Kor. J. Food Hygiene 8 (1), 55-61 (1993)

*Clostridium botulinum*의 분포 및 수종 식품에서의 *botulinum toxin* 생성능 비교연구

權乃昤 · 朴明鎬* · 閔鳳熙
대구대학교 사범대학 생물교육과
*대구보건전문대학 치과기공과

Incidence of *Clostridium botulinum* in Natural Reservoirs and Toxin Production in Some Foodstuffs

Nae Young Kwon, Myong Ho Park* and Bong Hee Min
Department of Biology Education, Taegu University
**Department of Dental Technology, Taegu Junior Health College*

ABSTRACT—Soil samples and the intestinal contents of arthropods, mollusca, pisces, aves, and mammals were examined for the presence of *Clostridium botulinum*. Demonstration of *Clostridium botulimun* was accomplished by identifying its toxin in liquid cultures inoculated with soil or material from the alimentary tract of tested animals with toxin neutralization tests in addition to morphological, cultural and biochemical tests. Incidences of *Clostridium botulinum* in tested samples were 5.0% in soil, 6.7% in mammal and 8.7% in fish, respectively. All of the positive cultures were identified as *Clostridium botulinum* type E and any other type was not demonstrated throughout the survey. Canned foods and solid ham/sausage mixture formulated as can with distilled water were inoculated with *Clostridium botulinum* type E and checked for toxin production by using the mouse bioassay. *Clostridium botulinum* type E toxin was produced as a large quantity in canned foods of fish, shell, meat and ham and, however, no significant toxin was detected in sausages and fruit samples.

Keywords □ ***Clostridium botulinum*, Botulinum poisoning, Botulism, Food poisoning.**

식중독은 인간의 식생활과 밀접한 관련이 있어 중요시 되어 왔으며 인체 뿐만 아니라 가축에도 감염, 중독을 일으키어 과거부터 지대한 관심의 대상이 되어 왔다.[1-3]

식중독은 여러가지 원인에 의하여 발생할 수 있으나 감염성, 유발성, 피해정도에 있어 세균성 식중독이 대부분을 차지하고 있으므로[4,5] 세균성 식중독 문제는 국민보건 측면에서 하나의 중요한 문제로 부각되고 있다.

식중독 원인균으로는 *Staphylococcus, Salmonella* 속 세균에 의한 식중독이 대부분이며 그 밖에 *Clostridium, Shigella, Escherichia, Vibrio, Bacillus, Yersinia* 등에 의한 식중독 등[5] 다양한 양상을 나타내고 있다. 특히 이들 대부분의 식중독이 색, 냄새, 맛 등 식품의 외관적 변화를 일으키지 않기 때문에 오염식품 판별에 어려움이 있으며 따라서 대규모의 집단적 피해를 유발하는 것이 상례이다.

우리나라의 세균성 식중독은 주로 *Staphylococcus* 및 *Vibrio*속 세균에 의하여 유발되는 식중독이 대부분으로서 집단급식 또는 어패류의 생식에서 많은 발병사례가 보고[6-8]된 바 있으나 *Clostridium botulinum*(*C. botulinum*)에 의한 식중독 사례는 아직 정식 보고된 바 없다.

Botulinum poisoning은 미국, 유럽, 소련, 동남아제국 등 많은 나라에서 높은 발병율을 기록하고 있으며 가까운 일본에서도 매년 수 천명의 환자 발생 보고가 있어 전 세계적으로 발생하고 있는 질병[9]

Received for publication 20 October, 1992
Reprint request: Dr. B.H. Min at the above address

으로 판단되나, 우리나라에서의 발생보고가 아직 전무함은 발생빈도가 낮음에도 원인이 있겠으나 botulinum poisoning에 대한 인식이 부족하여 진단에 어려움이 있기 때문인 것으로 추측된다.

우리나라에서의 *C. botulinum*의 분리 보고는 토양으로부터 분리한 type C[10]가 효시이며 이같은 연구 결과는 다른 type의 국내 분포 가능성을 강력히 시사하는 것으로서 인간에게 식중독을 일으키는 *C. botulinum* type A, B 및 E의 국내 분포 조사 연구를 수행하여야 할 필요성이 강조되는 바이다.

따라서 본 연구는 botulinum poisoning의 원인균인 *C. botulinum*의 분리 동정실험을 실시하여 국내 분포를 확인하고 식중독 유발 가능성이 있는 식품 수 종을 대상으로 botulinum toxin 생성능을 비교 분석하여 botulinum poisoning 유발 가능성이 있는 식품을 선별하고자 실시하였다.

실험재료 및 방법

*Clostridium botulinum*의 분리

토양을 비롯하여 호수, 연못의 진흙, 해안의 갯벌, 어류 및 가금류의 소화기관, 패류 등 *C. botulinum*의 natural reservoir로 보고되어 있는 시료를 대상으로 *C. botulinum* 분리를 시도하였다.

시료 1~2 gm을 0.1 M phosphate buffer(pH 7.2) 15 m*l*에 넣어 2~5분간 homogenate한 후 centrifuge (1,500 rpm, 10분)하여 상등액을 채취, 70~80℃에서 15분간 열처리한 후 증식배양액에 접종하였다. 증식배양액으로는 Cooked meat medium, Egg meat medium, AC medium, Veal infusion medium 등을 이용하여 증식능이 우수한 배지를 선정하였으며, 분리방법은 Haq and Sakaguchi 방법[11] 및 Silas *et al.*[12] 방법에 의거, 실시하였다.

*C. botulinum*의 증식이 우수한 cooked meat medium에서 배양(35℃에서 10일간 배양)한 증식 배양액 0.5 m*l*를 2~4수의 mouse(ICR strain, 20~23 gm) 복강내에 각각 주사하여 mouse toxicity를 관찰한 후 독성이 있는 배양액으로부터 세균 분리를 시도하였다. 세균분리는 GAM agar(Nissui Seiyaku, Japan), Brewer anaerobic agar(Difco Lab. USA), Anaerobic egg york agar(Difco Lab. USA)를 사용, Gas Pak을 이용한 혐기성 배양을 실시하였다. *C. botulinum*으로 특정지워지는 colony를 채취, 다시 순수배양하고 이들 배양액을 다시 mouse 복강내에 주사하여 botulism 특유의 증상을 나타내는 배양액을 선정하여 mouse toxicity 측정방법[13]에 의거, 배양액의 toxicity를 측정하였다. 여기서 얻은 toxin 배양으로부터 상기 순수분리실험 및 mouse toxicity 측정실험을 수회 반복하여 *C. botulinum*의 순수 배양액을 얻었다.

*Clostridium botulinum*의 동정

순수분리한 *C. botulinum*의 형태적 관찰, 배양상의 특징, 생화학적인 시험 등을 표준균주(Type A =ATCC 3502, Type B=ATCC 7948, Type C= Stockholm, Type D=ATCC 9633, Type E=ATCC 17786, Type F=ATCC 23387, Type G=ATCC 27322)와 비교하여 Bergey's Manual[14]에 의거, 동정하였다. 또한 표준균주에 대한 각각의 항혈청을 제조하여 이들 항혈청을 이용한 mouse 중화시험을 실시, 분리 균주를 typing하였다.

수 종 식품에서의 toxin 생성능 비교실험

우리나라에서 가공 시판되고 있는 식품, 특히 sausage, 훈제식품, 통조림식품의 botulinum toxin 생성능을 비교 실험하였다.

어류, 패류, 과일, 야채류의 식품 및 그밖에 미생물 오염이 가능한 비포장식품을 종류별로 구분하여 4~5개의 시료를 ramdom sampling한 후, 분리균주를 접종하여 35℃에서 4~7일간 배양하면서 pH변화, 세균증식능 및 dose-survival time 측정법[15]에 의한 toxicity를 측정하여 botulinum poisoning 유발 가능성이 있는 식품을 선정하였다.

결과 및 고찰

*Clostridium botulinum*의 분리

전국 토양을 중심으로 특히 혐기성 상태를 유지하고 있는 진흙 심층부, 해안 갯벌의 혐기성 토양, 해수산 어류, 패류, 절족동물의 소화기관, 각종 조류 및 포유류의 소화기관을 대상으로 *C. botulinum* 분리를 시도하였다.

각종 시료로부터의 *C. botulinum* 분리는 Table 1에서 보는 바와 같이 총 158개 시료중 10개의 시료

Table 1. Incidence of *Clostridium botulinum* in several possible sources

Sample	No. of samples tested	No. of samples induced mouse toxicity*	No. of samples induced botulinum toxicity**	No. of isolation of *C. botulinum*
Arthropoda	5	3 (60.0)	–	–
Mollusca	26	5 (19.2)	1 (3.8)	–
Pisces	23	8 (34.8)	4 (17.4)	2 (8.7)
Aves	29	5 (17.2)	–	–
Mammalia	15	3 (20.0)	2 (13.3)	1 (6.7)
Soil	60	12 (20.0)	3 (5.0)	3 (5.0)
Total	158	36 (22.8)	10 (6.3)	6 (3.8)

The mouse toxicity was determined by the intraperitoneal injection of 0.5 m*l* of the culture suspension of the cooked meat medium. Two to four mice (20-23 gm) were used on each test and observed for 4 days to make sure that deaths were due to botulism. *; Death with or without symptom, **; Death with typical symptom of botulism. The numbers in parentheses indicate percentage.

(6.3%)로부터 *C. botulinum*의 분포 가능성을 확인하였으나 어류(자리돔 및 곤들매기) 2개 시료의 소화기관, 돼지의 분비물 1개 시료, 토양(해안 갯벌 및 연못 밑 진흙) 3개 시료 등 6개 시료로부터 *C. botulinum*을 순수 분리하여 3.8%의 낮은 분리율을 나타내고 있었다.

Cooked meat mediun에서 배양시 전체 대상시료(158개)중 36개 시료(22.8%)에서 mouse toxicity를 인정할 수 있었으나 botulism 특유의 증상을 나타내는 시료는 10개 시료(6.3%)로서 비교적 높은 비특이적 치사율을 나타내고 있었다. 이같은 비특이적 치사현상은 각종 동물의 소화기관 시료에서 높은 빈도로 나타났는데 *C. botulinum* 이외의 다른 미생물에 의한 감염[16] 특히 Gram 음성세균이 생성하는 대사산물에 의한 치사작용[17]으로 추정된다.

*C. botulinum*은 토양(5.0%)에 비하여 포유동물의 소화기관(6.7%) 또는 어류의 소화기관(8.7%)에서 높은 분포를 나타내어 동물의 소화기관이 *C. botulinum*의 natural reservoir로 추측되나 동물의 소화기관으로부터의 *C. botulinum* 순수분리는 비교적 곤란하여 50% 이하의 낮은 분리율을 나타내었다.

*C. botulinum*의 증식배지로서 Cooked meat medium, Egg meat medium, AC medium, Veal infusion medium 등을 비교하였던 바 배양액에 따른 분리능에 현저한 차이가 없었으며 Cooked meat medium의 분리능이 가장 우수하여 증식배양액으로 선정, 사용하였다.

*C. botulinum*의 분리능을 높이기 위하여 열처리, NaN_3 등의 저해제 처리, 선택배지의 사용 등을 시도하였으나 현저한 상승효과를 관찰할 수 없었으며, 배양온도(30～37℃) 또는 배양기간(5～10일) 변화도 세균분리에 영향을 주지 않았다. 일반적으로 동물의 소화기관은 토양에 비하여 미생물 균체수가 많으며 혐기성 포자생성 세균이 대부분이기 때문에 *C. botulinum*의 순수분리가 곤란한 것으로 추측된다. 따라서 열처리, sodium azide, alcohol 및 항생제 첨가 등 물리 화학적인 방법을 이용하여 *C. botulinum*의 선택분리를 시도한 연구[18,19]가 있으나 본 연구에서는 커다란 유의성을 관찰할 수 없었다.

토양에서의 *C. botulinum* 분리율 5.0%는 type C의 분리율(46.7%)에 비하여 현저히 낮았는데[10] 다른 연구자들의 연구 결과(1.2%～8.0%)와 유사하였다.[9,20] 그러나 동물의 소화기관으로부터의 분리율은 다른 연구보고[21,22]에 비하여 현저히 낮았는데 이는 *C. botulinum*의 지리적 분포특성[23,24]에 기인한 것으로 추측된다.

*Clostridium botulinum*의 동정

분리한 *C. botulinum*의 형태적 특징, 배양상의 특성 및 생화학적 특성 등을 표준균주의 특성과 비교하여 분리균주를 동정하였으며 표준 항혈청에 의한 중화시험을 통하여 표준균주를 typing하였다.

순수분리한 *C. botulinum*과 표준균주 *C. botulinum* type E(ATCC 17786)의 생화학적 특성은 Ta-

Table 2. Comparison of some biochemical characteristics of the isolated strain with *Clostridium botulinum* type E, ATCC 17786 strain

Characteristics	Isolated strain	Reference strain ATCC 17786
Size	0.5~0.7×3.4~7.9 μ	
Spore form	Oval, subterminal	
Colony form	Circular, lobate margin, raised, translucent, smooth	
Gram staining	+	+
Motility	+	+, peritrichous
Indole production	−	−
H_2S production	−	−
Lecithinase production	−	−
Lipase production	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+
Starch hydrolysis	+	+w
Esculin hydrolysis	−	−
Nitrate reduction	−	−
Milk agar digestion	−	−
Voges-Proskauer test	−	−
Urease test	−	−
Carbohydrate utilization		
Glucose	+	+
Xylose	−	−
Lactose	−	−
Maltose	+	+w
Sucrose	+	+w
Cellulose	−	−
Arabinose	−	−
Fructose	+	+w
Galactose	+	+w
Mannitol	−	−
Raffinose	−	−
Opalescence, Pearly layer	+	+
Blood hemolysis	+	+
Mouse toxicity test	+++	+++++
Trypsin activation	+	+
Neutralization test	+	+

+; Positive reaction, +w; Weak reaction, −; Negative reaction.

ble 2에서 보는 바와 같이 일치하였다.

특히 Egg york agar상에서의 opalescence, 항혈청에 의한 opalescence의 생성억제, 탄수화물 이용성, Egg york GAM 배지상에서의 pearly layer생성, trypsin에 의한 toxicity 활성화 등 *C. botulinum* type E(ATCC 17786) 균주와 동일한 성상을 나타내어 분리균주는 *C. botulinum* type E로 동정할 수 있었다. 특히 표준균주에 비하여 mouse toxicity가 다소 낮았으나 이는 strain에 따른 차이로 생각되며, type E 항혈청에 의한 mouse 중화시험에서 완벽한 방어효과를 나타내었으며 다른 항혈청에 의한 방어효과는 전무하여 type E로 typing하였다.

Table 3. Comparison of toxicity of *Clostridium butulinum* type E and type A in canned foods

Food stuffs	Isolated type E	Type A
Mackerel Boiled	138 (98-162)	93 (80-110)
Whelk Shell	187(139-240)	164(115-205)
Lo-Hi Tuna	346(137-588)	86 (60-125)
Tuna	366(119-882)	175 (99-294)
Mackerel Pike Boiled(A Co.)	418(133-887)	100 (96-115)
Sardine Boiled	512(123-895)	147 (83-263)
Mackerel Pike Boiled(B Co.)	556(335-956)	140(121-153)
Ham Bean	599(335-918)	270(195-350)
Tropical Fruit Cocktail (Imported)	−	283(179-351)
White Peaches	−	320(309-349)
Green Peas	−	448(223-953)
Yellow Peaches(Imported)	−	456(308-543)
Mandarine Orange	−	589(428-912)
Pineapple Slices(Imported)	−	569(320-895)

*Numbers indicate means of survival times (minutes) of 5 mice injected with 0.5 ml intraperitoneally.
*Dashed lines indicate mice survived for 24 hours.
*Numbers in parentheses indicate time intervals of mouse death.

수 종 식품에서의 toxin 생성능 비교실험

국내에서 현재 가공, 시판되고 있는 식품, 특히 통조림식품(어류, 패류, 과일류)을 비롯하여 ham, sausage식품 수 종을 선정하여 이들 식품에서의 botulinum toxin 생성능을 비교하였다.

수 종 통조림식품을 대상으로 본 실험에서 분리한 *C. botulinum* type E의 toxin 생성능을 실험한 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 일반적으로 어류, 패류통조림에서 toxin 생성이 많았으며 과일통조림에서는 거의 없었다. 어류통조림의 경우에 있어서도 통조림의 종류에 따라 toxin 생성에 현저한 차이가 있어 고등어, 참치, 꽁치, 정어리의 순서로 toxin

Table 4. Comparison of toxicity of *Clostridium botulinum* type E and type A in solid ham-sausage mixture formulated as canned food with distilled water

Food stuffs	Isolated type E	Type A
Ham Lunchen Meat	224(202-289)	70 (62-83)
Salrowman Corned Ham	241(149-434)	214(155-314)
Smoked Ham	256(119-407)	236(105-450)
Corned Ham	292(119-895)	118(105-132)
Bulgogi Ham	699(445-932)	164(139-191)
Juljulivienna Sausage	743(546-946)	213(185-232)
Spam	–	106 (80-130)
Dongglangdang Sausage	–	157 (92-247)
Vienna Sausage	–	170 (90-285)
Ham Sausage	–	469(185-822)
Vegetable Sausage	–	250(204-275)

*Numbers indicate means of survival times (minutes) of 5 mice injected with 0.5 m*l* intraperitoneally.
*Dashed lines indicate mice survived for 24 hours.
*Numbers in parentheses indicate time intervals of mouse death.

생성이 많았으며 특히 같은 어류통조림에서도 제조회사에 따라 toxin 생성에 차이가 있었다. 한편 강력한 toxin을 생성하는 type A의 국내분포 가능성을 고려하여 분리균주 type E와 type A의 toxin 생성능을 비교하였던 바 type A에서도 type E와 유사한 경향을 나타내고 있었다.

또한 ham, sausage 등 포장식품에서의 type E toxin 생성능은 Table 4에서 보는 바와 같이 ham류에서 많은 toxin이 생성되었으며, sausage류에서는 비교적 적은 양의 toxin이 생성되었다. Ham의 경우 육류성분이 함유된 lunchen meat에서는 비교적 많은 양의 toxin이 생성되었으며 sausage 식품에서도 제조회사에 따라 toxin 생성량에 현저한 차이가 있었는데 sausage에 함유되어 있는 육류 함량의 차이에서 비롯하는 것으로 판단된다.

한편 type A는 ham, sausage 식품 전반에서 비교적 많은 양의 toxin을 생성하였는데, type A는 type E에 비하여 강력한 toxin을 생성함에도 원인이 있겠으나, ham, sausage 식품에서도 쉽게 증식할 수 있기 때문으로 추측된다.

일반적으로 *C. botulinum*은 대부분의 육류가공식품에서 증식이 왕성하여 어패류통조림, ham, sausage, 야채 또는 과일식품 등의 식중독을 유발하는 원인균[25,26]으로 알려져 있다. 특히 type A 및 B는 곡류, 야채, 과일 및 그 가공식품에서, type E는 어패류, 육류 및 그 가공식품에서 각각 많은 식중독을 유발하고 있는 것으로 보고되어 있으나[3] 다른 모든 type이 대부분의 통조림 식품에서 쉽게 증식, 식중독을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다.

우리나라의 식품은 세균성 식중독을 우려하여 살균처리, 방부제 첨가 등 미생물 오염방지에 각별한 배려를 하고 있으며 더욱이 각종 저장 방법의 개선, 포장기술의 개발 등으로 식중독 발생 빈도는 크게 저하된 것으로 판단되나 *Staphylococcus*에 의한 식중독 발생 사례가 아직도 소규모 간헐적으로 보고되고 있어 세균성 식중독 가능성은 상존하고 있는 것으로 판단된다.

과거의 연구 결과로부터 *C. botulinum* type C의 국내 분포가 보고된 바 있으며 본 연구에서 보다 독성이 강력한 type E를 분리, 확인함에 따라 우리나라에서도 세균성 식중독에 대한 인식을 새로이 해야할 것으로 생각된다. 더욱이 이같은 *C. botulinum* type C 및 type E의 국내분리는 보다 독성이 강력한 다른 type(type A 및 type B)의 분포 가능성을 시사하고 있어 크게 우려되는 바이다. 또한 최근 대부분의 식품이 인스탄트화 되어짐에 따라 인스탄트 식품의 이용도가 날로 증가하고 있으며, 이에 수반하여 이들 인스탄트 식품의 저장문제, 영양가를 고려한 열처리 제품에 대한 소비자의 기피현상, 소규모 중소기업의 비위생적인 생산공정을 고려할 때 식중독 발생 가능성은 상존하고 있는 것으로 추측된다.

이상의 오염식품 가능성 분류는 실험조건에 따라 상당한 차이가 있는 것으로 추측되며 따라서 본 연구결과는 식품의 botulinum poisoning 가능성을 판단하는데 절대적인 기준이 될 수 없으며 단지 식품의 상대적 위험도를 판단하는데 참고가 될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 1990년도 문교부 학술연구조성비(자유공모과제)에 의하여 수행되었음.

국문요약

토양을 비롯하여 어류, 패류, 조류, 포유류의 소화기관으로부터 *C. botulinum* 분리를 시도하였다. 총 158개 분리원을 screening한 결과 10개 시료로부터 *C. botulinum* 분포 가능성을 확인하였으며 6개 시료로부터 *C. botulinum*을 순수분리하여 3.8% 분리율을 나타내었다.

분리균주의 형태적 특징, 배양상의 특성 및 생화학적 특성 등을 표준균주의 특성과 비교하고 항혈청에 의한 중화시험을 실시하여 분리균주를 동정하였다. Egg york agar에서의 opalescence 생성, 탄수화물 이용성, Egg york GAM 배지상에서의 pearly layer 생성 등으로부터 *C. botulinum*으로 동정할 수 있었으며 trypsin에 의한 toxicity 활성화, type E 항혈청에 의한 opalescence 생성억제 및 mouse 방어효과가 인정되어 type E로 동정하였다.

국내에서 시판되고 있는 수 종의 식품을 대상으로 *C. botulinum*의 toxin 생성능을 비교하였던 바 식품의 종류, 사용균주에 따라 toxin 생성량에 현저한 차이가 있었다. 분리균주 type E의 경우 어패류통조림, ham식품에서 많은 양의 toxin이 생성되었으며 sausage, 과일통조림 식품에서는 비교적 적었다. 그러나 type A의 경우에는 어패류, ham, sausage식품에서 상당량의 toxin이 생성되었으며 과일통조림에서도 비교적 많은 양의 toxin이 생성되었다.

참고문헌

1. Boroff, D.A. and DasGupta, B.R.: A. Botulinum toxin. *In Microbial Toxins* S. Kadis, A. Ciegler, and Samuel J. Ajl. (Eds.). Academic Press Inc., N.Y., Vol. II pp. 1-68 (1971).
2. Sugiyama, H.: *Clostridium botulinum* neurotoxin. *Bateriological reviews,* **44**, 419-448 (1980).
3. Sakagachi, G.: Chapter VIII. Botulism. *In Food-borne Infections and Intoxications,* 2nd. ed. H. Riemann and F.L. Bryan (Eds.). Academic Press Inc., N.Y., pp. 389-442 (1979).
4. 정희영 : 세균성식중독. 대한의학협회지, **26**, 288-293 (1983).
5. U.S. Dept. of Health, Education and Welfare: Food Borne Outbreaks, Annual Summaries (1969~1974). Cent. Dis. Control, Atlanta, Georgia (1975).
6. 민창홍 : 우리나라 식중독의 현황. 대한의학협회지, **26**, 283-287 (1983).
7. 허봉렬 : 식중독. 대한의학협회지, **34**, 703-709 (1991).
8. 이종철 : 식중독. 대한의학협회지, **32**, 834-840 (1989).
9. Smith, L. DS.: Botulism: The organism, its toxins, the disease. *Charles C. Thomas Bannerstone House,* Springfield, III. (1977).
10. Min, B.H. and Choi, Y.K.: Isolation of *Clostridium botulinum* type C from soil. *Bull. Environ. Sciences,* Hanyang University, Vol. 5, 65-69 (1984).
11. Haq, I. and Sakaguchi, G.: Prevalence of *Clostridium botulinum* in fishes from markets in Osaka, Japan. *J. Med. Sci. Biol.,* **33**, 1-6 (1980).
12. Silas, J.C., Carpenter, J.A., Hamdy, M.K. and Harrison, M.A.: Selective and differential medium for detecting *Clostridium botulinum*. *Appl. Environ. Microbiol.,* **50**, 1110-1111 (1985).
13. Schantz, E.J. and Kautter, D.A.: Standardized assay for *Clostridium botulinum* toxins. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists,* **61**, 96-100 (1978).
14. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams & Wilkins, Vol. 2. pp. 1141-1200 (1986).
15. Boroff, D.A. and Fleck, U.: Statistical analysis of a rapid *in vivo* method for the titration of the toxin of *Clostridium botulinum*. *J. Bacteriol.,* **92**, 1580-1581 (1966).
16 Segner, W.P. and Schmidt, C.F.: Nonspecific toxicities in the mouse assay test for botulinum toxin. *Appl. Microbiol.,* **16**, 1105-1120 (1968).
17. Solberg, M., Post, L.S., Furgang, D. and Graham, C.: Bovine serum eliminates rapid nonspecific toxin reactions during bioassay of stored fish for *Clostridium botulinum* toxin. *Appl. Environ. Microbiol.,* **49**, 644-650 (1985).
18. Hobbs, G., Crowther, J.S., Neaves, P., Gibbs, P.A. and Jarvis, B.: Detection and isolation of *Clostridium botulinum*. *In Isolation and Identification Methods for Food Poisoning Organisms.* Corry, J.E.

L., Roberts, D. and Skinner, F.A. (Eds.). Academic Press, London, pp. 151-160 (1982).
19. Mossel, D.A.A. and Dewaart, J.: The enumeration of Clostridia in foods and feeds. *Ann. Inst. Pasteur, Lille*, **19**, 13-20 (1968).
20. Kanzawa, K., Ono, T., Karashimada, T. and Iida, H.: Distribution of *Clostridium botulinum* type E in Hokkaido, Japan. *In Toxic Microorganisms.* M. Herzberg (Ed.), U.S. Dept. Interior, Washington, D.C., pp. 299-303 (1970).
21. Kodama, I.: Epidemiological observation on botulinum in Japan, especially on the present status in the Akita prefecture. *In Toxic microorganisms.* M. Hertzberg (Ed.), U.S. Dept. Interior, Washington, D.C., pp. 309-316 (1970).
22. Page, R.K. and Fletcher, O.J.: An outbreak of type C botulism in three week old broilers-Case Report. *Avian Dis.*, **19**, 192-195 (1974).
23. Carroll, B.J., Garrett, E.S., Reese, G.B. and Ward, B.Q.: Presence of *Clostridium botulinum* in the Gulf of Venezuela and the Gulf of Darien. *Appl. Microbiol.*, **14**, 837-838 (1966).
24. Ward, B.Q., Carroll, B.J., Garrett, E.S. and Reese, G.B.: Survey of the U.S. Gulf coast for the presence of *Clostridium botulinum. Appl. Microbiol.*, **15**, 629-636 (1967).
25. Montville, T.J. and Conway, L.K.: Oxidation-reduction potentials of canned foods and their ability to support *Clostridium botulinum* toxigenesis. *J. Food Sci.*, **47**, 1879-1882 (1982).
26. Potter, N.N.: Food Science, 4th ed. AVI Publ. Co., Inc., Westport, Conneticut, pp. 143-150 (1986).