

CATEDRA DE INDUSTRIAS DE LA LECHE, CARNE Y PESCADO

Profesor Encargado de Curso: Dr. F. REJAS GARCIA

**Contribución al estudio de las alteraciones del bacalao: empolvado, etiología y métodos de lucha**

*Por F. Rejas García*

Con motivo de nuestros frecuentes contactos con algunas de las más importantes factorías bacaladeras españolas, hemos podido comprobar la importancia higiénica y económica que para las mismas supone las alteraciones del bacalao. Esta circunstancia ha sido la que en un principio nos movió a buscar en las fuentes bibliográficas las posibles soluciones al problema, y posteriormente lo sugestivo del tema y las posibilidades del mismo para nuevos estudios nos llevó a iniciar una investigación sobre la etiología de estas alteraciones y sobre nuevos métodos de lucha profiláctica contra las mismas.

En esta publicación nos centraremos sobre una de las alteraciones más frecuentes del bacalao, el "empolvamiento" o "empolvado", dejando para futuros trabajos el estudio del resto de las alteraciones.

**ETIOLOGIA**

El empolvado, hablando en términos generales, es una alteración de la superficie del bacalao, de carácter seco, pulverulento, y con tendencia a manifestarse en zonas separadas. De etiología microbiana

variable, en dependencia siempre con el tenor en sal y humedad del substrato, factores limitantes del desarrollo de diversas especies halófilas o haloterantes.

Con estos antecedentes es de esperar, pues, que la flora responsable de esta alteración pueda ser extremadamente amplia. Por algunos investigadores han sido encontrados, diversas especies de hongos, penicillium, aspergillus, mucor, monilia, levaduras, y gérmenes.<sup>10-13</sup> Nosotros mismos, en el curso de nuestros trabajos, hemos encontrado algunas especies de penicillium y aspergillus, especialmente.

Ahora bien, ¿el crecimiento de estos microorganismos sobre el bacalao produce siempre la alteración macroscópica que conocemos con el nombre de empolvado?

Indudablemente, no. Aunque en numerosas ocasiones sí que puede producirla.

Sin embargo, cuando el empolvado se manifiesta con una coloración castaño-oscura, siempre se ha aislado del mismo un moho, el *Sporendonema epizoum*, aparte de otra serie de microorganismos, generalmente mohos, más o menos variables. Esto hace suponer que, el microorganismo responsable del empolvado oscuro, el "dun" de los anglólosajones, es producido por el *Sporendonema*, con o sin la colaboración de otros microorganismos.

Como por otra parte el empolvado oscuro es el más frecuente de los empolvados, ha hecho que en la práctica se considere al *Sporendonema* como el único agente responsable de la alteración.

Nosotros, en nuestro trabajo, hemos seguido este criterio, centrándola la investigación en el aislamiento, estudio micológico y métodos de lucha contra el desarrollo del *Sporendonema epizoum*.

#### SPORENDONEMA EPIZOUM, ESTUDIO MICOLOGICO

El *Sporendonema epizoum*, (Corda), Ciferri y Redaelli, de extensa sinonimia, *Torula epizoa*, *T. ochracea*, *T. sachari*, *T. rufescens*, *T. rubiginosa*, *T. saccharina*, *T. fuligines*, *T. pulchra*, *Oospora rufescens*, *Catellunaria fuligines*, *Hemispora stellata*, *Scopularopsis simplex*, etc., es un hongo ampliamente distribuido en la naturaleza que presenta características culturales y morfológicas plenamente específicas, lo que hace que su identificación se realice con facilidad.

De nuestro estudio sobre varias cepas de *Sporendonema epizoum*, podemos destacar las siguientes características como las más idóneas para su clasificación.

Carácteres culturales:

Medio Sabouraud glucosado: buen crecimiento.

Medio de Sabouraud maltosado: buen crecimiento.

Medio patata glucosa: buen crecimiento.

Temperatura óptima: alrededor de 25°.

Halotolerancia: Crecen bien con niveles de cloruro sódico del 5 al 10 por 100. Un 20 por 100 retrasa el crecimiento y la pigmentación.

Carácteres morfológicos macroscópicos:

Sobre Sabouraud glucosado con 10 por 100 de sal, y una incubación de siete días a 25°, presenta colonias levantadas, de color castaño oscuro, aspecto pulverulento y seco, y de un diámetro entre 1-3 mm.

Carácteres morfológicos microscópicos:

Micelio formado por hifas, diámetro 2,5 - 3,5 micras, ligadas a un punto central de germinación, incoloras, terminando en filamentos fértiles por conidios pseudoendogénicos. La liberación de esporas se realiza por talosporos o artrosporos, de forma cuadrangular o ligeramente alargados, adquiriendo forma globosa o subglobosa al desprenderse.

Las esporas, diámetro 2,5 - 3,5 micras, están provistas de pequeños tubérculos o espinas pigmentadas de color oscuro, siendo responsables del color de la colonia.

#### TECNICAS DE AISLAMIENTO

El aislamiento del *Sporendonema* no ofrece grandes dificultades, ya que como hemos visto anteriormente puede ser perfectamente cultivado en medios con diversas concentraciones de cloruro sódico, desde 0 al 10 por 100.

Sin embargo, donde sí pueden existir dificultades es en el aislamiento a partir de sustratos contaminados por otros microorganismos, generalmente hongos, como ocurre en los salazones de pescado, bodegas de barcos, locales de desecación, etc. Estos hongos de más rápido crecimiento pueden enmascarar y a veces anular el desarrollo del *Sporendonema*.

Nuestra experiencia sobre este punto (Tabla I), nos permite afirmar que sobre bacalao seco y salado, es fácil el aislamiento si trabajamos con medios con 10 por 100 de sal, que inhibe gran cantidad de mohos, o con 20 por 100, que elimina en la práctica la totalidad de los mismos, creciendo en cultivo puro el *Sporendonema*.

TABLA I

AISLAMIENTO DEL *SPORENDONEMA EPIZOUM*

(Incubación a 25°, siete días)

Medios de cultivo	Crecimiento de diversas especies de hongos	Crecimiento <i>S. epizoum</i>	Pigmentación <i>S. epizoum</i>
Sabouraud glucosado .....	+++	++	+++
Id. Id. con 5 % Cl Na ...	++	+++	+++
Id. Id. con 10 % Cl Na ...	+	++	+++
Id. Id. con 20 % Cl Na ...	—	++	—
Sabouraud maltosado .....	+++	++	+++
Id. Id. con 5 % Cl Na ...	++	+++	+++
Id. Id. con 10 % Cl Na ...	+	++	+++
Id. Id. con 20 % Cl Na ...	—	++	+-
Patata glucosa .....	+++	++	+++
Id. Id. con 5 % Cl Na ...	++	+++	+++
Id. Id. con 10 % Cl Na ...	+	++	+++
Id. Id. con 20 % Cl Na ...	—	++	++

+++ = Fuertemente positivo

++ = Positivo fuerte

+= Positivo

— = Negativo

En los secaderos de bacalao es fácil la comprobación de la presencia del *Sporendonema* y por lo tanto las posibilidades de contaminación de aquél. Una técnica sencilla que permite controlar la higiene de toda la instalación consiste en comprobar el grado de contaminación de la atmósfera de los locales,<sup>5</sup> exponiendo placas con cualquiera de los medios habituales durante lapsos de tiempo prolongados: 24 - 48 horas.

METODOS DE LUCHA CONTRA EL EMPOLVADO

La lucha contra el empolvado en la industria se desarrolla normalmente por un método mixto, higiene y desinfección de las instalaciones pesqueras e industriales, al objeto de evitar la contaminación de los productos, y tratamiento de éstos por un antimicrobiano, el hiposulfito sódico, para conseguir, si no la destrucción de los hongos responsables, evitar, al menos, su desarrollo.

Este método tiene la ventaja de que es común en la lucha contra todas las alteraciones del bacalao, pero presenta el grave inconveniente de sus frecuentes fallos, al no ser plenamente específico.

Para eliminar estos fracasos se ha intentado en algunas ocasiones la aplicación de algún antifungico específico sobre los propios productos.

Sería ideal para la industria el conseguir algún antifungico atóxico, que consiguiera, mediante el tratamiento directo de los productos, una total destrucción o, al menos, inhibición del desarrollo del *Sporendonema*. Sería ideal, a pesar de los inconvenientes que este procedimiento puede acarrear, presencia del antifungico en el pescado y despreocupación en las medidas higiénicas de las instalaciones ante la seguridad de la eficacia del procedimiento.

Pensando nosotros en las amplias posibilidades que para la industria pudiera tener esta técnica, decidimos comenzar algunos ensayos encaminados a comprobar la eficacia que sobre la inhibición del desarrollo del *Sporendonema* poseen diversos compuestos antimicrobianos, con miras a su posible utilización en la conservación del pescado salado.

Como el problema de la desinfección de locales y utillaje está perfectamente resuelto mediante el adecuado empleo de pinturas fungicidas y productos desinfectantes, centramos nuestra atención en aquellos compuestos antimicrobianos de carácter atóxico, condición indispensable para su utilización directa sobre alimentos.

Los productos que reúnen estas características, según la bibliografía, son el ácido súrbico, los compuestos de amonio cuaternario, el ácido benzoico y derivados, y diversos antibióticos fungicidas.

El ácido súrbico, a partir de su aparición en 1945, ha sido utilizado ampliamente en la industria de la alimentación por sus propiedades fungicidas. Propiedades fungicidas que parecen ser debidas a su naturaleza de ácido graso insaturado. Estos ácidos aparecen normalmente como metabolitos transitorios en el metabolismo natural de los ácidos grasos por los hongos. A consecuencia de una concentración alta de este tipo de ácidos grasos, motivada por la adición de ácido súrbico, el sistema oxidativo de los hongos se inhibe y, por consiguiente, quedan privados de las fuentes de energía y, en definitiva, inhibido el desarrollo. El ácido súrbico funciona bien a pH 6-7, incrementando su acción a pH más bajo.<sup>13</sup> Debido a su naturaleza química, es un producto prácticamente atóxico<sup>2</sup>, siendo permitida su utilización como conservador de alimentos en diversas legislaciones sanitarias, hasta concentraciones de 1000 ppm<sup>6-7</sup>.

Ha sido utilizado por diversos investigadores en la lucha contra el *Sporendonema epizoum* con excelentes resultados, bien incorporándolo en la sal en concentraciones del 0,05-0,4 por 100, o por pulverización con soluciones al 10 por ciento.<sup>3-8</sup>

Los compuestos de amonio cuaternario, de uso cada día más frecuente en la desinfección de las industrias alimenticias, reúnen la doble propiedad de ser fuertemente fungicidas y fungistáticos<sup>11</sup> y prácticamente atóxicos,<sup>12</sup> que los hacen aparecer como antimicrobianos ideales para su utilización en las industrias alimenticias. Su empleo en la desinfección de estas industrias es legal en numerosas legislaciones sanitarias,<sup>1</sup> y en España, y por la Dirección General de Sanidad (1958), ha sido aprobada su incorporación al hielo destinado a la conservación del pescado y otros productos alimenticios.

El ácido benzoico, sus sales y esteres, han sido desde largo tiempo utilizados en la conservación de alimentos, debido a su amplio espectro antimicrobiano y al gran margen que existe entre la dosis tóxica y la conservadora.<sup>2-4</sup> Es legal su empleo en diversas legislaciones sanitarias.<sup>6-7</sup> Sobre su poder antimicrobiano tiene gran influencia el pH del substrato, siendo más intenso a pH ácido. En los ésteres la influencia del pH es sensiblemente menor.<sup>14</sup> Se ha utilizado en la protección del pescado contra el "dun", con resultados poco convincentes.<sup>3</sup>

Los antibióticos fungicidas de amplio espectro y escasa toxicidad han sido empleados en ocasiones en ensayos de protección de alimentos. Las investigaciones de KLIS y colaboradores<sup>9</sup> no dejan lugar a dudas del papel que alguno de estos antibióticos pueden jugar en la conservación de los alimentos. Parece ser que atendiendo a su actividad pueden ser clasificados por el siguiente orden: miproxina, rimocidina, nistatina, fungizona, actidiona y griseofulvina.

#### Ensayos experimentales:

Los ensayos se realizaron en dos fases. Una primera sobre medios de cultivo, al objeto de standarizar plenamente la prueba y escoger con objetividad los antimicrobianos más idóneos, y una segunda, en la cual aplicamos sobre pescados los antimicrobianos seleccionados en la primera.

#### Ensayos sobre medios de cultivo:

Las pruebas sobre medios de cultivo se realizaron con arreglo al siguiente protocolo:

1) Medio de cultivo: Sabouraud glucosado con 10 por ciento de cloruro sódico, en slants sobre tubos de 30 por 200, con 25 cc. de medio por tubo.

#### 2) Antimicrobianos incorporados al medio de cultivo:

Compuestos de amonio cuaternario: Cloruro de dodecil-bencil-dimetil-amonio, Bromuro de alquil-dimetil-carbetoximetil-amonio, y cloruro de alquil-trimetil-amonio. Todos ellos disueltos en solución salina al diez por ciento.

Sorbato sódico disuelto en solución salina al diez por ciento.

Ácido benzoico y sus ésteres, metil-parabén y propil-parabén, disueltos e incorporados en 0,1 cc. de alcohol etílico de 96°, concentración de alcohol que al diluirse en el medio no interfiere el crecimiento del *Sporendonema*.

Metabisulfito sódico, disuelto en solución salina al diez por 100.

Antibióticos, nistatina y griseofulvina, disueltos e incorporados en soluciones de formamida de forma que al incorporarla al medio quede ésta en concentraciones máximas del 1/1000 que no interfieren el desarrollo del *Sporendonema*.

3) Las concentraciones probadas de todos los antimicrobianos, excepto los antibióticos, en el medio de cultivo, en ppm, fueron las siguientes: 10.000, 1.000, 200, 100, 50, 25, 10, 5, 2 y 1. Los antibióticos en concentraciones, en u/cc., de 100, 50, 25, 10, 5, 2, 1 y 0,1.

4) Siembra: La siembra se realizó con 0,1 cc. de suspensión concentrada de esporas de *Sporendonema* en solución salina al 10 por ciento, diseminada perfectamente sobre la superficie del slant, previamente desecado hasta pérdida total de agua de condensación.

5) Incubación: a 25° durante un mes, con protección de las bocas de los tubos con plástico para evitar deshidratación del medio.

*Resultados:*

De los resultados encontrados, tablas II y III, se puede deducir el gran poder inhibitorio de todos los compuestos de amonio cuaternario probados (5 ppm.), y del ácido benzoico y sus esteres (25 - 50 ppm.), frente a la relativa actividad del metabisulfito sódico y el ácido sórbico (250 - 1000 ppm.) De los antibióticos probados, nistatina y griseofulvina, se comprueba la gran efectividad del primero (1 u/cc.), frente a la escasa del segundo (más de 100 u/cc.)

TABLA II

INHIBICION DEL DESARROLLO DEL *SPORENDONEMA EPIZOUM*  
POR ANTIMICROBIANOS

(Substrato Medio Sabouraud con 10 % Cl Na, Incubación 25°, un mes)

Antimicrobianos	Concentración del antimicrobiano en ppm										
	10.000	1.000	500	250	100	50	25	10	5	2	
Cloruro de dodecil-ben-cil-dimetil-amonio ....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
Bromuro de alquil-dime-til-carbetoximetil-amo-nio .....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
Cloruro de alquil-trime-til-amonio .....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
Sorbato sódico .....	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido benzoico .....	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
Metil-parabén .....	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
Propil-parabén .....	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
Metabisulfito sódico ....	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+

+= Desarrollo microbiano

-= No desarrollo microbiano

TABLA III

INHIBICION DEL DESARROLLO DEL *SPORENDONEMA EPIZOUM*  
POR ANTIBIOTICOS

(Substrato Medio Sabouraud con 10 % Cl Na, Incubación 25°, un mes)

Antibióticos	Concentración del antibiótico en u/cc							
	100	50	25	10	5	2	1	0,1
Nistatina .....	—	—	—	—	—	—	—	+
Griseofulvina .....	+	+	+	+	+	+	+	+

+= Desarrollo microbiano

-= No desarrollo microbiano

*Ensayos sobre pescado salado y seco:*

A la vista de los resultados obtenidos planteamos una prueba de protección de bacalao seco y salado frente al *Sporendonema*, empleando solamente aquellos antimicrobianos de alto poder inhibitorio, compuestos de amonio cuaternario.

Para ello empleamos como substrato, bloques de bacalao seco y salado de 5 cm. de largo por 3 cm. de ancho y alrededor de 1,5 de grosor. La incorporación del antimicrobiano se realizó sumergiendo los bloques en las soluciones previamente preparadas durante un tiempo de 10 minutos. Las soluciones fueron hechas sobre solución salina al 15 por 100.

Tras un ligero óreo de los bloques tratados por antimicrobiano, 24 horas a 25°, estos se introdujeron en tubos de 30 X 200 y fueron sembrados por 0,1 cc. de suspensión de esporas de *Sporendonema*, e incubados, previa protección de las bocas de los tubos con plástico, a 25 grados durante un mes.

Los resultados obtenidos, tabla IV, indican un comportamiento muy parecido de los tres compuestos de amonio cuaternario, con inhibición del desarrollo del *Sporendonema* a concentraciones de 5-10 ppm.

TABLA IV

INHIBICION DEL DESARROLLO DEL *SPORENDONEMA EPIZOUM*  
POR ANTIMICROBIANOS

(Substrato bacalao seco y salado, Incubación 25°, un mes)

Antimicrobiano	Concentración del antimicrobiano en ppm.					
	25	20	15	10	5	2
Cloruro de dodecil-bencil-dimetil amonio .....	—	—	—	—	—	++
Bromuro de alquil-dimetil-carboximetil-amonio .....	—	—	—	—	++	++
Cloruro de alquil-trimetil amonio .....	—	—	—	—	++	++

+= Desarrollo microbiano

-= No desarrollo microbiano

DISCUSION

El aislamiento del *Sporendonema epizoum* de todas las muestras de bacalao con empolvado pardo, le hacen aparecer como el responsable de la alteración. Sin embargo, el hecho de aislar con frecuencia otras especies de microorganismos, hongos generalmente de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* pudiera hacer pensar en una simbiosis microbiana. Es posible que esto pueda ocurrir alguna vez en la práctica. Pero el hecho de que en condiciones experimentales se pueda provocar siempre el empolvado pardo mediante la siembra del bacalao de esporas del *Sporendonema*, prueba de una forma definitiva la capacidad de este microorganismo para producir la alteración por sí solo.

El carácter halotolerante y no halófilo del *Sporendonema* se comprende fácilmente si pensamos en el amplio habitat del mismo en la naturaleza. Es posible que la halotolerancia de las cepas aisladas de salazones no sea más que una propiedad de adaptación y no de cons-

tución. Esta propiedad halotolerante puede ser de gran utilidad en la detección de las fuentes de contaminación en la industria, al permitir en medios de cultivo ricos en sal, el crecimiento del *Sporendonema* al tiempo que elimina el desarrollo de otros microorganismos que pudieran enmascarar el desenvolvimiento del primero.

Los resultados obtenidos con los diversos antifungicos probados, excepto los compuestos de amonio cuaternario, como inhibidores del desarrollo del *Sporendonema* en medios de cultivo, hacen pensar en la gran resistencia de este microorganismo. Sin embargo el extraordinario poder fungistático (5-10 ppm.), de los compuestos de amonio cuaternario para el *Sporendonema*, tanto en medios de cultivo como en bacalao seco y salado, inducen a pensar en la posibilidad de su empleo industrial en la lucha contra el empolvado. La única reserva a este empleo sería el que los salazones conservados por este producto no fueran totalmente inocuos para el consumidor. Reserva que podemos descartar si meditamos un poco en su escasa toxicidad y en el hecho de que las experiencias que sirvieron de base a los Servicios Sanitarios españoles para su aprobación en la fabricación de hielo destinado a la conservación de alimentos se utilizaran concentraciones más altas, y que el hielo estuvo en contacto con los alimentos tiempos infinitamente superiores, sin que aquellos adquirieran toxicidad alguna.

#### RESUMEN

Se ha realizado un estudio sobre la etiología y la lucha contra el empolvado del bacalao.

Se describen las características morfológicas y culturales del *Sporendonema epizoum*, así como los medios y técnicas de cultivo más idoneas para su desarrollo y aislamiento.

Tras de analizar los diversos métodos de lucha contra esta alteración del bacalao, se ha realizado un estudio de inhibición del desarrollo del *Sporendonema* sobre medios de cultivo por diversos antifungicos, ácido sórbico, ácido benzoico y esteres del mismo, metabisulfito sódico, diversos compuestos de amonio cuaternario, y dos antibióticos fungicidas, nistatina y griseofulvina, comprobándose una extraordinaria capacidad inhibitoria de los compuestos de amonio cuaternario, ácido benzoico y sus esteres, y nistatina, frente a una relativa actividad

del ácido sórbico y el metabisulfito. La griseofulvina no presenta actividad alguna en concentraciones prácticas para la industria.

Realizado el mismo estudio sobre bacalao seco y salado, empleando solamente los compuestos de amonio cuaternario se logran resultados muy semejantes a los anteriores.

#### RESUME

On a effectué une étude sur l'étiologie et la lutte contre l'empousserement de la morue.

On décrit les caractéristiques morphologiques et culturelles du *Sporendonema epizoum* ainsi que les milieux et techniques de culture le plus appropriés pour son développement et isolement.

Après avoir analysé les différents méthodes de lutte contre cette altération ou changement de la morue, on a effectué aussi une étude d'inhibition du développement du *Sporendonema* sur des milieux de culture par des divers antifugi, acide sorbique, acide benzoïque et ses esters, metabisulfite sodique, divers composés d'ammonium quaternaire et deux antibiotiques fungicides, la Nystatine et la Griseofulvine, et on a constaté un pouvoir inhibiteur extraordinaire dans les composés d'ammonium quaternaire, l'acide benzoïque et ses esters, et la Nystatine, contre un pouvoir relatif de l'acide sorbique et le metabisulfite. La Griseofulvine ne présente aucun pouvoir inhibiteur dans des concentrations pratiques pour l'industrie.

Effectuée la même étude sur de la morue sèche et salée, en employant seulement les composés d'ammonium quaternaire, on a obtenu des résultats similaires aux antérieurs.

#### SUMMARY

A study has been carried out on the ethiology and the fight against dun on codfish.

Morphological and cultural characteristics of *Sporendonema epizoum* as well as culture media and the most suitable characteristics of its culture for its growth and isolation are described.

Besides the analysis of the different methods of fighting against this alteration or change of codfish we also have carried out a study on inhibition of the growth of *Sporendonema* on culture media by various and different antifungi, sorbic acid, benzoic acid its esters, sodium metabisulfite, different or various quaternary ammonium compounds and two fungicide antibiotics: Nystatin and Griseofulvin, and we have found that the quaternary ammonium compounds, benzoic acid and its esters, and Nystatin have a remarkable inhibitory ability to a relative activity of sorbic acid and metabisulfite.

Griseofulvin has no activity in concentrations which are practical and useful for industry.

Very similar results to those above are obtained when the same study is carried out on dried salted codfish by using only quaternary ammonium compounds.

#### BIBLIOGRAFIA

1. ANOM, 1951.—*La revue de la conserve*, 46-51.
2. BARNES, J. M., 1959.—*Chemistry and Industry*, 18, 557-559.
3. BOY, J. W., y TARR, H. L. A., 1954.—*Progress Reports of the Pacific Coast Stations*, 99, 22-24.
4. CRUES, W. V., 1951.—*The Canner*, 112, 5,29.
5. DUSSAULT, H. P., 1950.—*Progress Reports of the Atlantic Coast Stations*, 51-54, 9.
6. F. A. O., 1960.—*La Inspección y vigilancia de aditivos alimentarios en Canadá*, Roma.
7. F. A. O., 1960.—*La Inspección y vigilancia de aditivos alimentarios en los Países Bajos*, Roma.
8. GEMINDER, J. J., 1959.—*Food Technology*, 13, 459-461.
9. KLIS, J. B.; WITTER, L. D. y ORDAHL, Z. J., 1959.—*Food Technology*, 13, 124-129.
10. PENSO, G., 1950.—*Il Prodotti della Pesca*, U. Hoepli, Milan.
11. REJAS, F., 1956.—*Contribución al estudio del poder bactericida y fungicida de los Compuestos de Amonio Cuaternario*. Tesis doctoral de la Universidad de Oviedo.
12. RESSUGGAN, J. C. L., 1951.—*Quaternary ammonium compounds in chemical sterilization*. United Trade Press. Ltda., Londres.
13. TROPA, E., 1956.—“*Empoado*” du bacalhau. Ministerio da Economía, Lisboa.
14. VON SCHERHORN, M., 1949.—*Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 45, 10, 255-257.
15. WRIGHT, H. B., 1961.—*Food Trade Review*, 31, 43-44.