

EFEKTIVITAS ALKOHOL DAN CAMPURANNYA DENGAN FORMALIN SEBAGAI BAHAN PENGAWET SPESIMEN BINATANG UNTUK UDANG

[The Effectiveness of Alcohol And Its Mixture with Formaldehyde as Animal Specimen

Preservatives Agents for Shrimp]

Nandang Suharna dan Rita Dwi Rahayu

Balitbang Mikrobiologi, Puslitbang Biologi-LIPI

ABSTRACT

This study was aimed at studying the effectiveness of alcohol, formaldehyde and their mixture in inhibiting fungal growth. This study contained two step. The first step was fungal isolation from specimen. One isolate was then selected to be inoculated into alcohol at various concentration (15%, 30%, 50% and 70%) with or without formaldehyde mixture. The second was fungal inoculation into alcohol at various concentration (15%, 30%, 50%, dan 70%) with or without formaldehyde. The effectiveness of these substances as specimen preservatives for shrimp were studied after six months incubation time.

*From the first step, only genus group *Monascus* was isolated from seven specimens (*Mabuia multifasciata*, *Myotis muricola*, *Chironax melanocephalus*, *Naya naya sputratrix*, *Miniopterus schreibersi blepotis*, *unidentified shrimp*, *unidentified Coelenterata*). From the second step, the best growth of isolate *Monascus* sp. MM which isolated from the first step was achieved in 70% alcohol. This fungus was not able to grow in both formaldehyde and its mixture with alcohol (1:1, 1:2, 1:3 and 1:4). The results also showed that *Monascus* growth was observed in alcohol with not sterilized shrimps without inoculation with *Monascus* sp. MM. It is recommended to apply mixture alcohol 70% with formaldehyde 1% at ratio 4:1 as animal specimen preservative to inhibit fungal growth.*

Kata kunci/keywords: Efektifitas/Effectivity, Alkohol/Alcohol, Formalin/Formaldehyde, Bahan pengawet/ Preservative agent, Spesimen binatang/Animal specimen, *Monascus* spp.

PENDAHULUAN

Penyimpanan spesimen binatang dengan cara pengawetan basah dalam larutan alkohol ditemukan adanya pengrusakan spesimen tersebut akibat adanya pertumbuhan jamur. Pertumbuhan ini terlihat merusak alkohol yang mengakibatkan spesimen yang dipelihara mengalami kerusakan yang serius.

Beberapa spesimen yang telah mengalami kerusakan serius akibat pertumbuhan jamur, terpaksa dibuang karena tidak memenuhi syarat lagi sebagai spesimen yang baik untuk dipertahankan. Walaupun jumlah kasus ini tergolong sangat sedikit dibandingkan dengan jumlah spesimen yang ada, namun demikian, bila kasus ini menimpa spesimen yang penting untuk dilestarikan sangat disayangkan, dan hal ini sebaiknya tidak boleh terjadi.

Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui jamur yang tumbuh pada beberapa

spesimen binatang yang diawetkan dalam alkohol dan efektivitas penggunaan alkohol, formahn dan campurannya terhadap pertumbuhan jamur tersebut.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Isolasi jamur dari spesimen binatang

Spesimen. Tujuh spesimen binatang yaitu codot kepala hitam (*Chironax melanocephalus*), Coelenterata (tidak teridentifikasi), kadal (*Mabuia multifasciata*), tomosu biasa (*Miniopterus schreibersi blepotis*), lasiwen biasa (*Myotis muricola*), ular sinduk (*Naya naya sputratrix*), dan udang (tidak teridentifikasi) diperoleh dari Balitbang Zoologi, Puslitbang BioLog-LIPI, Bogor.

Media. Media isolasi adalah agar sukrosa ekstrak taoge yang pembuatannya mengikuti Ko (1974). Jamur uji berupa isolat yang digunakan dari hasil isolasi jamur di atas. Udang segar diperoleh dari sebuah pasar di Bogor.

CARAKERJA

Isolasi jamur dari spesimen binatang

Isolasi jamur dilakukan dengan cara mencuplik secara langsung dari miselium yang sedang tumbuh, kemudian diinokulasikan pada media agar lempehg dan diinkubasikan pada suhu ruang selama beberapa hari. Koloni jamur yang tumbuh kemudian diisolasi dan dipelihara pada media agar miring. Untuk keperluan identifikasi jamur dibuat sediaan slide dengan menggunakan laktofenol sebagai media sediaan dan biru anilin sebagai pewarna.

Efektivitas penggunaan alkohol, formalin dan campurannya terhadap pertumbuhan jamur.

Inokulum. Inokulum dibuat dengan cara sebagai berikut: jamur uji ditumbuhkan pada media agar miring taoge ekstrak sukrosa 6% (Ko, 1974) dan diinkubasikan selama dua minggu pada suhu kamar. Lembar koloni dipisahkan dari media agar dan dipindahkan ke dalam tabung 100 ml yang telah berisikan air suling steril 30 ml. Setelah dibuat homogen dengan menggunakan mikser dan diberi tambahan air suling steril sehingga tercapai volume 100 ml, densitas suspensi ditentukan dengan menggunakan haemasitometer. Dari hasil penghitungan diperoleh densitas satu ml suspensi adalah $10,7 \times 10^6$ propagula ml.

Uji efektivitas alkohol, formalin dan campuran keduanya

Pada penelitian ini digunakan enam faktor, yaitu udang tidak steril dan tanpa inokulasi, udang steril dan tanpa inokulasi, udang steril dan dengan inokulasi, alkohol dengan beberapa tingkatan konsentrasi (15%, 30%, 50% dan 70%), formalin dengan beberapa tingkatan konsentrasi (1%, 2%, 3%, dan 4%) dan campuran alkohol 70% dengan formalin 1% (1:1, 1:2, 1:3, dan 1:4). Tiap-tiap perlakuan dengan empat ekor udang dan larutan 200 ml ditempatkan dalam botol jeli yang ditutup dengan kapas. Inokulasi jamur dikerjakan dengan cara menambahkan satu ml suspensi. Semua perlakuan

dengan lima ulangan diinkubasikan pada suhu ruang selama enam bulan.

Penaksiran pada pertumbuhan jamur diklasifikasikan secara visual sebagai: 0 = tidak ada pertumbuhan yang terlihat, tidak ada perubahan warna media, 1 = miskin, pertumbuhan terlihat dan terbatas, media berubah warna, 2 = sedang, pertumbuhan banyak terlihat, pertumbuhan tidak menutupi udang dan permukaan media, media berubah warna, 3 = melimpah, penumbuhan banyak sekali terlihat, pertumbuhan menutupi udang dan permukaan media, media berubah warna.

Isolasi kembali yang dikerjakan untuk mengetahui keberadaan jamur dilakukan dengan cara menginokulasikan beberapa tetes dari larutan (media) perlakuan dengan menggunakan pipet steril pada media agar cawan Petri. Cawan ini kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama beberapa hari. Jamur yang tumbuh diisolasi dan diidentifikasi sampai tingkat genus.

Untuk menunjang hasil penelitian ini, kekerasan udang diukur dengan menggunakan alat penetrasi. Namun, hasil pengukuran ini kemudian ditentukan sebagai normal atau rapuh.

Pengamatan secara visual juga dilakukan untuk mengetahui perubahan warna larutan (media) dan udang, kekeruhan larutan (media), pertumbuhan jamur pada larutan dan udang pada seluruh perlakuan.

HASIL

Isolasi jamur dari spesimen binatang

Semua spesimen yang diawetkan dengan alkohol 70% atau 95% berada dalam keadaan diseliputi jamur. Penampakan masa yang seperti kapas begitu menonjol dan mudah dipisahkan dari spesimen. Dari hasil pengamatan mikroskopis in vivo dapat ditunjukkan bahwa massa tersebut mempunyai banyak sekali klistotesium yang berisi askospora dalam jumlah yang banyak. Jamur ini kemudian diidentifikasi sebagai *Monascus* berdasarkan ciri karakteristiknya menurut Hawksworth and Pitt (1983). Genus ini merupakan kelompok genus satu-satunya yang teramati dan terisolasi (Tabel 1).

Satu isolat bernomor koleksi MM yang diisolasi dari spesimen *Mctbuia multifasciatus* digunakan dalam penelitian ini. Deskripsi dari isolat ini sebagai berikut: pada media Agar Ekstrak Malt 2%, suhu 25°C selama 7 hari, koloni mencapai diameter 30-34 mm, berbentuk bulat (*circular*), miselium udara hampir tidak ada, pada awalnya bening pada bagian atas dan bawah, berubah merah terang; pigmen solubel diproduksi, tidak ada enkrustasi (*encrustation*); hifa berdiameter mencapai 4 m, memiliki septum, bercabang tak teratur, berdinding halus. Klistotesium berdiameter 46-80 x 40-80 mm, dinding bening, bentuk bvdindar; aleurikonidium berkuran 6-14 x 6-14 m, berbentuk seperti bola lampu (*obpyriform*), bundar, dan agak bundar, berantai, dinding bening; askospora berukuran 5-6 x 3-5 m, dinding bening dan tipis, berbentuk elipsoid, aseptat, halus.

Efektivitas penggunaan alkohol, formalin dan campurannya terhadap pertumbuhan jamur

Pada Tabel 2 terlihat bahwa pada semua tingkatan konsentrasi alkohol 15%, 30%, 50% dan 70%, *Monascus* sp. mampu tumbuh. Pertumbuhan terbaik dicapai pada konsentrasi alkohol 70%. Pertumbuhan jamur juga dijumpai pada perlakuan alkohol dengan udang yang tidak steril dan tanpa inokulasi. Sedangkan pada formalin dan campurannya dengan alkohol, pertumbuhan jamur tidak dijumpai.

Tabel 3 memperlihatkan bahwa perlakuan dengan formalin dan campurannya dengan alkohol mengakibatkan udang menjadi rapuh, mudah hancur. Berbeda dengan formalin, perlakuan alkohol dapat menjaga kekerasan udang (tidak rapuh).

Pada Tabel 4 terlihat bahwa pada perlakuan alkohol larutannya berubah menjadi keruh dan berubah warna begitu pula dengan udangnya. Sedangkan perlakuan campuran alkohol 70% dan formalin 1% pada semua tingkatan perbandingan, perubahan warna hanya terjadi pada udangnya, namun larutannya tidak keruh. Perlakuan formalin

pada semua tingkatan konsentrasi tidak mengubah warna udang dan larutan tidak keruh.

PEMBAHASAN

Isolasi jamur dari spesimen binatang

Yang menarik dari hasil yang diperoleh antara lain adalah hanya *Monascus* saja yang ditemukan pada spesimen. Pengamatan secara in vivo menunjukkan bahwa jamur tersebut tumbuh dan mengakibatkan kerusakan alkohol. Ini ditandai dengan bau busuk pada larutan tersebut. Akibat dari rusaknya alkohol ini tentu saja menjadikan tungsi dari larutan tersebut sebagai bahan pengawet menjadi hilang, yang pada akhirnya dapat menyebabkan rusaknya spesimen. Kemungkinan asal jamur *Monascus* dapat diketahui pada langkah kerja kedua. *Monascus* sejauh ini belum ada yang ditemukan pada spesimen binatang yang diawetkan di dalam larutan alkohol 70%.

Isolat *Monascus* sp. MM yang digunakan dalam penelitian ini bila mengikuti kunci identifikasi sampai jenis dari Cannon *et al.* (1995) maka akan sampai ke jenis *M. sanguineus*. Namun bila melihat pertumbuhan pada media AEM 2%, suhu 25°C, selama 7 hari, *M. sanguineus* memiliki diameter koloni lebih kecil (8-10 m), warna kebalikan coklat tua, askomata (klistotesium) berdiameter lebih kecil (32-70 m) dengan warna dinding coklat pucat, warna dinding aleurikonidium bening sampai coklat sangat pucat. Hawksworth and Pitt (1983) dalam kunci identifikasi jenis *Monascus* mengikut sertakan warna dinding klistotesium dan aleurikonidium, selain pertumbuhan koloni pada AEM 2%, suhu 25°C, selama 7 hari. Berdasarkan kunci ini, penentuan jenis dari isolat MM tidak tercapai. Oleh karena itu isolat *Monascus* sp. MM mungkin merupakan jenis baru sehingga diperlukan studi taksonomi lebih lanjut.

Efektivitas penggunaan alkohol, formalin dan campurannya terhadap pertumbuhan jamur

Adanya pertumbuhan *Monascus* pada konsentrasi alkohol 15%, 30%, 50%, dan 70% membuktikan bahwa jamur ini memang dapat

tumbuh pada alkohol, bahkan pertumbuhan terbaik dicapai pada perlakuan konsentrasi alkohol 70%. Pertumbuhan *Monascus* spp. yang juga teramati pada perlakuan alkohol dengan udang yang tidak disterilisasi membuktikan bahwa keberadaan jamur ini bisa berasal dari udang itu sendiri atau melalui udara atau mungkin saja dari alkoholnya yang sudah tercemar jamur ini. Oleh karena itu dari hasil yang diperoleh ini menunjukkan bahwa spesimen-spesimen binatang yang diawetkan dalam alkohol bila terkontaminasi jamur *Monascus*, maka kejadian serupa seperti terjadinya pertumbuhan jamur ini pada spesimen-spesimen binatang yang diawetkan dalam alkohol yang digunakan sebagai bahan penelitian ini dapat terulang kembali. Tentunya kejadian ini tidak diinginkan mengingat kerusakan alkohol yang diakibatkan oleh adanya pertumbuhan jamur ini lambat laun dapat merusak keutuhan spesimen-spesimen tersebut.

Kemampuan *Monascus* hidup dalam larutan alkohol berkonsentrasi tinggi memang menarik untuk disehdiki. Menurut Domsch *et al.* (1980) *M. ruber* dapat menggunakan etanol sebagai sumber karbon dan sumber energi. Fenomena yang ekstrim dari kemampuan *Monascus* hidup pada alkohol 70% tidak diteliti pada penelitian ini. Menurut Jones (1989) dalam ulasannya menyatakan bahwa efek biologis dari etanol adalah kompleks. Ada tiga mekanisme yang melibatkan pengaturan pada toleransi terhadap etanol, yaitu efek non spesifik yang mengurangi aktivitas air, efek spesifik terhadap membran sel, dan efek spesifik dari asetaldehida yang bisa melibatkan deaktivasi respirasi sel. Sedangkan ketidak adaan pertumbuhan *Monascus* spp. pada semua perlakuan formalin maupun campurannya dengan alkohol 70% nampaknya akibat dari efek fungisidal dari formalin. Menurut Morgan-Jones (1981) formalin telah diketahui sebagai bahan yang memiliki sifat bakteriosidal, sporosidal, dan fungisidal. Cara kerja dari efek tersebut adalah dengan pengikatannya dengan grup amino. Walaupun bersifat toksik terhadap hewan maupun manusia, namun bahan kimia ini murah dalam penggunaannya.

Menurut Cannon *et al.* (1995) jenis-jenis *Monascus* yang dikenal ada enam jenis yaitu terdiri dari *M. floridanus*, *M. pallens*, *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. ruber* dan *M. sanguineus*. Sampai sekarang ini menurut Cannon *et al.* (1995) jenis *Monascus* lebih dikenal dengan habitatnya yang osmofilik dan seringkali diisolasi dari bahan pangan atau substrat-substrat lain dengan aktivitas air yang rendah. Beberapa jenis, terutama *M. pilosus* dan *M. purpureus* digunakan dalam produksi makanan fermentasi di Asia Timur. Namun demikian ditemukannya isolat-isolat yang mampu tumbuh dalam alkohol merupakan informasi yang baru mengenai keberadaan *Monascus*.

KESIMPULAN DAN SARAN

Monascus adalah satu-satunya kelompok genus jamur yang ditemui pada spesimen binatang yang diawetkan dalam alkohol yang mengalami serangan jamur. Keberadaan *Monascus* dapat berasal dari spesimennya sendiri, walaupun tidak tertutup kemungkinan berasal dari udara.

Penggunaan alkohol sebagai bahan pengawet spesimen binatang ternyata tidak efektif terhadap pertumbuhan jamur *Monascus* karena jamur uji yaitu isolat *Monascus* sp. MM dapat tumbuh dengan baik dalam alkohol walaupun pada konsentrasi yang tinggi (70%). Oleh karena itu disarankan bahwa dalam pengawetan spesimen binatang sebaiknya digunakan campuran alkohol 70% dengan formalin 1% pada rasio 4:1. Campuran ini efektif mencegah pertumbuhan jamur *Monascus*. Cara lain adalah penggantian alkoholnya secara periodik. Namun cara yang terakhir ini nampaknya tidak efisien dan ekonomis.

UCAPAN TERBMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dra. Helen Kurniati dan Endang, Bahtbang Zoologi, Puslitbang Biologi-LIPI, Bogor, yang telah berbaik hati mengirimkan sampel spesimen yang digunakan dalam penelitian ini.

Tabel 1. Tujuh Spesimen Binatang Yang Diawetkan dalam Alkohol Yang Ditumbuhi Jamur.

No.	Spesimen Binatang	Janiur yang Diisolasi	Kondisi Spesimen
1.	Kadal (<i>Mabuia multifasciata</i>)	<i>Monascus</i> sp. 1	Diselimuti massa jamur
2.	Lasiwen biasa (<i>Myotis muncola</i>)	<i>Monascus</i> sp. 2	Diselimuti massa jamur
3.	Codot kepala hitam (<i>Chironax melanocephalus</i>)	<i>Monascus</i> sp. 3	Diselimuti massa jamur
4.	Ular sinduk (<i>Naya naya sputatrix</i>)	<i>Monascus</i> sp. 4	Diselimuti massa jamur
5.	Tomосу biasa (<i>Mimopterus schreibersi blepotis</i>)	<i>Monascus</i> sp. 5	Diselimuti massa jamur
6.	Tidak Teridentifikasi (Udang)	<i>Monascus</i> sp. 6	Diselimuti massa jamur
7.	Tidak Teridentifikasi (Coelenterata)	<i>Monascus</i> sp. 7	Diselimuti massa jamur

Tabel 2. Keberadaan Pertumbuhan *Monascus* Setelah Periode Inkubasi Enam Bulan.

Perlakuan	Alkohol				Formalin				Alkohol 70% : Formalin 1%			
	Konsentrasi (%)				Konsentrasi (%)							
	15	30	50	70	1	2	3	4	1:1	2:1	3:1	4:1
Kontrol A (Udang Tidak Disterilisasi, Tanpa Inokulasi)	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol B (Udang Disterilisasi, Tanpa Inokulasi)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C (Udang Disterilisasi, Diinokulasi)	2	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0

Keterangan: 0 = tidak ada pertumbuhan yang terlihat, tidak ada perubahan warna media, 1 = miskin, pertumbuhan terlihat dan terbatas, media berubah warna, 2 = sedang, pertumbuhan banyak terlihat, pertumbuhan tidak menutupi udang dan permukaan media, media berubah warna, 3 = melimpah, pertumbuhan banyak sekali terlihat, pertumbuhan menutupi udang dan permukaan media, media berubah warna.

Tabel 3. Kekerasan Udang Setelah Periode Inkubasi Enam Bulan.

Kelompok Perlakuan	Alkohol				Formalin				Alkohol 70% : Formalin 1%			
	Konsentrasi (%)				Konsentrasi (%)							
	15	30	50	70	1	2	3	4	1:1	2:1	3:1	4:1
Kontrol A (Udang Tidak Disterilisasi, Tanpa Inokulasi)	N	N	N	N	R	R	R	R	R	R	R	R
Kontrol B (Udang Disterilisasi, Tanpa Inokulasi)	N	N	N	N	R	R	R	R	R	R	R	R
C (Udang Disterilisasi, Diinokulasi)	N	N	N	N	R	R	R	R	R	R	R	R

Keterangan : N = Normal, R= Rapuh

Tabel 4. Perubahan Wama Pada Udang dan Larutan dan Kekenihannya Setelah Periode Inkubasi Enam Bulan.

<i>Perldkuun</i>	Wama ¹ Larutan		Warna ¹ Udang		<i>Kekeruhan</i>	
	Nama	Kode	Nama	Kode		
KONTROLA(UDANGTIDAK DISTERILISASI, TANPA INOKULASI)						
Alkohol (Alk)	15%	Putih Kekuningan	2-2a	Putih Kekuningan	2-2a	Keruh
	30%	Putih Kekuningan	2-2a	Putih Kekuningan	2-2a	Agak Keruh
	50%	Putih Kekuningan	2-2a	Putih Kekuningan	2-2a	Agak Keruh
	70%	Kuning Terang	4-4a	Putih Kekuningan	2-2a	Agak Keruh
Formalin (Form)	1%	Putih Susu	1-2a	Warna asli	-	Bening
	2%	Putih Susu	1-2a	Wamaasli	-	Bening
	3%	Putih Susu	1-2a	Warna asli	-	Bening
	4%	Putih Susu	1-2a	Wamaasli	-	Bening
Alk (70%): Form (1 %)	1 : 1	Bening	-	Oranye Pucat	5-3a	Bening
	2 : 1	Bening	-	Oranye Pucat	5-3a	Bening
	3 : 1	Bening	-	Oranye Pucat	5-3a	Bening
	4 : 1	Bening	-	Oranye Pucat	5-3a	Bening
KONTROLB (UDANG DISTERILISASI, TANPA INOKULASI)						
Alkohol (Alk)	15%	Coklat Terang	6-8d	Coklat terang	6-8d	Sangat Keruh
	30%	Krim Kuning Pucat	4-3a	Kuning pucat cream	4-3a	Agak Keruh
	50%	Kuning Terang	4-4a	Kuning terang	4-4a	Agak Keruh
	70%	Kuning Kecoklatan	5-7c	Kuning kecoklatan	5-7c	Sangat Keruh
Formalin (Form)	1%	Putih Kekuningan	2-2a	Putih kekuningan	2-2a	Bening
	2%	Putih Kekuningan	2-2a	Putih kekuningan	2-2a	Bening
	3%	Putih Kekuningan	2-2a	Putih kekuningan	2-2a	Bening
	4%	Putih Kekuningan	2-2a	Putih kekuningan	2-2a	Bening
Alk (70%): Form (1%)	1 : 1	Bening	-	Oranye pucat	5-3a	Bening
	2 : 1	Bening	-	Oranye pucat	5-3a	Bening
	3 : 1	Kuning pucat	3-3a	Oranye pucat	5-3a	Bening
	4 : 1	Kuning pucat	3-3a	Oranye pucat	5-3a	Bening
C (UDANG DISTERILISASI, DIINOKULASI)						
Alkohol (Alk)	15%	Oranye keabu-abuan	5-5b	Oranye keabu-abuan	5-5b	Sangat Keruh
	30%	Kuning pucat	3-3a	Kuning pucat	3-3a	Keruh
	50%	Putih kekuningan	3-2a	Putih kekuningan	2-2a	Agak Keruh
	70%	Putih kekuningan	3-2a	Putih kekuningan	2-2a	Keruh
Formalin (Form)	1%	Putih susu	1-2a	Wamaasli	-	Bening
	2%	Putih susu	1-2a	Warna ash'	-	Bening
	3%	Putih susu	1-2a	Wamaasli	-	Bening
	4%	Putih susu	1-2a	Wamaasli	-	Bening
Alk (70%): Form (1 %)	1 : 1	Bening	-	Oranye pucat	5-3a	Bening
	2 : 1	Bening	-	Oranye pucat	5-3a	Bening
	3 : 1	Bening	-	Oranye pucat	5-3a	Bening
	4 : 1	Bening	-	Oranye pucat	5-3a	Bening

" Mengacu Komerup (1972)

PUSTAKA

- Cannon PF, SK Abdullah dan BA Abbas. 1995.** Two new species of *Monascus* from Iraq, with a key to known species of the genus *Wycoco*. *Res.* **99**, 659 - 662.
- Domsch KH, W Gams and TH Anderson. 1980.** *Compendium of Soil Fungi*, 425-426. Academic, London.
- Hawksworth DL dan JI Pitt 1983.** A New Taxonomy for *Monascus* Species Based on Cultural and Microscopical Characters. *Aust.J.Bot.* **31**, 51-61.
- Jones, RP. 1989.** Biological Principles For the Effects of Ethanol. *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 130-153.
- Ko SJ. (1974).** Self Protection of Fermented Food Against Aflatoxin. *Proceedings of The IV International Congress of Food and Technology V m*, 244-253.
- Morgan-Jones, SC. 1981.** Cleansing and Disinfection of Farm Buildings. In: *Disinfectants, Their Use and Evaluation of Effectiveness*, 199-212. CH Collins, MC Allwood SF Bloomfield and A Fox (Eds). Academic. London..
- Samson RA, ES Hoekstra and CAN Oorschot. 1981.** *Introduction to Food-Borne Fungi*, 38-39. Centralbureau Voor Schimmelcultures, Baarn.