

食品微生物之檢驗方法 --- 肉毒桿菌及其毒素之檢驗

Methods of Test for Food Microbiology --- Test of *Clostridium botulinum* and Its Toxins

代碼：NLFDUBCLB80

鍵語：肉毒桿菌，*Clostridium botulinum*，
肉毒桿菌毒素，Botulinum toxins

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於罐頭食品，瓶裝食品，真空包裝食品，真空調理食品，洋香腸，洋火腿，蜂蜜，嬰兒奶粉，麥粉，米粉，果汁，混合穀類食品，醃製食品，煙燻魚製品中肉毒桿菌及其毒素之檢驗。

2. 實驗室的預防措施：

- 2.1. 在大門上懸掛生物危害標誌，管制人員進入，以及將實驗室內的人數維持至最低需求量。
- 2.2. 所有工作人員，均應穿著實驗衣並戴安全眼鏡。
- 2.3. 配製胰蛋白酶溶液時，應於生物危害抽氣櫃中稱重並戴口罩。
- 2.4. 工作前、後應以 1% 次氯酸溶液擦拭工作檯。
- 2.5. 絕不可以用口吸取任何檢體，應該以機械式吸管輔助器操作。
- 2.6. 實驗操作儘可能於生物危害抽氣櫃進行操作。
- 2.7. 檢體應置於密封且具有安全杯之離心機內離心。
- 2.8. 檢驗後工作人員應親自將所使用過之器材及廢棄物，立即送進滅菌釜滅菌。
- 2.9. 下班後或週末假日，不要單獨一個人在實驗室或動物室中工作。
- 2.10. 應有洗眼用噴水器，及腳踏或自動式洗手設備。
- 2.11. 嚴禁在實驗室內飲食。
- 2.12. 應在明顯處張貼可獲得治療用肉毒桿菌抗毒素的緊急連絡電話號碼。
- 2.13. 實驗室應保持整潔，設備及材料使用完後放置回適當之位置。

3. 器具及材料：

- 3.1. 冰箱

- 3.2. 清潔乾燥紙巾
- 3.3. 本生燈或酒精燈
- 3.4. 已滅菌的開罐器
- 3.5. 已滅菌的研鉢及杵臼
- 3.6. 已滅菌的鑷子
- 3.7. 已滅菌的有棉花栓子的吸管
- 3.8. 吸管輔助器
- 3.9. 已滅菌附螺旋蓋的培養試管及玻璃瓶
- 3.10. 厭氧箱
- 3.11. 厭氧包
- 3.12. 接種用白金耳
- 3.13. 恆溫培養箱，35°C 和 26°C
- 3.14. 已滅菌之檢體保存箱
- 3.15. 菌株培養試管放置用試管架
- 3.16. 光學顯微鏡用載玻片，蓋玻片
- 3.17. 相位差或亮視野(bright field)顯微鏡
- 3.18. 滅菌培養皿
- 3.19. 附密封蓋離心管
- 3.20. 高速、低溫離心機，可達 7,500 x g 以上
- 3.21. 注射筒：1 mL 及 3 mL，附 25 號，5/8 吋的注射針
- 3.22. 小鼠：雄性，體重 16~24 g
- 3.23. 小鼠用籠子、飼料、飲水瓶等
- 3.24. 恆溫水浴，可達 100°C
- 3.25. 強韌防水無菌塑膠袋
- 3.26. 透析膜：36/32，於 121°C 滅菌 15 分鐘
- 3.27. 已滅菌的濾膜，0.2 μ m 孔徑，親水性醋酸纖維膜
- 3.28. 培養基

3.28.1. 肉質培養基(Cooked Meat Medium, CMM)

牛心(Beef heart)	454 g
豚蛋白胨(Proteose peptone)	20 g
葡萄糖(Dextrose)	2 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
蒸餾水(Distilled water)	1 L

稱取脫水肉質培養基 1.25 g 置入 20×150 mm 的試管中，加入冷卻的蒸餾水 10 mL(或是稱取 12.5 g 加入冷卻的蒸餾水 100 mL)；充分混合並使之完全溼潤後(約需 15 分鐘)，於 121°C 殺菌 20 分鐘，最後 pH 值為 7.2±0.2。

3.28.2. 胰化酪蛋白—蛋白胨—葡萄糖—酵母抽取物培養液
(Trypticase - Peptone - Glucose - Yeast Extract
Broth, TPGY)

胰化酪蛋白(Trypticase)	50 g
-------------------	------

蛋白胨(Peptone)	5 g
酵母抽取物(Yeast extract)	20 g
葡萄糖(Glucose)	4 g
硫甘醇鈉(Sodium thioglycollate)	1 g
蒸餾水	1 L

使完全溶解後，分裝 15 mL 至 20×150 mm 試管中，於 121℃ 殺菌 10 分鐘。最後 pH 值為 7.0±0.2。於 5℃ 冷藏。

3.28.3. 厭氧蛋黃培養基(Anaerobic Egg Yolk Agar, AEYA)

酵母抽取物(Yeast extract)	5 g
胰化蛋白(Tryptone)	5 g
胨蛋白胨(Proteose peptone)	20 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
洋菜(Agar)	20 g
蒸餾水	1 L

使完全溶解後，121℃ 殺菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.0±0.2。待冷卻至 48~50℃，添加市售蛋黃液 80 mL 並充分混合避免產生氣泡。隨即傾倒 15~20 mL 的培養基至每一培養皿。待凝固後，在室溫乾燥 2~3 天，或在 35℃ 下乾燥 24 小時。使用前確認培養基未受污染，乾燥後之培養基可冷藏貯存一短暫時間。

3.28.4. 胰化酪蛋白—蛋白胨—葡萄糖—酵母抽取物—胰蛋白 酵素培養液(Trypticase - Peptone - Glucose - Yeast Extract Broth with Trypsin, TPGYT)

胰蛋白酵素溶液(Trypsin solution)之配製：

胰蛋白酵素(1:250)	1.5 g
蒸餾水	100 mL

將胰蛋白酵素加入蒸餾水中使完全懸著，靜置並使顆粒穩定，以 0.45 μm 的濾膜過濾上清液。使用前以蒸氣或沸水加熱 10 分鐘去除液體中之溶氧。

加入 1 mL 胰蛋白酵素溶液於 15 mL 的 TPGY，或加入 6.7 mL 胰蛋白酵素溶液於 100 mL 的 TPGY。

3.29. 試劑：

3.29.1. 碘酒(Alcoholic solution of iodine)

碘	10 g
碘化鉀	10 g
70%酒精	500 mL

3.29.2. 明膠—磷酸緩衝液(Gel - phosphate buffer)，pH6.2

明膠(Gelatin)	2 g
磷酸氫二鈉(Na ₂ HPO ₄)	4 g
蒸餾水	1 L

微加熱至溶解，以 121℃ 滅菌 20 分鐘，最終 pH 值為 6.2。

3.29.3. 無水酒精(Absolute alcohol)

3.29.4. 格蘭氏染色液(Gram stain solution)：格蘭氏染色液組包括哈克

氏結晶紫液(Hucker's crystal violet)、格蘭氏碘液、格蘭氏脫色劑，及格蘭氏複染液(Safranin)。

3.29.5. 0.85%滅菌生理食鹽水

3.29.6. 1N 氫氧化鈉溶液

3.29.7. 1N 鹽酸溶液

3.29.8. 50%滅菌甘油水：取甘油 50 g 加蒸餾水至 100 mL，於 121°C 滅菌 15 分鐘

3.29.9. A - F 型單價肉毒桿菌抗毒素與 A - F 型多價肉毒桿菌抗毒素 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, U.S.A.)：冷凍乾燥的抗毒素以滅菌 50%甘油水依標示復水，供作抗毒素原液備用。以生理食鹽水對抗毒素原液行 5 倍稀釋，供注射小鼠用。

3.29.10. 10%胰蛋白酵素溶液：取胰蛋白酵素(1：250) 1.0 g 至乾淨培養試管中，加蒸餾水 10 mL 振搖，微熱至溶解。

3.29.11. 1% 次氯酸鈉(sodium hypochlorite) 溶液

3.29.12. 50%蛋黃液

4. 檢體之處理：

將檢體冷藏於冰箱中，直至檢驗時方取出。除非有快速膨脹及爆裂之慮，未開封的罐頭食品不需存放於冰箱中。試驗前，記錄產品名稱，製造廠商名稱或是家庭製作，檢品來源，容器型式及大小，標示，製造批次，批號或產品代碼，以及容器外觀等資料。清洗容器之外觀，並標示實驗室代碼。

4.1. 固體及液體食品

在無菌環境中將固體食品或僅含少量液體的食品，置入滅菌的研鉢中，加入等量的滅菌明膠—磷酸緩衝溶液，並用已滅菌的研杵研磨後(或用已滅菌的鑷子夾取小塊檢體)，直接接種於增菌 CMM 中；液體食品則用已滅菌的吸管，直接接種於增菌 CMM 中。接種完後，將剩餘檢體以無菌方式操作保存在已滅菌的檢體保存罐中，並冷藏保存檢體，以備爾後需用。

4.2. 罐頭食品

檢查檢體之外觀及氣味，記錄任何產品分解之事證，及所見之狀況。在任何情況下，均不可以口嚐試檢體。

5. 肉毒桿菌檢測：

5.1. 增菌：

5.1.1. 一般食品

接種前將增菌用培養基以蒸氣或沸水加熱 10 ~ 15 分鐘以去除溶氧，快速冷卻並避免要振盪。取二支裝有 CMM 的試管，分別接種入 1~2 g 或 1~2 mL 的檢體，置於 35°C 培養。依前述方法同時接種二支 TPGY 的試管，置於 26°C 培養。當懷疑檢體

中有非蛋白水解性 B 型，E 型、或 F 型產毒肉毒桿菌時，接種檢體至 TPGYT 中增菌。緩緩的將檢體沿管壁接種至試管底部，接種後七日，檢查增菌培養基。檢查項目應包括：混濁度，氣體產生，及粒狀培養基的消化情形，並注意氣味。培養 7 日後，若沒有明顯的細菌增長現象，則再繼續培養 10 日。

5.1.2. 煙燻魚製品

將 1 尾或數尾（視檢體體積大小而定）真空包裝或是散裝的煙燻魚製品，置入強韌且防水的無菌塑膠袋中。添加已滅菌冷卻的 TPGY 至淹蓋過檢體，擠壓塑膠袋以去除多餘的空氣，以膠袋密封容器或其他類似器具封閉塑膠袋。於 26~28°C 下培養 7 日，培養期間注意因產生氣體所引起的塑膠袋膨脹及破裂。

5.1.3. 蜂蜜

將檢體置於 45°C 水浴中一小時後，反覆上下倒置約 50 次，取 25 g 檢體置於已滅菌的三角瓶中，加入 20 mL 無菌水，使蜂蜜溶解後，倒入已滅菌之透析膜(44 mm×45 cm，事先將一端以線封綁，以 121°C，滅菌 15 分鐘)。以無菌水洗滌三角瓶瓶底之殘餘蜂蜜，倒入透析膜中，以線將另一端開口綁緊後置於蒸餾水中並將透析膜淹蓋，4°C 下透析 24 小時，分別在第 2、4、19 小時換水，透析後之體積約 140 mL。剪開透析膜時，先以 1% 次氯酸鈉溶液擦拭透析膜前端。倒入已預先放入 5 g CMM(加少量的水濕潤，以 121°C 滅菌 15 分鐘) 具瓶蓋之 300 mL 玻璃瓶中；以無菌水加至 150 mL 之刻度，透析膜以 60 mL 雙倍濃度之 TPGY 洗滌後倒入瓶內，重覆二次，最後以 TPGY 將瓶內體積加至 300 mL，再將此瓶於 80°C 的水浴中加熱 25 分鐘後，置於 35°C 無氧環境，培養 7 天。

緩緩的將檢體沿管壁接種至試管底部，接種後七日，檢查增菌培養基之混濁度，氣體產生，及粒狀培養基的消化情形，並注意氣味。培養 7 日後，若沒有明顯的細菌增長現象，則再繼續培養 10 日。

5.2. 分離菌株：

5.2.1. 前處理

添加與培養液等量經過濾滅菌的無水酒精，至盛有 1 或 2 mL

5.1. 已接種增菌培養液之已滅菌附螺旋蓋的試管中。充分混合，在室溫下培養 1 小時。若欲直接自檢體中分離肉毒桿菌，則取 1 或 2 mL 保留之檢體，加入等量經過濾滅菌的無水酒精於附螺旋蓋的試管中，充分混合，在室溫下放置 1 小時。或以 80°C 加熱 10~15 分鐘 1 或 2 mL 已接種增菌培養液或是檢體，以破壞營養細胞(註 1)。

註 1：絕對不可以加熱方式處理非蛋白水解型肉毒桿菌。

5.2.2. 劃線培養

以接種環取 1 或 2 環經酒精或加熱處理的增菌培養液，劃線接種於 AEYA 上(註 2)。必要時，適當稀釋此培養液以便獲得良好分離的單一菌落。在厭氧環境，35°C 下培養 48 小時(註 3)。

註 2：使用表面乾燥之 AEYA。

註 3：採用厭氧缸或是厭氧性氣體產生系統，以維持一厭氧環境，然而也可使用其他相似的系統以維持厭氧環境。

5.3. 典型菌落的選取：

- 5.3.1. 肉毒桿菌之典型菌落形態凸起或扁平、平滑或粗糙菌落、亦有菌落呈現擴散而周緣輪廓不規則狀。在 AEYA 上，以斜角度檢視培養基時，菌落常呈現真珠光澤。這一真珠光澤區域常常跨越過菌落週緣之不規則狀輪廓，而呈現向外擴散之趨勢。除了真珠光澤區域外，C 型、D 型、及 E 型肉毒桿菌之菌落，其外常圍繞著一約 2~4 mm 寬的黃色沈澱環。A 型及 B 型肉毒桿菌，通常菌落周圍的沈澱環較小(註 4)。

註 4：為數甚多的梭狀桿菌屬細菌(*Clostridium* spp.)之菌落形態與肉毒桿菌相似，但不會產生肉毒桿菌毒素，故在選取肉毒桿菌菌落時，須靠經驗來克服。

- 5.3.2. 用已滅菌的接種環，選取 10 個各別生長良好的典型菌落接種至已滅菌的 CMM，於 35°C 厭氧培養七日。接種 E 型肉毒桿菌至已滅菌的 TPGY，於 26°C 厭氧培養七日。七日後檢測毒素產生與否，其步驟依下節肉毒桿菌毒素之檢測。

- 5.3.3. 將產生毒素的培養液，以二重複再次劃線於 AEYA。其中一個培養基置於厭氧下 35°C 培養，另一個置於耗氧下 35°C 培養。典型的肉毒桿菌菌落，僅生長在厭氧環境下(註 5)。將分離純化的肉毒桿菌，以芽胞狀態與保存珠一起貯存於冰箱中，或是凍結乾燥保存。

註 5：肉毒桿菌在混合菌叢中相對的分離比例甚低，可經由系列性連續的額外增菌培養步驟，以提高菌落之分離率。

6. 毒素的檢測與型別鑑定：

6.1. 檢體的處理：

將檢體分為三部份，一部份用於檢測肉毒桿菌的活菌，一部份用於毒性試驗，其餘部份則保存於冰箱中。

6.1.1. 液體食品

取前述 5.1. TPGY 增菌培養液 20 mL，以 7,500 x g 低溫離心 20 分鐘，測定培養液之 pH 值，若是超過 pH 6.5，則以 1N 鹽酸溶液調整至 pH 6.0~6.2。冷藏保存隔夜。

6.1.2. 固體食品

取經預冷(prechilled)處理的研鉢及研杵，加入固體檢體及等量的 pH 6.2 滅菌明膠-磷酸緩衝液，當檢體浸軟後研磨，於低溫離心檢體，使用上清液進行毒性試驗。

6.1.3. 可疑容器檢體

取已滅菌明膠-磷酸緩衝溶液數毫升，清洗盛裝檢體之容器；儘可能減少明膠-磷酸緩衝溶液的用量，防止毒素被稀釋至檢測極限之下之情形。

6.2. 毒性確認：

6.2.1. 胰蛋白酵素處理：

為易於檢測非蛋白水解性毒素，可取一部份檢液、液體食品、或 TPGY 培養液，在檢測毒素前先以胰蛋白酵素處理(註 6)。將檢體離心後，以 1N 的氫氧化鈉溶液或 1N 的鹽酸溶液，調整離心檢體上清液的 pH 值至 6.2，作為檢液。取 1.8 mL 的各檢液分別注入試管中，添加 0.2 mL 的胰蛋白酵素溶液，在 35~37°C 放置 1 小時，時時搖動之，以供檢測檢體之毒性。

註 6：TPGYT 培養液中含有胰蛋白酵素，不必再以胰蛋白酵素處理，若再經胰蛋白酵素處理可能使存於其中的任何完全活化毒素被分解殆盡。

6.2.2. 毒性試驗：

以明膠磷酸緩衝液將檢液稀釋成 5, 10, 及 100 倍的稀釋檢液。所有檢液包括原液、及各稀釋檢液，對小鼠腹腔注射 0.5 mL，均行二重複試驗。取 1.5 mL 未經胰蛋白酵素處理組檢液，於 100°C 加熱 10 分鐘；待冷卻後，每一檢液取 0.5 mL 對小鼠腹腔注射，行二重複試驗(註 7)。48 小時內定時觀察試驗小鼠有無肉毒桿菌毒素中毒症狀及死亡，並做作成記錄。典型的肉毒桿菌毒素中毒症狀，在投予檢液 24 小時內，引起小鼠皮毛豎立、繼至呼吸困難、四肢軟弱，終至呼吸麻痺，呼吸衰竭死亡(註 8)。經過 48 小時觀察，若所有的小鼠均死亡，僅有接受熱處理組檢液的小鼠存活，則須使用更高倍數的稀釋檢液，重複此一毒性試驗。此毒性試驗中必須要有殺死小鼠的稀釋倍數及不會殺死小鼠的稀釋倍數，以建立一試驗終點或是最小致死量，憑以預估毒素含量。能殺死所有接種小鼠的最高稀釋倍數謂之最小致死量，從這些數據，可以計算出每 mL 檢液中含肉毒桿菌毒素的最小致死量數值。

註 7：熱會破壞肉毒桿菌毒素，因此檢液經 100°C 加熱 10 分鐘後，應不會引發小鼠死亡。

註 8：沒有肉毒桿菌毒素中毒症狀的小鼠死亡，表示檢液中不含有肉毒桿菌毒素，小鼠之死亡可能肇因於其它化學物質或外力(trauma)。

6.2.3. 毒素型別鑑定：

將 A、B、E 及 F 型抗毒素原液，以滅菌生理食鹽水稀釋至每毫升含有 2 個國際單位(註 9)。使用最高稀釋倍數所獲得的最小致死量(包括未處理組及胰蛋白酵素處理組)的檢液，進行毒性檢液之製備，其中至少需包括最小致死量的 10, 100 及 1,000 等稀釋倍數。未處理的毒性檢液，依照 6.2.2. 的方法進行製備(註 10)。

腹腔注射 0.5 mL 的各型單價肉毒桿菌抗毒素(每毫升含有 2 個國際單位)，經 30 分鐘至 1 小時後，再腹腔注射 0.5 mL 的檢液，每一稀釋檢液均行二重複試驗。每一稀釋之毒性檢品，亦注射至二隻未經任何抗毒素保護的小鼠，以作為對照組。使用

A、B、E及F四型單價抗毒素，每一抗毒素計使用 6 隻小鼠，四種抗毒素，共 24 隻小鼠，外加三種稀釋對照組檢液，共 6 隻小鼠，合計使用 30 隻小鼠。觀察小鼠 48 小時，並記錄肉毒桿菌毒素中毒症狀及死亡。若試驗結果顯示毒素未被中和，則使用單價抗毒素測定 C 型及 D 型毒素，與多價抗毒素重新測定 A 型至 F 型毒素。

註 9：絕不可以使用甘油水溶液稀釋抗毒素原液。

註 10：經胰蛋白酵素處理的檢液其致死性最高，由於胰蛋白酵素的持續作用，會破壞肉毒桿菌毒素，因此在毒素型別鑑定時，檢液必須採用胰蛋白酵素新鮮處理者。

7. 肉毒桿菌毒素分析須知：

- 7.1. 試驗初起 24 小時，是小鼠的症狀和死亡的關鍵時刻，98~99% 的試驗動物於 24 小時內死亡。典型的肉毒桿菌中毒症狀和死亡，可能發生在投予含肉毒桿菌毒素之檢液後 4 到 6 小時內。
- 7.2. 若死亡發生在 24 小時之後，除非有非常明確的典型肉毒桿菌中毒症狀，否則僅屬疑似個案。
- 7.3. 若注射 1:2 或是 1:5 倍之稀釋檢液的小鼠死亡，但不見任何注射更高稀釋倍數檢液的小鼠死亡，則僅屬疑似個案，小鼠死亡可能是由於不明原因所致。
- 7.4. 可用不易脫落之染料塗佈在小鼠尾部，以供識別投予不同稀釋倍數檢液之用。
- 7.5. 注射肉毒桿菌毒素的小鼠，在出現症狀之前可能變得較為過度活動(hyperactive)。
- 7.6. 注射檢液後立即供應小鼠食物及飲水並不會影響試驗之正確性。
- 7.7. 復水後的抗毒素可冷藏維持 6 個月的效期，冷凍保存則可維持更長的效期。
- 7.8. TPGY 具有相當的穩定性，可冷藏保存 2~3 週。
- 7.9. 使用 CMM 培養基應旋緊試管蓋，因為肉毒桿菌毒素可能吸著於培養基之肉粒上。
- 7.10. 胰蛋白酵素溶液無需濾過，將 1g 胰蛋白酵素溶解在 10 mL 蒸餾水中，可冷藏存放 1 週。

8. 試驗資料之解讀：

- 8.1. 若消費者未能徹底加熱食品，則存於食品中的肉毒桿菌毒素能夠引致肉毒桿菌毒素中毒。
- 8.2. 食品中存有活的肉毒桿菌，但是沒有檢測出毒素，不能證明此一食品是引發肉毒桿菌中毒之原因食品。
- 8.3. 食品中存有肉毒桿菌毒素，係引起肉毒桿菌毒素中毒的必備要件。
- 8.4. 肉毒桿菌不能在活體內增生及產生肉毒桿菌毒素，但在嬰兒體內

則可以。

- 3.5. 在低酸性罐頭食品中存有肉毒桿菌毒素或菌體，表示此罐頭滅菌不完全，或是加工後經由孔隙污染。
- 3.6. 由於肉毒桿菌生長過程中會產生氣體，因此膨罐較平罐更容易有肉毒桿菌毒素的存在。
- 3.7. 平罐而有肉毒桿菌毒素者，表示罐頭密封不全。
- 3.8. 由於蛋白分解性孢子具有較高的耐熱性，因此常見於罐頭內的肉毒桿菌毒素是 A 型，或蛋白水解性 B 型。
- 3.9. 非蛋白分解性的 B、E 及 F 型孢子，一般耐熱性較低，故經熱處理即無法存活。
- 3.10. 注射單價肉毒桿菌抗毒素之小鼠，再注射檢液可免於中毒和死亡，即可確認檢體中含有肉毒桿菌毒素，及其毒素型別。
- 3.11. 小鼠若無法受到一種單價肉毒桿菌抗毒素的保護，仍然有死亡發生時，可能是由於檢體中的肉毒桿菌毒素含量太高，或是檢體中可能存有一種以上的肉毒桿菌毒素，亦有可能由其他不明原因所引起的。此時必須對含毒性之檢液進行高倍率稀釋，且以多價肉毒桿菌抗毒素取代單價肉毒桿菌抗毒素。某些耐熱之毒性物質，可能引起加熱組及未加熱組試驗小鼠死亡。這些耐熱之毒性物質，可能遮掩肉毒桿菌毒素的毒性。

參考文獻：

1. 杜先覺, 鄭崇明, 賴幸宜, 陳陸宏. (1991) 併用半透膜透析, 肉羹增菌及實驗動物毒害法篩選市售蜂蜜與嬰兒食品中肉毒桿菌孢子, 中華微免雜誌 24:240-247.
2. 陳陸宏, 鄭崇明, 張如楣, 杜先覺, 王繼忠. (1987) 「蔭花生」肉毒桿菌中毒檢驗報告, 食品科學 14:92-94.
3. AOAC International. (1995) *Clostridium botulinum* and its toxins in foods, pp46-48, In "AOAC Official Methods of Analysis", AOAC International, Gaithersburg, MD, U.S.A.
4. Solomon H. M., Rhodehamel E. J., and Kautter D. A. (1995) Chapter 17. *Clostridium botulinum*, In "FDA Bacteriological Analytical Manual(8th Edition)", pp.17.01-17.10, AOAC International, Gaithersburg, MD, U.S.A.