

*micronucleatum*. It is indicated in their study that the collapse of the vacuole occurs due to the force of the surrounding endoplasm and not because of the contraction of the vacuole itself. It is, therefore, suggested by them that the term 'contractile vacuole' is a misnomer and it will be more accurate to describe it as the 'water-expulsion' vesicle. However, in this study it was observed that the vacuole became turgid and completely spherical just before expulsion, indicating an internal build-up of pressure. If the expulsion were to occur as a result of external pressure one would have expected the vacuole to become flattened or irregular prior to expulsion of its contents.

**Résumé.** Chez le *Balantidium coli*, la vacuole contractile se remplit graduellement et s'agrandit. Après une phase stationnaire, pendant laquelle elle reste irrégulière en apparence, elle se gonfle entièrement, devient sphérique, et puis s'affaisse subitement et expulse son contenu. L'affaissement est très rapide et ne prend qu'une fraction de seconde. Le cycle entier dure généralement 20 à 25 secondes.

V. ZAMAN

Department of Parasitology,  
Faculty of Medicine,  
University of Singapore, Singapore 3, 21 December 1969.

## Production de nidulotoxine par des *Aspergillus* appartenant à différentes espèces

Dans une note précédente<sup>1</sup> nous avons fait mention de la mise en évidence dans des extraits de cultures in vitro d'*Aspergillus nidulans* Wint d'une nouvelle mycotoxine, la nidulotoxine. Cette substance a été purifiée à partir d'extraits chloroformiques; elle cristallise en aiguilles incolores; en chromatographie en couche mince son spot présente une intense fluorescence rouge-brique sous irradiation UV; sa toxicité peut être révélée par inoculation intra-péritonéale au caneton âgé d'un jour, ou par inoculation dans l'œuf embryonné de poule. L'observation fortuite de la présence sur des chromatogrammes d'extraits d'*A. versicolor* Tir. d'un spot ayant les caractères de celui de la nidulotoxine nous a incités à rechercher si cette mycotoxine était synthétisée par des *Aspergillus* n'appartenant pas au groupe *nidulans*.

Les souches utilisées dans l'expérimentation ont été isolées dans notre laboratoire d'échantillons de céréales ou d'aliments composés destinés à l'alimentation du bétail<sup>2</sup>. L'appartenance taxonomique de chacune d'elles a été établie selon les critères proposés par RAPER et FENNELL<sup>3</sup>. Les souches appartenant aux groupes *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. clavatus*, *A. nidulans*, *A. ochraceus*, *A. flavus-oryzae*, *A. fumigatus*, *A. restrictus*, *A. flavipes* ont été cultivées sur milieu liquide synthétique de Czapek modifié selon BRIAN et al.<sup>4</sup> et supplémenté en asparagine au taux de 2%/<sub>00</sub>, celles du groupe *A. versicolor* sur milieu de Czapek modifié selon BRIAN et al.<sup>4</sup> mais contenant seulement 5%/<sub>00</sub> de glucose et supplémenté en une peptone bactériologique (4%/<sub>00</sub>). La préparation des récipients contenant les cultures ainsi que la méthode d'inoculation ont été précédemment décrites<sup>1</sup>. Les cultures ont été incubées à 30 °C; la durée de l'incubation a varié de 7 à 10 jours suivant les souches. Les cultures ont été soumises à une extraction par le chloroforme bouillant; l'extrait repris par le méthanol a subi une partition contre l'hexane, puis a été chromatographié, parallèlement à une solution de nidulotoxine, sur couche mince de silice-gel H Merck en éther sulfurique. Dans le cas où les chromatogrammes d'un extrait de souche n'appartenant pas à l'espèce *A. nidulans* présentaient un spot identique à celui de la nidulotoxine, la substance correspondant à ce spot a été purifiée par chromatographies successives en éther et chloroforme-éther (6/4, v/v) et cristallisée à partir de sa solution acétonique. L'identité avec la nidulotoxine a été recherchée par l'établissement du spectre d'absorption en IR (spectrophotomètre Beckman IR 8 - échantillons inclus en KBr).

Cent souches d'*Aspergillus* ont été étudiées. Les 9 souches examinées appartenant à l'espèce *A. nidulans*

Wint se sont avérées productrices de nidulotoxine; en outre, 3 souches d'*A. versicolor* Tiraboshi et 4 d'*A. Sydowi* Thom et Church produisaient un métabolite toxique pour l'embryon de poulet et le caneton, ayant les caractères chromatographiques de la nidulotoxine, et dont le spectre d'absorption en IR est identique à celui de cette mycotoxine.

Des différences apparaissent entre ces 16 souches quant à l'intensité de la synthèse de la nidulotoxine dans des

Tableau I. Production de nidulotoxine par différentes espèces d'*Aspergillus*

Groupe	Espèce	Nombre de souches Etudiées	Productrices de nidulotoxine
<i>A. glaucus</i>	<i>A. repens</i> de Bary	5	0
	<i>A. tonophilus</i> Ohtsuki	2	0
	<i>A. ruber</i> Thom et Church	5	0
	<i>A. chevalieri</i> Thom et Church	8	0
	<i>A. amstelodami</i> Thom et Church	3	0
	<i>A. restrictus</i> Smith	2	0
<i>A. restrictus</i>	<i>A. fumigatus</i> Fresenius	7	0
	<i>A. fischeri</i> Wehmer	1	0
<i>A. ochraceus</i>	<i>A. ochraceus</i> Wilhelm	1	0
<i>A. candidus</i>	<i>A. candidus</i> Link	15	0
<i>A. flavus-oryzae</i>	<i>A. flavus</i> Link	29	0
	<i>A. parasiticus</i> Speare	2	0
<i>A. versicolor</i>	<i>A. versicolor</i> Tiraboshi	3	3
	<i>A. Sydowi</i> Thom et Church	4	4
	<i>A. nidulans</i> Wint	10	10
<i>A. clavatus</i>	<i>A. clavatus</i> Desmazières	2	0
<i>A. flavipes</i>	<i>A. flavipes</i> Thom et Church	1	0

<sup>1</sup> P. LAFONT, J. LAFONT et C. FRAYSSINET, Experientia 26, 61 (1970).

<sup>2</sup> Nous remercions Monsieur CL. MOREAU (Faculté des Sciences de Brest) de nous avoir fourni une des souches d'*A. versicolor*.

<sup>3</sup> K. B. RAPER et D. I. FENNELL, *The Genus Aspergillus* (Williams et Wilkins, Baltimore 1965).

<sup>4</sup> P. W. BRIAN, A. W. DAWKINS, J. F. GROVE, H. G. HEMMING, D. LOWE et G. L. NORRIS, J. exp. Bot. 12, 1-7 (1961).

conditions expérimentales définies. Les quantités de nidulotoxine ont été appréciées, pour l'ensemble des souches, par comparaison sur couche mince de gel de silice des fluorescence développées par des spots de dilutions successives de l'échantillon et des standards préparés

Tableau II. Synthèse de nidulotoxine par des souches des groupes *A. nidulans* et *A. versicolor*

Espèce	Désignation de la souche	Quantité de nidulotoxine (mg/l de culture)	Par comparaison Par pesée après fluorescence cristallisation
<i>A. nidulans</i>	516 B	49	26,6
	110 C	35	
	120	49	
	114 C	23	
	47 D	1,5	
	537 B	15	
	523 C	50	
	502 J	32	
	535 C	25	
	A.V N 1	36	19,1
<i>A. versicolor</i>	304 C	3	0,9
	305 A	28	17
	577 B	26	18,1
<i>A. Sydowi</i>	325	34	20
	352	9	2,6
	366	22	8,9

à partir de produit cristallisé; cette méthode paraît comporter une marge d'imprécision de l'ordre de  $\pm 15\%$ . Pour certaines souches, des volumes importants de culture ont été utilisés pour purifier et cristalliser la nidulotoxine; en raison de pertes survenant aux différents stades de la préparation, le poids de cristaux est nettement inférieur aux valeurs estimées par appréciation de l'intensité de la fluorescence sur chromatogrammes de l'extrait brut. Dans le Tableau II sont rapportés les résultats fournis par les 2 méthodes; ces résultats montrent que certaines souches d'*A. versicolor* Tir. et d'*A. Sydowi* Thom et Church élaborent des quantités importantes de nidulotoxine<sup>5 6</sup>.

*Summary.* Strains of *A. versicolor* Tiraboshi and *A. Sydowi* Thom and Church produce a toxic metabolite spectrographically identical with the nidulotoxin.

P. LAFONT et J. LAFONT

Inserm – Laboratoire de Toxicologie Alimentaire,  
Boîte postale 40,  
F-78 Le Vesinet (France), 5 janvier 1970.

<sup>5</sup> Ce travail a bénéficié d'une aide financière de contrats de recherches de l'Action Concertée «Aflatoxine».

<sup>6</sup> Nous exprimons nos remerciements à MICHEL GAILLARDIN pour son excellente assistance technique.

## PRO EXPERIMENTIS

### Measurement of Pumping Activity in the Gastropod *Crepidula fornicata*

In contrast to most prosobranchs, the limpet *Crepidula fornicata* (L.) – adapted to its almost sessile way of life – is a suspension feeder. A water current is produced by the lateral cilia on the gill filaments which makes gas exchange possible as well as filtration of suspended particles (detritus, plankton, etc.). The mechanism of filtration, by means of 2 endless, continuously secreted mucus filters of different structure, has attained a high degree of perfection in this mollusc. The coarse mantle mucus filter, spread at the entrance to the mantle cavity, retains mainly large particles and the much finer branchial mucus filter, situated beneath the gills, entangles small particles from the water inspired. Although the structure and function of the feeding organs have been thoroughly studied in *Crepidula fornicata*<sup>1</sup>, no information has been obtained on the rates of water transport and filtration.

Several techniques of rather different reliability have been employed in corresponding physiological experiments conducted with various species of bivalves (cf. JØRGENSEN<sup>2</sup>, WINTER<sup>3</sup>). The determination of pumping rate (the measurement of the inhalant or exhalant water flow) requires a direct method: while the determination of filtration rate (the measurement of the decrease in concentration of colloidal or particulate matter) is achieved in an indirect way. Advantages and shortcomings of both methods have recently been emphasized by WINTER<sup>3</sup>, who expressed reservations against the application of the direct method because it may lead to a significant impairment of the test animals.

In any case, to measure the flow rates of suspension feeders, some manipulations are necessary for channelling the inflowing or outflowing water current. This statement also pertains to the principle used with *Crepidula fornicata*. It is based on photo-electric measurement of water transport by means of a flowmeter allowing continuous, long-term recordings. Registrations made over several days, however, did not indicate any recognizable disturbances in the individuals tested; hence, this device was regarded as being highly suitable for experimental work of this kind.

The method employed was designed by REIN<sup>4</sup> for measurement of the velocity of blood transport in blood vessels. A modified technique was developed by KRÜGER<sup>5</sup> for investigations on pumping intensity of the lugworm *Arenicola marina* *in situ*. This principle has been adopted for *Crepidula fornicata* with some minor improvements with regard to recording. The flowmeter is constructed as

<sup>1</sup> B. WERNER, Helgoländer wiss. Meeresunters. 4, 260 (1953).

<sup>2</sup> C. B. JØRGENSEN, *Biology of Suspension Feeding* (Pergamon Press, Oxford 1966).

<sup>3</sup> J. E. WINTER, Mar. Biol. 4, 87 (1969).

<sup>4</sup> H. REIN, in *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden* (Ed. E. ABBERHALDEN; Urban und Schwarzenberg, Berlin 1935), vol. 8, p. 693.

<sup>5</sup> F. KRÜGER, Helgoländer wiss. Meeresunters. 11, 70 (1964).