



HAL
open science

TOXINES D'ASPERGILLUS OCHRACEUS WILHELM. I. – PRODUCTION D'OCHPATOXINES PAR DES SOUCHES ISOLÉES DE FOURRAGES SECS, CULTIVÉES SUR BLÉ

P. Galtier, J. Le Bars, Geneviève Henry, M. Alvinerie

► **To cite this version:**

P. Galtier, J. Le Bars, Geneviève Henry, M. Alvinerie. TOXINES D'ASPERGILLUS OCHRACEUS WILHELM. I. – PRODUCTION D'OCHPATOXINES PAR DES SOUCHES ISOLÉES DE FOURRAGES SECS, CULTIVÉES SUR BLÉ. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1973, 4 (3), pp.487-497. <hal-00900778>

HAL Id: hal-00900778

<https://hal.science/hal-00900778v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

TOXINES D'*ASPERGILLUS OCHRACEUS* WILHELM

I. — PRODUCTION D'ŌCHRATOXINES PAR DES SOUCHES ISOLÉES DE FOURRAGES SECS, CULTIVÉES SUR BLÉ

P. GALTIER et J. LE BARS

avec la collaboration technique de Geneviève HENRY et de M. ALVINERIE

*Station de Pharmacologie-Toxicologie, I. N. R. A.,
180, Chemin de Tournefeuille,
31300 Toulouse*

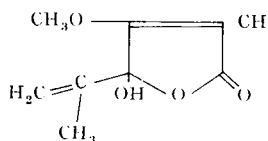
RÉSUMÉ

La toxinogénicité de huit souches d'*Aspergillus ochraceus* W. provenant de fourrages est testée après culture sur blé ; deux sécrètent à la fois l'ochratoxine A et l'ochratoxine B ; par contre, ni la melléine, ni l'acide pénicillique n'ont été détectés. Une substance inconnue de fluorescence jaune-verdâtre ou bleue selon le système éluant est produite inégalement par toutes les souches.

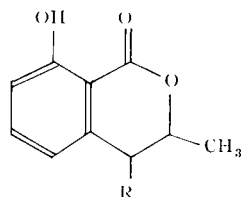
Ces résultats sont comparés à ceux déjà obtenus par d'autres auteurs ; la production de toxine sur fourrages secs et dans diverses conditions de stockage reste à vérifier.

INTRODUCTION

Contaminant naturel des fourrages (LE BARS et ESCOULA, 1973 ; STARON, 1965) et de nombreux substrats alimentaires, l'*Aspergillus ochraceus* WILHELM peut élaborer certaines mycotoxines dont les plus connues sont : l'acide pénicillique, la melléine, la 4-hydroxymelléine et les ochratoxines A et B.

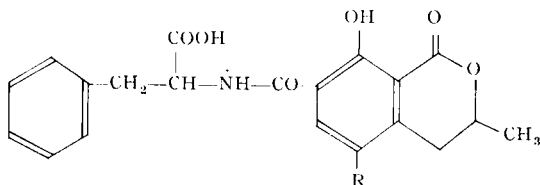


acide pénicillique



Melléine : R = H

4-hydroxymelléine : R = OH



Ochratoxine A : R = Cl

Ochratoxine B : R = H

Isolées et identifiées par VAN DER MERWE (1965), les ochratoxines A et B ont fait l'objet de travaux portant sur leur étude physico-chimique, biochimique et toxicologique. L'ochratoxine A est le plus toxique des métabolites connus d'*Aspergillus ochraceus* tant pour le Rat (PURCHASE et THÉRON, 1968) que pour le Caneton (STEYN et HOLZAPFEL, 1967).

La melléine et l'acide pénicillique sont également toxiques ; toutefois leurs doses létales sont nettement supérieures à celle de l'ochratoxine A (SASAKI *et al.*, 1970 ; MURNAGHAN, 1946).

Ayant isolé huit souches d'*Aspergillus ochraceus* W. à partir de fourrages (Graminées, Luzerne), nous avons voulu tester leur production de toxines en nous plaçant dans des conditions optimales de toxinogenèse, c'est-à-dire en culture sur céréales. Sur ce substrat, en effet, de nombreux auteurs ont obtenu d'abondantes productions d'ochratoxines (VAN DER MERWE, 1965 ; VAN WALBEEK *et al.*, 1968 ; LAI *et al.*, 1968 ; SCHINDLER et NESHEIM, 1970 ; TRENK *et al.*, 1971) ou d'acide pénicillique (CIEGLER, 1972) ; seule, la melléine n'a jamais été étudiée dans les conditions que nous avons retenues.

Enfin, nous avons cherché, à partir de la mesure du poids sec après culture, à trouver une relation entre l'éventuelle élaboration de mycotoxines et la croissance de la moisissure.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. 1. — Origine des souches et conditions de culture

Huit souches d'*Aspergillus ochraceus* W., isolées de fourrages secs (LE BARS et ESCOULA, 1973) et la souche M 298 de la Food and Drug Administration (1) ont été ensemencées sur milieu

(1) Nous tenons à remercier M. JEMMALI de la Station de Biochimie et Physico-Chimie des céréales (I. N. R. A.) qui a bien voulu nous fournir la souche de référence M 298 FDA.

de Czapek en tubes ; après treize jours de culture à 22°C, des suspensions de spores sont préparées dans une solution de Tween 80 à 1 p. 1 000 (LE BARS, 1972) et ajustées, après numération à la cellule de Thoma, à une concentration de $50 \cdot 10^6$ spores par millilitre.

La culture en vue de la détection du pouvoir toxigène est effectuée sur blé entier à raison de 100 grammes par boîte de Roux d'un litre ; celui-ci est stérilisé à deux reprises à deux jours d'intervalle à 120°C pendant vingt minutes. L'ensemencement est réalisé par 10 ml de la suspension de spores. Le blé utilisé (contenant 13 p. 100 d'eau) est humidifié par 40 ml d'eau distillée stérile (teneur en eau du blé humidifié : 42 p. 100) (SCHINDLER et NESHEIM, 1970).

Après 12 jours d'incubation à 27°C (TRENK *et al.*, 1971), à l'obscurité, le poids sec du substrat est mesuré afin d'apprécier l'importance de la végétation de la moisissure.

I. 2. — Plan expérimental

Trois répétitions sont réalisées pour chacune des neuf souches de champignons ainsi que pour un témoin non ensemencé ; les échantillons sont randomisés dans l'étuve et la suite de l'expérimentation, jusqu'à la quantification des toxines, est effectuée à l'aveugle.

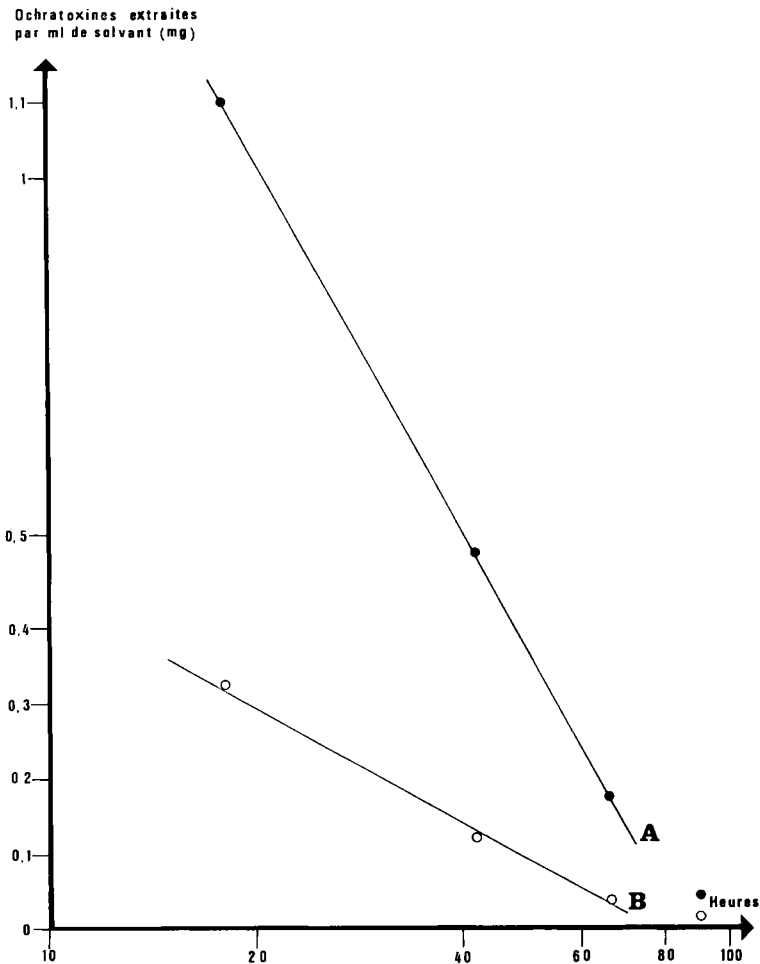


FIG 1. — Décroissance de la teneur en ochratoxines en fonction des renouvellements de solvants (moyenne des essais réalisés sur 9 échantillons)

I. 3. — *Extraction*

La première phase consiste à préparer les substrats en vue de leur épuisement ultérieur. Les boîtes de Roux sont d'abord pasteurisées dans une étuve à 80°C pendant 24 heures. Les grains moisissés sont ensuite séchés à 70°C pendant une journée. On obtient ainsi un résidu que l'on pulvérisse au Waring-Blendor durant deux minutes à vitesse réduite.

Dans un deuxième temps, chaque poudre est épuisée par 250 ml d'un mélange chloroforme-méthanol à parties égales, dans des fioles coniques à col large de 500 ml bouchées par une feuille d'aluminium ; on opère à 37°C et à l'obscurité et on réalise quatre épuisements successifs, le premier d'une durée de 18 heures et les trois suivants de 24 heures. Afin de tester l'efficacité de cet épuisement, le mélange d'extraction est séparé du substrat par filtration ; chaque extrait non concentré est conservé et traité individuellement. Comme le montre la figure 1, la décroissance de la teneur en ochratoxines est une fonction exponentielle des renouvellements de solvant. Au troisième jour de l'épuisement, au moins 95 p. 100 des ochratoxines contenues dans la poudre de départ ont été extraites.

I. 4. — *Identification des mycotoxines*

Elle est réalisée par chromatographie sur gel de silice en couche mince et par comparaison avec des échantillons standards d'ochratoxines A et B ⁽¹⁾. Pour identifier la melléine et l'acide pénicillique, nous avons utilisé les Rf ⁽²⁾ mesurés par divers auteurs dans des conditions comparables d'éluion et de révélation.

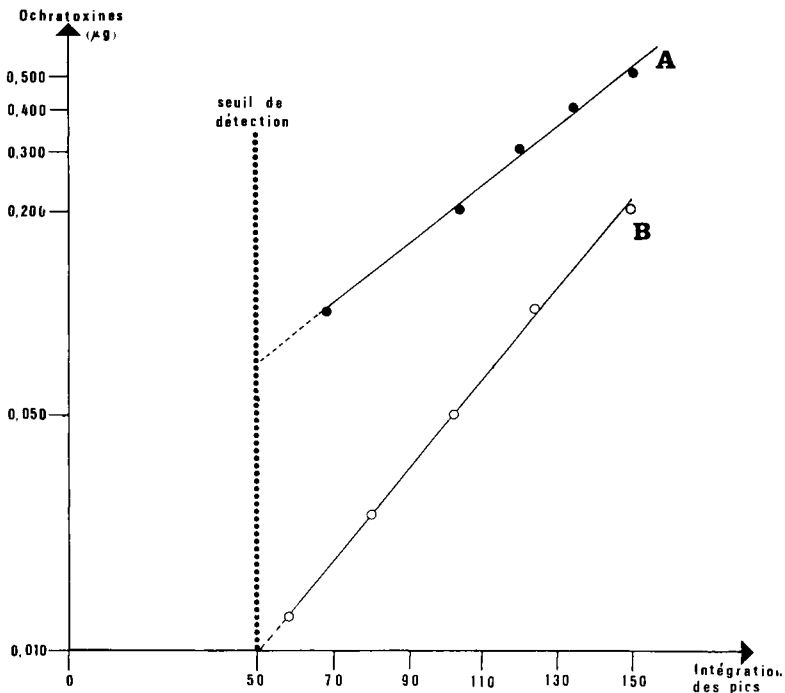


Fig. 2. — Droites d'étalonnage établissant les relations entre le nombre d'intégrations des pics de fluorescence et le logarithme de la concentration en ochratoxines

⁽¹⁾ Nous remercions MM. I. F. H. PURCHASE et M. STEYN du National Institute for Nutritional Disease of the South African Medical Research Council (Pretoria) qui ont bien voulu nous fournir ces échantillons.

⁽²⁾ Rf. = $\frac{\text{distance parcourue par le centre de la tache}}{\text{distance parcourue par la phase mobile}}$

Dix microlitres de chaque extrait du premier jour d'épuisement sont déposés sur plaque de gel de silice G de 0,25 mm d'épaisseur (Merck, Réf. 5721). Les quatre systèmes de développement choisis sont mentionnés au tableau 2.

La vérification de l'identité des mycotoxines a été effectuée par spectrophotométrie d'absorption en ultraviolet, après isolement des bandes fluorescentes obtenues sur chromatogramme préparatif (Merck, Réf. 5717) et cristallisation des métabolites dans un solvant convenable.

I. 5. — Quantification des ochratoxines A et B

Les quatre extraits successifs (§ 1.3) sont respectivement dilués au 1/25, 1/20, 1/10 et 1/5 ; dix microlitres de chaque dilution sont déposés sur plaque de gel de silice (Merck, Réf. 5721) et soumis à une migration dans une cuve saturée contenant le mélange éluant : chloroforme, acétone, acide formique (80 : 20 : 1, v/v/v).

Nous mesurons ensuite l'intensité de fluorescence de chaque spot d'ochratoxines à l'aide d'un photodensitomètre Joyce « Chromoscan » équipé en fonction des longueurs d'onde optimales d'excitation (filtre à 325 nm et fente de 5 mm) et d'émission (filtre à 475 nm) déterminées par CHU (1970). Des gammes d'ochratoxine A (0,10 à 0,50 µg) et d'ochratoxine B (0,0125 à 0,20 µg) nous ont permis de tracer les droites d'étalonnage (fig. 2) qui définissent la relation entre le nombre d'intégrations des pics et le logarithme de la concentration en ochratoxine. Les seuils de détection obtenus sont de 70 ng pour l'ochratoxine A et de 10 ng pour l'ochratoxine B.

II. — RÉSULTATS

II. 1. — Aspect qualitatif des chromatogrammes

D'après les chromatogrammes obtenus, on peut classer les neuf souches testées en deux catégories.

Un groupe constitué par les moisissures M 298, C 27_i et D 29 élabore trois taches fortement fluorescentes dont les deux inférieures possèdent le même comportement chromatographique que les standards de référence d'ochratoxines A et B. La migration et les propriétés de fluorescence de ces trois taches sont mentionnées dans le tableau 1.

TABLEAU I

Comportement chromatographique des métabolites des souches testées

Système de solvant	Cuves	Tache 1			Tache 2			Tache 3		
		Rf	FN	FA	Rf	FN	FA	Rf	FN	FA
1	Saturée	0,60	BV	BV	0,00	V	B	0,00	BV	B
2	Saturée	0,66	VJ	BV	0,57	V	B	0,43	BV	B
3	Non saturée	0,57	VJ	BV	0,39	V	B	0,26	BV	B
4	Non saturée	0,60	VJ	BV	0,33	V	B	0,16	BV	B

Système 1 : chloroforme-acétone (93 : 7, v/v).

Système 2 : toluène-acétate d'éthyle-acide formique (5 : 4 : 1, v/v/v).

Système 3 : benzène-acide acétique (9 : 1, v/v).

Système 4 : chloroforme-acétate d'éthyle-acide formique (60 : 40 : 1, v/v/v).

FN : fluorescence naturelle.

FA : fluorescence après exposition aux vapeurs d'ammoniaque.

VJ : vert-jaune ; BV : bleu-vert ; V : vert ; B : bleu foncé.

Constituant un second groupe, les autres souches ne parviennent à élaborer qu'un dérivé dont les Rf et les caractéristiques de fluorescence correspondent à la tache 1.

II. 2. — Identification des taches

Nous n'avons pu détecter ni l'acide pénicillique, ni la melléine en nous plaçant dans les mêmes conditions que certains auteurs (MOORE *et al.*, 1972 ; CIEGLER, 1970 ; 1972).

Par contre, si la tache 1, dénommée par nous substance V, ne correspond à aucun dérivé décrit à ce jour, les taches 2 et 3 peuvent être assimilées respectivement aux ochratoxines A et B, d'après la comparaison avec les échantillons de référence.

Le tableau 2 reproduit en particulier les observations relatives à l'éventuelle production de toxine.

TABLEAU 2

Production de mycotoxine et consommation de matière sèche par les neuf souches testées après culture sur blé

	Ochratoxine A (mg)	Ochratoxine B (mg)	Acide pénicillique*	Melléine*	Tache 1 (V)*	Consommat. (p. 100)
M 298 FDA	260,9 ± 118,8	67,1 ± 39,1	—	—	±	30,06
C 27 _i	384,8 ± 99,8	104,0 ± 15,7	—	—	±	31,46
D 29	418,2 ± 82,6	112,7 ± 27,6	—	—	±	30,15
C 1 _h	ND	ND	—	—	++	39,53
C 28 _e	ND	ND	—	—	+	42,35
C 34 _b	ND	ND	—	—	++	30,73
C 36 _g	ND	ND	—	—	++	28,61
C 35 _c	ND	ND	—	—	++	30,13
C 21 _j	ND	ND	—	—	+++	33,66

* : Détermination qualitative visuelle.
ND : Fluorescence non détectée.

La vérification de l'identité des mycotoxines est assurée par la détermination des spectres d'absorption en ultraviolet après séparation sur plaque de gel de silice à l'échelle préparative et cristallisation.

Ochratoxine A recristallisée dans le benzène :

ÉTOH
UV λ max : nm 214,333

Ochratoxine B recristallisée dans le méthanol :

ÉTOH
UV λ max : nm 218,318

A titre de comparaison, nous indiquons ci-après les longueurs d'onde maximales d'absorption de la substance V après cristallisation dans le benzène, dans deux solvants différents :

ETOH	
UV λ max :	nm 217,350
CHCl ₃	
UV λ max :	nm 247,349

II. 3. — *Aspect quantitatif*

Seuls, les deux champignons toxigènes C 27₁ et D 29 ont pu être comparés à la souche de référence M 298 de la Food and Drug Administration. Le tableau 2 indique également les productions moyennes d'ochratoxines ; l'écart mentionné représente l'intervalle de confiance à 5 p. 100 calculé à partir des trois répétitions de chaque souche. L'analyse statistique de ces résultats montre des différences significatives entre les productions moyennes d'ochratoxines des deux moisissures C 27₁ et D 29 d'une part et celle de la souche de référence M 298 d'autre part.

Pour compléter ces données, nous avons calculé le rapport existant entre les productions d'ochratoxine A et d'ochratoxine B ; on obtient respectivement 3,88 pour la souche de référence, 3,70 et 3,71 pour les moisissures C 27₁ et D 29.

II. 4. — *Rapports production et végétation*

La consommation moyenne de matière sèche (p. 100) figure au tableau 2. L'analyse de variance met en évidence une différence significative des moyennes dans leur ensemble au risque de 1 p. 100 ; la comparaison par le test de Tukey révèle que les inégalités ne sont imputables qu'à deux souches non toxigènes (tabl. 2). Par contre, il n'existe pas de différence entre les souches élaborant des ochratoxines quant à la croissance estimée indirectement par la perte de matière sèche.

DISCUSSION

III. 1. — *Aspect qualitatif de la production de toxines*

Le comportement chromatographique identique à celui des échantillons de référence et la similitude des spectres d'absorption en ultraviolet par rapport aux données de NESHEIM (1969) nous permettent de penser que les ochratoxines A et B sont bien les métabolites des souches M 298, C 27₁ et D 29. Nous pouvons par ailleurs remarquer combien nos observations coïncident avec celles de MOORE *et al.* (1970) dans des conditions comparables. Ces auteurs enregistrent pour les deux premiers mélanges éluant des valeurs de R_f de 0 et 0,64 pour l'ochratoxine A ; ils constatent également le même changement de fluorescence du vert au bleu foncé après exposition aux vapeurs d'ammoniaque. Le système n° 3 nous autorise à une comparaison avec CIEGLER (1972) ; les deux ochratoxines y migrent bien dans le même ordre : d'abord l'ochra-

toxine A (Rf = 0,39 contre 0,43 pour CIEGLER), puis l'ochratoxine B (Rf = 0,26 contre 0,24).

Nous n'avons pas décelé la présence d'ochratoxine C qui est un autre métabolite fluorescent d'*Aspergillus ochraceus* W. (MERWE, 1965) doué d'une forte toxicité (STEYN et HOLZAPFEL, 1967); ce dérivé n'a d'ailleurs été que très rarement décrit, tout au moins en ce qui concerne son caractère contaminant.

L'acide pénicillique a été recherché dans les conditions préconisées par CIEGLER (1970; 1972) : développement en cuve non saturée et utilisation des éluants 3 et 4. Après migration et séchage, les plaques placées durant cinq minutes en cuve saturée de vapeurs d'ammoniaque n'ont révélé aucune tache pouvant correspondre à l'acide pénicillique.

Les Rf étant voisins de ceux annoncés par MOORE *et al.* (1970) et obtenant le même changement de fluorescence dans le deuxième système de développement (tabl. I) nous aurions pu reconnaître la melléine en la substance V. Toutefois, nous n'avons discerné aucune variation de fluorescence après exposition aux vapeurs d'ammoniaque pour le système I qui ne contient pas d'élément acide et surtout le spectre d'absorption en ultraviolet s'est révélé totalement différent de celui rapporté par SASAKI *et al.* (1970) pour la melléine. D'après ces critères physico-chimiques, nous ne pouvons donc assimiler ce produit fluorescent V à aucun métabolite signalé d'*Aspergillus ochraceus* W.; bien entendu, tout pouvoir toxique à son sujet reste à démontrer.

Les légères différences de Rf pouvant exister par rapport aux résultats d'autres auteurs semblent dues à l'emploi de plaques chromatographiques d'épaisseur et d'origine différentes, ainsi qu'aux variations expérimentales inhérentes à des laboratoires différents.

En l'état actuel de nos travaux, la production de toxines de nos souches se limite à la seule élaboration d'ochratoxines A et B; en effet, nous n'enregistrons ni production d'acide pénicillique, ni de melléine.

III. 2. — Aspect quantitatif de la production d'ochratoxines

Nous avons déjà mentionné la différence significative de production d'ochratoxines entre la souche M 298 et les deux champignons C 27_i et D 29 (§ II.3). On est en droit de se demander si cette inégalité tient à une particularité génétique ou si l'on est en présence d'une atténuation de la moisissure de référence M 298, consécutive à de nombreux repiquages.

On doit noter également la similitude des rapports existant entre les productions des deux ochratoxines (§ II.3). Ce fait est en accord avec la thèse selon laquelle la nature du substrat serait responsable des teneurs plus ou moins élevées en ochratoxines A ou B. A ce sujet, DAVIS *et al.* (1969) ont réalisé une étude sur milieu liquide démontrant notamment les influences des sucres et des substances azotées sur la production de ces toxines.

D'autres auteurs ont également montré l'influence sur l'élaboration d'ochratoxine A en cultures sur substrats secs d'origine alimentaire, de paramètres tels que la température, la durée de l'incubation ou la teneur en eau du substrat; nous avons d'ailleurs tenu compte de ces observations dans la mise au point de notre protocole expérimental (§ I.1). A titre comparatif, nous avons dressé le tableau 3.

TABLEAU 3

Productions comparées d'ochratoxine A sur milieux solides

Auteurs	Souche	Substrat	H	Incubation		
				Durée (j)	t (°C)	P
SCHINDLER et NESHEIM (1970)	M 298	Pain complet	40 à 70	19 à 21	23	239
YAMAZAKI <i>et al.</i> (1970)	MR 31.1 MTR 26.1	Riz	50	9*	27	270
		Riz	50	9*	27	80,6
TRENK <i>et al.</i> (1971)	NRRL 3174	Riz	100	12*	28	170
		Maïs	100	8*	28	190
		Son de blé	100	14*	28	150
CIEGLER (1971)	NRRL 5175	Blé	30	17	28	3,46
		Maïs	30	10	28	1,80
Résultats personnels	M 298	Blé	50	12	27	260
	C 27i	Blé	50	12	27	384
	D 29	Blé	50	12	27	418

* : Agitation éventuelle des cultures.

H : Humidité (en ml d'eau distillée ajoutée à 100 g de substrat).

P : Production d'ochratoxine A (en mg par 100 g de substrat).

Les importantes différences de production relevées dans ce tableau semblent dues à la diversité des méthodes de cultures et au comportement hétérogène des souches employées. Bien qu'une interprétation paraisse difficile, on peut rapprocher nos résultats de ceux obtenus par SCHINDLER et NESHEIM (1970) avec la même moisissure M 298, mais sur substrat différent ou par YAMAZAKI *et al.* (1970) avec la souche MR 31.1 et culture sur riz.

III. 3. — Aspect mycologique de la production d'ochratoxines

Du fait qu'il existe des différences significatives dans la production d'ochratoxines selon les souches pour une même consommation de substrat, on peut dire que ces inégalités sont imputables à leur potentiel propre de toxinogénèse et non à des différences d'activité métabolique générale ou de croissance, mesurées indirectement par la perte de matière sèche (tabl. 2).

Dans nos observations, deux souches sur huit se sont révélées productrices de toxines. Ces résultats sont comparés à ceux d'autres auteurs dans le tableau 4.

En dépit du faible nombre de souches testées, notre proportion de souches toxigènes (25 p. 100) est nettement supérieure à celle rapportée par NATORI *et al.* (1970) pour des moisissures isolées sur divers aliments japonais (6 p. 100), seul résultat pour lequel l'origine des souches a été précisée.

Si, effectivement, deux de nos souches secrètent des ochratoxines sur blé, il resterait à vérifier qu'il en est bien de même lorsqu'elles poussent sur leur substrat d'origine, les fourrages. S'il en était ainsi, et compte tenu des observations de LE

TABLEAU 4

Proportion de souches d'Aspergillus ochraceus élaborant l'ochratoxine A

Auteurs	Origine des souches	Nombre de souches testées	Pourcentage de souches toxigènes
NESHEIM, 1967	Non précisée	14	28
LAI <i>et al.</i> , 1968	Non précisée	34	12
NATORI <i>et al.</i> , 1970	Aliments japonais	33	6
CIEGLER, 1972	Non précisée	17	47
Résultats personnels	Fourrages secs	8	25

BARS et ESCOULA (1973), la probabilité pour qu'un fourrage héberge en quantité relativement importante une souche toxigène est d'environ 2 p. 100; la contamination pourrait donc représenter un risque non négligeable. Cette vérification est actuellement en cours dans notre laboratoire.

Reçu pour publication en avril 1973.

SUMMARY

TOXINS OF *ASPERGILLUS OCHRACEUS* WILHELM

I. — PRODUCTION OF OCHRATOXINS BY STRAINS ISOLATED FROM DRY FODDER, CULTIVATED ON WHEAT

The toxigenicity of eight strains of *Aspergillus ochraceus* W. originating from fodder was tested after culture on wheat; two strains secreted both the ochratoxins A and B; on the other hand neither melleine nor penicillic acid were detected. An unknown substance of greenish-yellow or blue fluorescence depending on the method of elution was produced in different amounts by all the strains.

These results have been compared with those obtained already by other workers; the production of toxins in dry fodders and in varying conditions of storage has still to be tested.

РЕЗЮМЕ

Токсины *Aspergillus Ochraceus Wilhelm*. — I. Образование токсинов штаммами выделенными из сухого фуража а культивированных на пшенице.

Токсиногенность вызванная восьмью штаммами *Aspergillus ochraceus W.* взятых на фураже была исследована, после культуры на пшенице; два штамма выделяют одновременно ochratoxины А и В; за то не удалось

обнаружить ни меллеина, ни пенициллиновой кислоты. Образование неизвестного вещества, зеленовато-жёлтого или синего цвета наблюдалось, оно неодинаково для разных штаммов.

Результаты наших опытов сравнивались с результатами полученными другими авторами; следует проверить образование токсинов на сухом корме и в разных условиях хранения.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CHU F. S., 1970. Note on solid state fluorescence emission of ochratoxins A and B on silica gel. *J. Ass. off. anal. Chem.*, **53**, 696-697.
- CIEGLER A., 1972. Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. *Canad. J. Microbiol.*, **18**, 631-636.
- CIEGLER A., KURTZMAN C. P., 1970. Fluorodensitometric assay of penicillic acid. *J. Chromatogr.*, **51**, 511-516.
- DAVIS N. D., SEARCY J. W., DIENER U. L., 1969. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in a semisynthetic medium. *Appl. Microbiol.*, **17**, 742-744.
- LAI M., SEMENIUK G., HESSELTINE C. W., 1968. Nutrients affecting ochratoxin A production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology*, **58**, 1056 (Abstr.).
- LE BARS J., 1972. Obtention d'une série définie de dilutions à partir d'une suspension de germes fongiques. *Ann. Rech. vétér.*, **3**, 435-447.
- LE BARS J., ESCOULA L., 1973. Mycoflore des fourrages secs. I. Inventaire et fréquence des espèces. *Ann. Rech. vétér.*, **4**, 273-282.
- MOORE J. H., DAVIS N. D., DIENER U. L., 1972. Mellein and 4-hydroxymellein production by *Aspergillus ochraceus* WILHELM. *Appl. Microbiol.*, **23**, 1067-1072.
- MURNAGHAN M. F., 1946. The pharmacology of penicillic acid. *J. Pharmacol. exper. Therapeut.*, **88**, 119-132.
- NATORI S., SAKAKI S., KURATA H., UDAGAWA S. I., ICHINOE M., SAITO M., UMEDA M., 1970. Chemical and cytotoxicity survey on the production of ochratoxins and penicillic acid by *Aspergillus ochraceus* WILH. *Chem. pharm. Bull.*, **18**, 2259-2268.
- NESHEIM S., 1967. Note on ochratoxins. *J. Ass. off. anal. Chem.*, **50**, 370-371.
- NESHEIM A., 1969. Isolation and purification of ochratoxins A and B and preparation of their methyl and ethyl esters. *J. Ass. off. anal. Chem.*, **52**, 975-979.
- PURCHASE I. F. H., THERON J. J., 1968. The acute toxicity of ochratoxin A to rats. *Food Cosmet. Toxicol.*, **6**, 479-483.
- SASAKI M., KANEKO Y., OSHITA K., TAKAMATSU H., ASAO Y., YOKOTSUKA T., 1970. Studies on the compounds produced by molds. Part VII: Isolations of isocoumarin compounds. *Agric. biol. Chem.*, **34**, 1296-1300.
- SCHINDLER A. F., NESHEIM S., 1970. Effect of moisture and incubation time on ochratoxin A production by an isolate of *Aspergillus ochraceus*. *J. Ass. off. anal. Chem.*, **53**, 89-91.
- STARON T., ALLARD C., NGUYEN DAT X., CHAMBRE M. M., GRABOWSKI H., KOLLMAN A., 1965. Isolement de trois substances toxiques à partir de jus de culture et du mycélium d'un *Aspergillus ochraceus*. *Phytiatr. Phytopharm.*, **14**, 73-79.
- STEYN P. S., HOLZAPFEL C. W., 1967. The isolation of the methyl and ethyl esters of ochratoxins A and B, metabolites of *Aspergillus ochraceus* WILH. *J. S. afr. chem. Inst.*, **20**, 186-189.
- TRENK H. L., BUTZ M. E., CHU F. S., 1971. Productions of ochratoxins in different cereal products by *Aspergillus ochraceus*. *Appl. Microbiol.*, **21**, 1032-1035.
- VAN DER MERWE K. J., STEYN P. S., FOURIE L., 1965. Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A, B, C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* WILH. *J. chem. Soc.*, 7083-7088.
- VAN WALBEEK W., SCOTT P. M., THATCHER F. S., 1968. Mycotoxins from food borne fungi. *Canad. J. Microbiol.*, **15**, 1281-1285.
- YAMAZAKI M., MAEBAYASHI Y., MIYAKI K., 1970. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* isolated in Japan from moldy rice. *Appl. Microbiol.*, **20**, 452-454.