{8}	4.3×10^{8}	4.3×10^{8}	9.3×10^{7}	4.1×10^{7}
	Shrimp	2.6×10^{8}	2.1×10^{8}	2.4×10^{8}	4.6×10^{7}	1.4×10^{7}	6.4×10^{6}
	Sardine	3.5×10^{8}	2.4×10^{8}	3.4×10^{8}	4.2×10^{7}	9.1×10^{9}	9.3×10^{6}
S. faecalis	Buffer solution	2.8×10^{8}	2.4×10^{8}	1.1×10^{8}	9.5×10^{7}	1.1×10^{8}	1.1×10^{8}
	Pollack	1.0×10^{10}	1.1×10^{10}	1.1×10^{8}	1.4×10^{10}	1.1×10^{10}	1.1×10^{10}
	Shrimp	2.0×10^{9}	2.4×10^{9}	2.4×10^{9}	1.4×10^{9}	1.5×10^{9}	1.1×10^{9}
	Sardine	2.4×10^{9}	2.1×10^{9}	2.1×10^{9}	2.4×10^{9}	2.4×10^{9}	2.1×10^{9}

에 對한 耐性이 強한 것으로 나타났는데 이것은 Beer 등(1976), Chang 등(1975)이 冷凍魚貝類의 細菌學的試驗에서 腸球菌이 大腸菌에 比해 死滅率이 낮았다고 지적한 것과 비슷하였다.

(2) 試料別 菌數變化

對照試料로 使用한 인산염완충액에 있어서의 細菌의 變化는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 冷凍貯藏中 급격히 減少하고 있으며 魚肉試料와 比較할 때 大腸菌에 있어서는 10% 內外의 差異를 나타내고 있었다.

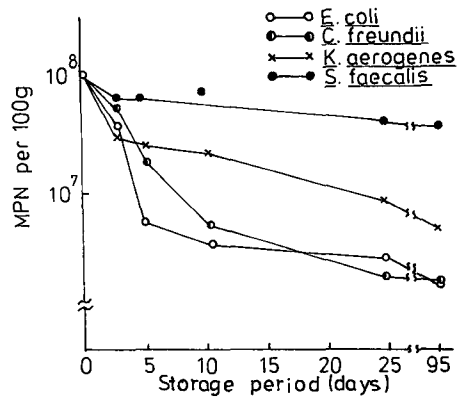

Fig. 1. Change of sanitary bacteria in phosphate buffer solution during the frozen storage period at −20°C.

명대肉에서의 變化는 Fig. 2와 같다. 大腸菌群은 貯藏 5日까지 급격히 감소하였다가 그 以後 貯藏 90日 동안에는 變化가 적은 것으로 나타났는데 이것은 Digirolamo 등(1970)이 *E. coli*는 凍結 初期에 사멸율이 높았으며 그 後 차차 감소하였다고 지적한 것과 같았다. 한편, 腸球菌의 경우는 凍結初期에 다소 減少하였으나 凍結貯藏中에는 變化가 거의 없는 것으로 나타났다.

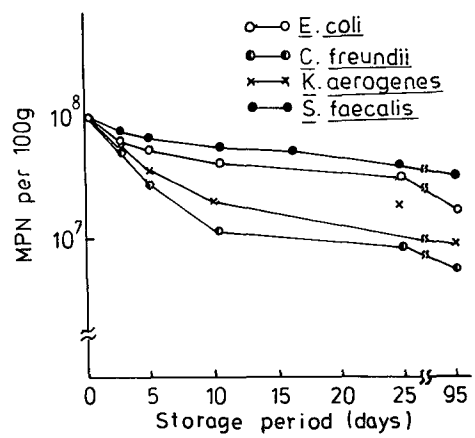

Fig. 2. Change of sanitary indicative bacteria in pollack muscle homogenates during the frozen storage period at −20°C.

새우肉中의 菌數變化는 凍結貯藏 95일에 *E. coli*는 9.3×10^{8}에서 3.7×10^{7}으로 4%, *C. freundii* type I

이 5.2×10^8에서 1.5×10^7으로3%, *K. aerogenes* type I이 6.7×10^8에서 6.4×10^6으로 1%*S. faeccalis*는 4.3×10^9에서 1.1×10^9으로 26%의 生殘率을 나타내었다. 冷凍새우의 細菌學的調査에 關한 硏究로서 Leininger 등(1971), Vanderzant(1972), Zapatka 등(1973), Swartzentuber 등(1980)이 있는데 이들의 結果에 依하면 生菌數는 凍結에 依하여 급격히 감소하였고 低溫貯藏時에는 큰 變動이 없었으며 冷凍食品의 衛生指標細菌으로서 大腸菌보다 腸球菌이 有意하다고 指摘하였는데, 本 硏究의 結果도 이와 유사하였다. 本 實驗에서 정어리와 새우肉 中에서 貯藏 2日 또는 5日 後에 菌數가 다소 增加함을 보인 것은 Oliver(1981)가 굴 중에서 *Vibrio vulnificus* 菌의 低溫貯藏實驗結果에서 지적한 바와 같이 低溫凍害로 인하여 一時的으로 代謝能을 상실하였다가 時間이 경과함에 따라 서서히 이를 회복하는 것과 같은 현상으로 생각된다.

3. MPN 및 選擇培地上에서의 菌數比較

大腸菌과 腸球菌을 인산염완충액과 명태肉 homogenates에 懸濁接種시켜 凍結貯藏하였을 때 大腸菌群은 desoxycholate agar에서 *S. faecalis*는 A·E寒天培地中에서의 檢出率을 MPN法과 比較하여 나타낸 結果는 Table 6과 같다.

Table 6에서 나타낸 바와 같이 大腸菌群의 경우 凍結前에는 큰 差異가 없었으나 凍結에 依한 檢出幅이 심하여 凍結直後 MPN法에 比하여 31~48%를 나타내었으며, 貯藏 95일 後에는 3~16%에 불과하여다. 한편, 腸球菌의 경우는 凍結에 依하여 다소 減少는 하였으나 貯藏期間中에는 거의 變化가 없었다. 따라서, 大腸菌群은 生存하는 細菌中 一部는 desoxycholate agar 배지에서 集落을 형성할 수 없음을 알 수 있었으며, 凍結食品에 있어서는 한천배지에서 보다 액체배지에서 검출이 유효하다고 생각되어진다.

Warseck 등(1973)이 凍結食品中에서 凍害를 입은 大腸菌은 violet red bile agar(VRBA)와 desoxycholate agar에서 集落形成이 抑制되었으며 培養方法에 따라서는 表面도말 培養法 보다 平板매양법에서 더 많은 抑制를 받고, 損傷받은 細胞는 VRBA와 trypticase soy agar(TSA) 배지에서 보다 tryticase soy broth(TSB) 培地中에서 빨리 回復된다고 지적한 것과 一致하였다. 그밖에, Ray 등(1972), Hartman 등(1975), Matumoto 등(1976), Williams 등 (1980), Powell 등(1979), Ann Ma-Lin 등(1980), Wright (1981) 그리고 Klaenhanmer 등(1981)도 凍害를 입은 細菌의 檢出은 培地의 組成에 따라 差異가 있었으며 測定方法에 따라서도 差異가 있었다고 지적한 바 있다.

本實驗에서도 이와 비슷한 結果가 確認되어 凍結食品에 對한 衛生指標細菌의 檢査에 있어서는 배지의 선택과 방법은 물론 정확한 生殘菌數測定을 위한 檢討가 必要함을 알 수 있었다.

結果 및 要約

本硏究는 冷凍水產食品의 細菌學的品質管理에 必要한 자료를 얻기 위하여 凍結 및 低溫貯藏이 衛生指標細菌에 미치는 影響을 檢討하고자 순수배양한 大腸菌群과 腸球菌을 生鮮肉에 임의로 接種시켜 凍結 및 凍結貯藏中에 菌種別·魚種別 生殘率을 比較考察한 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 凍結即後의 生殘菌數는 凍結溫度에 따라 差異

Table 6. Ratio of sanitary indicative bacteria counts detected by the method of selective agar plate vs MPN

Strains	Inoculated sample	Ratio					
		Before freezing	Days of frozen storage at −20°C				
			0	5	11	25	95
E. coli	Buffer solution	85	31	15	8	5	3
	pollack	80	35	24	16	8	7
C. freundii	Buffer solution	89	32	18	10	10	5
	pollack	83	40	32	14	12	9
K. aerogenes	Buffer solution	95	35	21	16	13	12
	pollack	93	48	35	18	16	16
S. faecalis	Buffer solution	98	89	85	88	85	78
	pollack	105	95	88	92	96	83

Ratio: $\frac{\text{Cell count on selective agar plate}}{\text{MPN}}\times100$

가 없었으나, 菌株別로는 *S. faecalis* 30~56%, *K. aerogenes* type Ⅰ 24~43%, *C. freundii* type Ⅰ 18~38%, *E. coli* type Ⅰ 10~39%의 生殘率을 나타내었다.

2. 試料別 生菌數 減少率은 인산염완충액의 경우 74%, 명태肉 70%, 새우肉 69%, 정어리肉에서 58%였다.

3. 貯藏期間에 따른 菌數의 變化는 試料에 따라 다소의 差異는 있었지만 大部分 급속히 減少하여 貯藏 10일 後에 大腸菌群은 90~95%, 腸球菌은 40~70%이었고, 貯藏 95日 後에는 大腸菌群이 4%의 生殘率을 나타내었는데 比하여 腸球菌은 低溫에 安定하여 95일 後에는 20~50%의 生殘率을 나타내어 腸球菌이 大腸菌群에 比하여 低溫에 對하여 耐性의 強함을 알 수 있었다.

4. MPN法과 平板培養法에 依한 菌數檢出率은 凍結後 MPN法이 높게 나타났다. 이것은 凍結에 依하여 損傷을 받은 細菌의 檢出은 액체배지에서보다 平板培地에서 抑制되었음을 알 수 있었다.

文　　獻

Ann Ma-Lin, C. R. A. and L. R. Beuchat. 1980. Recovery of chill-stressed *Vibrio parahaemolyticus* from oyster with enrichment broths supplemented with magnesium and iron salts. Appl. Environ. Microbiol. 39, 179—185.

A. P. H. A. 1970. Recommended Procedures for the bacteriological exeamination of sea water and shellfish. 4th., Am. Pub. Health Assoc., Inc., 1740 Broad way, New York 19, N. Y. 10019, 17—27.

Baer, E. F., A. P. Duran, H. V. Leininger, R. B. Read, Jr., A. H. Schwab and A. Swartzentruber. 1976. Microbiological quality of frozen breaded fish and shellfish products. Appl. Environ. Microbiol. 31, 337—441.

Chang, D. S. and W. K. Choi. 1973. Sanitary indicative bacteria in sundried seafoods. Bull. Korean Fish. Soc. 6(3, 4), 87—91.

Chang, D. S. and W. K. Choi. 1973. Sanitary indicative bacteria in slice of raw fish. Bull. Korean Fish. Soc. 6(3, 4), 92—96.

Chang, D. S., W. K. Choi and K. O. Choi. 1975. Sanitary indicative bacteria in frozen seafoods, Bull. Korean Fish. Soc. 8(3), 157—165.

Digirolamo, R., J. Liston and J. Matches. 1970. The effects of freezing on the survival of *Salmonella* and *E. coli* in pacific oyster. J. Food. Sci. 35, 13—16.

Hartman, P. A., P. S. Hartman and W. W. Lanz. 1975. Violet redbile 2 agar for stressed coliform I. Appl. Environ. Microbiol. 29(4), 537—539.

Horie, S. 1959. Studies on enterococci as pollution indices of food and drink-Ⅰ some observation on the distribution of entercocci. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 25, 294—300.

Horie, S. 1960. Studies on enterococci as pollution indices of food and drink-V Numbers and types of enterococci in human feces, foods and waters. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 26(2), 183—191.

Horie, S. 1960. Studies on enterococci as pollution indices of food and drink-Ⅳ. Nutrient medium suitable for the gorwth of enterococci. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 26(1), 39—44.

Horie. S. 1960.. Studies on enterococci as pollution indeces of food and drink-Ⅶ An improved method for enteococcal test. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 26(2), 169—182.

Horie. S. 1973. Bacterial flora of sea fish. Modern Media. 19(5), 9—20.

Horie. S., M. Yamagata, H. Inoue and T. Izumi. 1974. Comparative evaluation on the determination of coliforms and enterococci in frozen seafood products. J. Food Hyg. Japan 15, 110—115.

Johnson, W. G., A. C. Salinger and W. C. King. 1973. Survial of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster shellstock at two different storage temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 26, 122—123.

Johnson, H. C. and J. Liston. 1973. Sensitivity of *Vibrio parahemoicus* to cold oysters, fish fillets and crab meat J. Food Sci. 38, 437—441.

Kiser, J. S. and T. D. Beckwith. 1942. Effect of fast freezing upon bacterial flora of mackerel. Food Research. 7, 255—259.

Klaenhammer, T. R. and E. G. Kleeman, 1981.

Growth characteristics, bile sensititivity and freeze damage in colonial variants of *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 41(6), 1461—1467.

Leininger. H. V., L. R. Shelton and K. H. Lewis. 1971. Microbioiogy of frozen cream type pies, frozen cooked peeled shrimp, and dry food grade gelatin. Food Technol. 25, 28—30.

Matches, J. R., Liston and L. P. Daneault. 1971. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in fish hamogenate during storage at low temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 21, 951—952.

Matsumoto, M., K. Jinbo, H. Murakami and M. Haruta. 1976. Detection method for injured coliform organisms in milk and dairy products. J. Food Hyg. Soc. Japan. 1, 85—88.

日本冷凍食品協會. 1978. 冷凍食品の規格・基準・檢査方法. 冷凍空調技術. 29(345), 85—115.

Okuzumi, M., S. Horie., K. Imai and K. Matsubara. 1974. Bacterial flora of frozen fish. J. Food Hyg. Soc. Japan. 15(1), 22—29.

Oliver, J. D. 1981. Lethal cold stress of *Vibrio vulnificus* in oysters. Appl. Environ. Microbiol. 41(3), 710—717.

Powell, J. C., A. R. Moor and J. A. Gow. 1979. Comparison of EC broth and medium A-1 for the recovery of *Escherichia coli* from frozen shucked snow crab. Appl. Environ. Microbiol. 37(5), 836—840.

Ray, B. and M. L. Speck. 1972. Repair of injury induced by freezing *Escherichia coli* as influenced by recovery medium. Appl. Environ. Microbiol. 24(2), 258—263.

Ray. B., S. M. Mawkins and C. R. Hackney. 1978. Method for detection of injured *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods. Appl. Environ. Microbiol. 35(6), 1121—1127.

Swartzentruber, A., A. H. Schwab, A. P. Duran, B. A. Wentz and R. B. Read. 1980. Microbiological quality of frozen shrimp and lobster tail in the retail market. Appl. Environ. Microbiol. 40(4), 765—769.

Van den Broek, M. J. M., and D. A. A. Mossel. 1977. Sublethal cold shock in *Vibrio parahaemolyicus*. Appl. Environ. Microbiol. 34, 97—98.

Vanderzant, C. and R. Nichelson. 1972. Survival of *Vibirio parahaemolyticus* in shrimp tissue under various environmental condition. Appl. Environ. Microbiol. 23, 34—37.

Warseck, M., B. Ray and M. L. Sheck, 1973. Repair and enumeration of in jured colifoms in frozen foods. r Appl. Microbiol. 26, 919—924.

Williams R. R., H. M. Wehr, I. R. Stroup, M. Park and B. E. Poindexter. 1980. Effect of freezing and laboratory procedures on the recovery of bacteria from ground beef. J. Food Sci. 45, 757—759.

Wright, C. T. and T. R. Klaenhammer. 1981. Calcium induced alteration of cellular morphology affecting the resistance of *Lactobacillus acidophilus* to freezing. Appl. Environ. Microbiol. 41(3), 807—815.

Zapatka, F. A. and B. Bartolomeo. 1973. Microbiological evaluation of cold water shrimp (Pandalus borealis). Appl. Environ. Microbiol. 25, 858—861.