Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V.

25. Mykotoxin-Workshop

19. - 21. Mai 2003

Kongresshalle, Berliner Platz 2, D-35390 Giessen

Programm
Kurzfassungen/Abstracts
Teilnehmerverzeichnis

Organisation:

Professur für Milchwissenschaften
Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
Fachbereich Veterinärmedizin
Justus-Liebig-Universität Giessen

&

Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V.

GMF

JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIESSEN

25. Mykotoxin-Workshop 19.-21.5.2003

Kongresshalle, Berliner Platz 2, D-35390 Giessen

Organisation:

Professur für Milchwissenschaften
Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
Fachbereich Veterinärmedizin
Justus-Liebig-Universität
Ludwigstrasse 21, D-35390 Giessen

&

Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V.

Vorträge

Montag, 19.5.2003

Beginn: 10:00 Uhr

10:10 Gareis M (Kulmbach): 25 Jahre Mykotoxin-Workshop - Rück- und Ausblick

10:40 Wolff J (Detmold): DON- und ZEA-Gehalte in Weizen, Roggen und Triticale: Ergebnisse aus der "Besonderen Ernteermittlung" 2001 und 2002

11:00 Kaffeepause

11:20 Taschan H, Dittmar F, Wenck C (Kassel): Ochratoxin A, Nivalenol, Deoxynivalenol und Zearalenon in Mehl aus Mittel- und Nordhessen

11:40 Ellner FM (Berlin): Nivalenol produzierende *Fusarium graminearum* Isolate von Winterweizen aus Deutschland

12:00 Oldenburg E, Höppner F (Braunschweig): Vorkommen von *Fusarium*-Toxinen in Silomais - aktuelle Daten, Bewertung, Minimierung

12:20 Mittagspause

13:20 Dänicke S, Döll S (Braunschweig): Zur Wirksamkeit von Detoxifikationsmitteln bei der Prävention von Fusariotoxikosen - eine kritische Bestandsaufnahme

13:40 Leitgeb R, Raffaseder C, Ruckenbauer P, Lemmens M, Böhm J, Wagner E, Krska R, Parich A (Wien): Einfluss von Fusarientoxinen auf die Mast- und Schlachtleistung von Broilern und Puten

14:00 Pettersson H, Eriksen GS (Uppsala): Absorption, metabolism and excretion of type-B trichothecenes in pigs

14:20 Döll S, Dänicke S, Ueberschär KH, Valenta H, Flachowsky G (Braunschweig): *Fusarium*-Toxin Rückstände in physiologischen Proben von Ferkeln

14:40 Posterpräsentation

16:20 Böhm J, Razzazi E (Wien): Fütterungseinfluss von DON-belastetem Weizen bei Ferkeln

16:40 Dänicke S, Valenta H, Döll S (Braunschweig): Zur Toxikokinetik und zum Metabolismus von Deoxynivalenol beim Schwein

17:00 Drochner W, Götz S, Schollenberger M, Lauber U, Piepho HP, Klobasa F, Weiler U (Stuttgart): Einfluss niedriger DON-Belastungen auf den IGA-Blutspiegel beim wachsenden Schwein

17:20 Jadamus A, Schneider D (Berlin): Langzeitwirkung von Fusarientoxinen auf Gesundheitsstatus und Reproduktionsleistung bei Sauen

17:40 Dänicke S, Swiech E, Buraczewska L, Ueberschär KH (Braunschweig): Zur Toxikokinetik und zum Metabolismus von Zearalenon beim Schwein

Ab ca. 19:15 Gemeinsames Abendessen im Giessener Brauhaus

Dienstag, 20.5.2003

Beginn: 09:00 Uhr

09:00 Dänicke S, Matthäus K, Lebzien P, Valenta H, Ueberschär KH (Braunschweig): Zum Einfluss von *Fusarium*-Toxinen auf die Pansenfermentation und den Nährstoffumsatz im Pansen von Kühen

09:20 Sefer D, Nedeljkovic Trailovic J, Sinovec S, Sinovec Z (Belgrad): Reclamatory processes in liver and kidney of broilers exposed to short term of acute poisoning with T-2 and ochratoxin

09:40 Razzazi E, Tassaneeyakul W, Böhm J, Nuryono N (Wien): Die Mykotoxinproblematik in Südostasien

10:00 Otteneder H, Gabel B (Trier): Ochratoxin A in Kaffee - Vergleichende Auswertung bundesweiter Daten der Jahre 1995 - 1999 und 2000 - 2002

10:20 Seefelder W, Knecht A, Goßmann M, Kleta S, Büttner C, Humpf HU (Münster): Vorkommen von Fumonisinen in Spargel und Knoblauch aus Deutschland

10:40 Kaffeepause

11:00 Sauvant C, Holzinger H, Gekle M (Würzburg): Die mitogen aktivierte Proteinkinase ERK stellt einen zentralen Schutzmechanismus gegen Ochratoxin A Toxizität im proximalen Tubulus der Niere dar

11:20 Degen GH, Blaszkewicz M, Lektarau Y, Grüner C (Dortmund): Ochratoxin A Analysen im Blut von Arbeitnehmern in der Abfallwirtschaft

11:40 Föllmann W, Lebrun S (Dortmund): Aufnahme und genotoxische Effekte von Ochratoxin A in kultivierten Harnblasenepitelzellen des Schweins

12:00 Köhler H, Heller M, Erler W, Müller G (Jena): Effekte einer Langzeitexposition mit OTA oder OTC auf Funktionen einer humanen Monozyten-Zelllinie

12:20 Mittagspause

13:20 Blank R, Rolfs JP, Südekum KH, Frohlich AA, Marquardt RR, Wolffram S (Kiel): Einfluss des Kraftfutter-Rauhfutter-Verhältnisses in der Ration auf Abbau und Absorption von Ochratoxin A beim Schaf

13:40 Pühringer S, Razzazi E, Iben C, Böhm J, Kübber-Heiss A (Wien): Untersuchungen zum Vorkommen von Ochratoxin A in Katzennieren und in Katzenfuttermitteln

14:00 Fuchs E, Handl J, Rabus B, Binder EM (Herzogenburg): Typ A Trichothecene - Analyse mittels LC-MS sowie Verbreitung in österreichischem Mais und Hafer

14:20 Kos G, Lohninger H, Krska R (Tulln): Beurteilung chemometrisch ausgewerteter Infrarot Spektren zur Bestimmung von Deoxynivalenol in Mais

14:40 Jansen C, Stein E, Fensch R, Kogel KH (Gießen): Strategien zur Kontrolle von Fusarium in Getreide

15:00 Meyer G, Feldmann T, Oerke EC, Steiner U, Oertel B, Dehne HW (Bonn): Diversität der *Fusarium*-Arten an Weizen und Analytik des Mykotoxinspektrums

15:20 Kaffeepause, Posterpräsentation

16:00 Mitgliederversammlung der Gesellschaft für Mykotoxinforschung

Ab ca. 17:45 Gemeinsamer Ausflug Schloss Braunfels und Abendessen

---

Mittwoch, 21.5.2003

Beginn: 09:00 Uhr

09:00 Birzele B, Prange A (Bonn): *Fusarium*-Besatz in suboptimal gelagertem Weizen: I. Kultureller und Multiplex-PCR-Nachweis von *Fusarium* in Bezug zum Deoxynivalenol-Gehalt

09:20 Prange A, Birzele B (Bonn): *Fusarium*-Besatz in suboptimal gelagertem Weizen: II. XANES-Spektroskopie als methodischer Ansatz zur Charakterisierung des Einflusses von Schimmelpilzen auf die Schwefel-Speziation im Weizenkleber und die Backqualität

09:40 Mitterbauer R, Weindorfer H, Bachman H, Safaie N, Krska R, Adam G (Wien): Konstruktion und mögliche Anwendungen eines Hefe-Bioassays für Zearalenon

10:00 Müller M, Tauschke M (Paulinenaue): Toxinbildungsvermögen der Gattung *Alternaria* unter Laborbedingungen und auf dem Feld

10:20 Meyer K, Mohr A, Notzon A, Pfaffl M, Meyer HHD, Bauer J (Freising): Mykophenolsäure - Einfluss auf die Tiergesundheit und Rückstände in Lebensmitteln

10:40 Kaffeepause

11:00 Schmidt S, Thielert G (Sigmaringen): Bestimmung von Citrinin in Lebensmitteln

11:20 Schatzmayr G, Heidler D, Fuchs E, Mohnl M, Täubel M, Loibner AP, Braun R, Binder EM (Herzogenburg): Untersuchung verschiedener Hefestämme zur Entgiftung von Ochratoxin A

11:40 Krska R (Tulln): Entwicklung von zertifizierten Kalibrationslösungen für die DON und ZON-Analytik

12:00 Stroka J, Spanjer M, Buechler S, Barel E, Anklam E (Geel): Neue Ansätze bei der Probenahme von Mykotoxinen

12:20 Verabschiedung, Schlussworte

Ende der Veranstaltung ca. 12:30

Posterbeiträge

01 Buttinger G, Krska R (Tulln): B-trichothecene analysis by HPLC-FLD and post column derivatisation

02 Czerwiecki L, Wilczynska G (Warsaw): Determination of deoxynivalenol in cereals by HPLC-UV

03 Dänicke S, Valenta H, Goyarts T, Razzazi E, Böhm J (Braunschweig): On the effect of increasing deoxynivalenol (DON) concentrations in pig feed on growth performance and utilization of nutrients and of DON

04 Döll S, Dänicke S, Schnurrbusch U(Braunschweig): The effect of increasing concentrations of *Fusarium* toxins in diets for piglets on histological parameters of the uterus

05 Curtui V, Seidler C, Dietrich R, Märtlbauer E, Schneider E, Usleber E (Giessen): Bestimmung von Deoxynivalenol in Brot und Bier

06 Grajewski J, Twaruzek M, Miklaszewska B, Lamkiewicz K, Wozniak A, Böhm J (Bydgoszcz): Schimmelpilze und Mykotoxingehalt in Lebens- und Futtermitteln in Polen im Jahr 2001/2002

07 Macri A, Schollenberger M, Dancea Z, Drochner W (Stuttgart): Zearalenone and ergosterol contents in corn samples of Romania

08 Dancea Z, Baba AI, Virginia M, Catoi C, Macri A, Drochner W, Schollenberger M (Cluj-Napoca): A survey of the occurrence of fungi with mycotoxic potential in grain of Transilvania

09 Gutzwiller A, Glauser W, Gafner JL (Posieux): *Fusarium* mycotoxins in cereals grown in Switzerland

10 Gümüs T, Arici M, Demirci M (Tekirdag): Vorkommen von Ochratoxin A in Gerste, Malz und Bier in der Türkei

11 Mitterbauer R, Heinrich M, Rauscher R, Lemmens M, Bürstmayr H, Adam G (Wien): Trichothecenresistenz in Weizen: Entwicklung molekularer Marker für PDR (pleiotropic drug resistance) Gene

12 Kirchheim U, Hartung H, Herold L, Meixner B (Jena): Fusarientoxine in Thüringer Getreide, Getreideerzeugnissen sowie Futtermitteln - Ergebnisse des Jahres 2002

13 Laser H, Opitz von Boberfeld W, Wöhler K, Wolf D (Gießen): Effects of the botanical composition and weather conditions on mycotoxins in winter forage from grassland

14 Mainka S, Dänicke S, Wolff J, Böhme H, Flachowsky G (Braunschweig): Zum Einfluss von Mutterkorn im Futter auf die Wachstumsleistung von Absetzferkeln und Masthähnchen

15 Schollenberger M, Müller HM, Drochner W (Stuttgart): Deoxynivalenolgehalte in Lebensmitteln aus konventioneller und ökologischer Produktion

16 Brockmeyer A, Thielert G (Sigmaringen): Mykotoxine in Hartweizen

17 Meister U (Bergholz-Rehbrücke): Fusarientoxine im Brotgetreide des Landes Brandenburg - Vergleich von integriertem und ökologischem Anbau, 2000-2002

18 Meister U (Bergholz-Rehbrücke): Nachweis von Citrinin in OTA-haltigen Produkten mit einer neu entwickelten HPLC-Methode

19 Shehata S, Richter W, Schuster M, Lindermayer H (Poing): Effect of deoxynivalenol (DON) on growing pigs and its modification by modified yeast cell wall or modified yeast cell wall and bentonite

20 Rosenkranz C, Böhm J, Panholzer N, Leitgeb R (Wien): Morphologische Untersuchungen von Putenherzen nach Aufnahme von Fusarientoxinen durch das Futter

21 Trif R, Trif A, Pantiru C, Muselin F (Timisoara): Researches regarding the immunotoxic effect of T-2 toxin on cellular and humoral effectors

22 Valenta H, Dänicke S, Döll S (Braunschweig): Bestimmung von Deoxynivalenol und De-epoxy-Deoxynivalenol in tierischen Geweben mit HPLC nach IAC-Clean-up

23 Meyer K, Mohr K, Bauer J, Horn P, Kovacs M (Freising): Rückstandsbildung von Fumonisin B_1 in porcinen Geweben

24 Vekiru E, Fuchs E, Schatzmayr G, Täubel M, Binder EM, Krska R (Tulln): Determination of fumonisins and hydrolyzed fumonisin B_1 in microbial culture media by LC/ESIMS

25 Freudenschuss M, Jaunecker G, Krska R (Tulln): Fumonisin B_1 - Isolation and analytical characterisation for the application as reference material

26 Ostry V, Skarkova V, Ruprich J (Brno): Occurrence of *Penicillium expansum* and patulin in apples as raw materials for processing of foods - case study

27 Ostry V, Skarkova V, Ruprich J (Brno): The experimental contamination of foodstuffs with the spores of toxigenic micromycetes and the production of mycotoxins

28 Parich A, Schuch Boeira L, Perez Castro S, Krska R (Tulln): Determination of moniliformin (MON) using SAX column clean-up and HPLC/DAD-detection

29 Häubl G, Freudenschuss M, Jaunecker G, Krska R (Tulln): Ochratoxin A- Isolation and analytical characterisation for the application as reference material

30 Engelhardt G, Kibler R, Arnold R, Verwied-Jorky S, Koletzko B (München): Die tägliche Aufnahme von Ochratoxin A über die Gesamtnahrung - Ergebnisse einer Duplikatstudie bei bayerischen Schulkindern

31 Zepnik H, Völkel W, Dekant W (Würzburg): Metabolism and toxicokinetics of the mycotoxin ochratoxin A in F344 rats

32 Nitsch S, Fuchs E, Schatzmayr G, Binder EM (Herzogenburg): Effects of dietary ochratoxin A on broiler chicken

33 Henikl S, Täubel M, Vekiru E, Fuchs E, Loibner AP, Braun R, Binder EM, Schatzmayr G (Tulln): Toxicity of ochratoxin A in a *Brevibacillus brevis* - growth inhibition assay

34 Berthiller F, Schuhmacher R, Freudenschuss M, Adam G, Krska R (Tulln): Synthesis of deoxynivalenol-glucosides and their characterization using a QTrap LC/MS/MS

35 Ostry V, Skarkova J (Brno): An HPTLC method for the determination of the mycotoxin zearalenone in cereal products

36 Kappenstein O, Klaffke HS, Mehlitz I, Tiebach R, Weber R (Berlin): Bestimmung von Zearalenon mittels LC-ESI-MS/MS (Tandem-Spektrometrie)

Vorträge

25 Jahre Mykotoxin-Workshop
Rück- und Ausblick

Manfred Gareis
Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, Bundesanstalt für Fleischforschung
E.-C. Baumannstr. 20, D-95326 Kulmbach

Die Mykotoxinforschung hat in Deutschland eine lange Tradition und kann auf eine mittlerweile lange und sehr erfolgreiche Geschichte zurückblicken. Der Ursprung der Mykotoxin-Workshops geht auf eine Initiative des damaligen Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten und seiner Bundesforschungseinrichtungen zurück: 1979 trafen sich Wissenschaftler, die sich mit dem noch jungen Gebiet der Mykotoxine beschäftigten, zu einem Diskussionsforum in der Bundesanstalt für Fleischforschung in Kulmbach – dem „1. Mykotoxin-Workshop". Nun findet 2003 in Gießen bereits der 25. Workshop statt. Aus diesem Workshop, der ursprünglich als Forum der Wissenschaftler des Bundesministeriums gedacht war, hatte sich bereits nach kurzer Zeit eine eigenständige Veranstaltung entwickelt, ein wissenschaftlicher Kongress weit über den Ressortforschungsbereich und deutsche Grenzen hinaus. Mit Teilnehmerzahlen von ca. 200 aus ganz Europa (und darüber hinaus) stellt der Workshop mittlerweile die weltweit größte jährliche Fachtagung im Bereich der Schimmelpilz- und Mykotoxinforschung dar.

Um den gestiegenen Anforderungen an die Ausrichtung eines derartigen Kongresses Genüge zu leisten, wurde 1997 in München die „Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V." gegründet und damit der Grundstein für eine weitgehend unbürokratische Durchführung der Workshops gelegt. Der „Brigitte Gedek-Wissenschaftspreis" für Mykotoxinforschung in Höhe von 10.000 €, der seit 2000 alle zwei Jahre von der Gesellschaft bei den Mykotoxin-Workshops vergeben wird, stellt einen der am höchsten dotierten deutschen Wissenschaftspreise dar. Darüber hinaus wird seit kurzem alle zwei Jahre das „Münchner Mykotoxin-Stipendium", ebenfalls in Höhe von 10.000 € an Nachwuchswissenschaftler vergeben.

Trotz der seit 1979 um das 10-fache gestiegenen Teilnehmerzahl hat der Mykotoxin-Workshop seinen ursprünglichen Charakter und ganz eigenen Charme bewahren können. Dies liegt zweifellos nicht nur an den speziellen Eigenschaften der Mykotoxinforscher, den wissenschaftlichen Beiträgen oder akzeptablen Teilnahmegebühren, sondern vor allem auch am stark interdisziplinären Charakter des Workshops sowie den Möglichkeiten der direkten und zwanglosen Kommunikation.

DON- und ZEA-Gehalte in Weizen, Roggen und Triticale: Ergebnisse aus der "Besonderen Ernteermittlung" 2001 und 2002

J. Wolff

Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung,
Institut für Biochemie von Getreide und Kartoffeln,
Schützenberg 12, 32756 Detmold

Jährlich wird nach dem Agrarstatistik-Gesetz die „Besondere Ernteermittlung" (BEE) durchgeführt. Die BEE erfasst die Getreidearten: Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Triticale und Mais. Die BAGKF in Detmold ermittelt nach §47 bei Getreide die Beschaffenheitsmerkmale, die eine Untersuchung der Inhaltsstoffe, der Verarbeitungseigenschaften und der Belastung mit Schadstoffen umfasst. Für die Ermittlung der Schadstoffe –hierunter sind Schwermetalle, Rückstände von Pflanzenschutzmitteln und Mykotoxine zu verstehen- werden Volldruschmuster aller Bundesländer (außer Stadtstaaten) untersucht. Die zu beprobenden Schläge wurden von den Statistischen Landesämtern ausgewählt. Von diesem statistisch bestimmten Musterkontingent, der Stichprobe, wird eine Unterstichprobe für die Untersuchungen auf Mykotoxine herangezogen. Die Anzahl der Muster pro Bundesland richtet sich nach dem Ernteaufkommen des vorangegangenen Jahres. Die auf Mykotoxine zu untersuchenden Getreidearten werden vom Sachverständigenausschuss zur Vorbereitung und Auswertung der Besonderen Ernteermittlung festgelegt, dem Vertreter der Landesämter für Statistik, der Ministerien für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, dem Statistisches Bundesamt, des BMVEL und der BAGKF-Detmold angehören.

Für die Bestimmung von Zearalenon (ZEA) und Deoxynivalenol (DON) sind zur Zeit noch keine validierten, allgemein anerkannten Analysenmethoden bekannt. Die Ergebnisse von Untersuchungen in verschiedenen Laboratorien können somit voneinander abweichen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen auf DON und ZEA werden für die Getreidearten Weizen, Roggen und Triticale für die Erntejahre 2001 und 2002 gemeinsam dargestellt.

Ein Vergleich der DON-Gehalte einiger Weizensorten gegenüber den Gehalten aller Muster zeigt Gehalte einzelner Sorten, die durch Anbaumethoden, Standort und Klima beeinflusst wurden und wie sich dazu die Einstufungen nach der Bundessortenliste verhalten. Die Einstufungen der Anfälligkeit gegenüber Fusarium durch die BBA erfolgt nach Inokulation auf dem Feld. Tendenzen der Anbauhäufigkeit einzelner Sorten gegenüber 2001 und der Einfluss der Vorfrucht werden angegeben.
Die Fusariumtoxine DON und ZEA kommen zu ca. 80 % gemeinsam vor, doch hohe Gehalte eines Toxins bedingen nicht zwangsläufig hohe Gehalte des anderen Toxins. Im Erntejahr 2002 wiesen 7 % der untersuchten Muster DON- und ZEA-Gehalte über den gesetzten Grenzen von 500 µg/kg bzw. 50 µg/kg auf, bei jeweils 6 % der Muster wird eine Grenze überschritten. Insgesamt liegen damit 19 % der Muster über den Grenzen.

Ochratoxin A, Deoxynivalenol, Nivalenol und Zearalenon in Mehl aus Mittel- und Nordhessen

H. Taschan, F. Dittmar, C. Wenck

Staatliches Untersuchungsamt Hessen, Druseltalstr. 67, 34131 Kassel

Einleitung

Ochratoxin A (OTA) wird von verschiedenen Aspergillusarten produziert. Die Bildung des Ochratoxin A wird vor allem durch Temperatur und Feuchtigkeit stark beeinflusst, so dass Cerealien bei den pflanzlichen Lebensmitteln als eine der wesentlichen Ochratoxin A -Quellen gelten.

Deoxynivalenol (DON) ist das am häufigsten vorkommende Fusarientoxin. Es entsteht, wenn die Ähren des Getreides von Fusarium graminearum befallen werden.

Nivalenol (NIVA) ist dem DON chemisch verwandt. Es enthält eine zusätzliche Hydroxylgruppe und wird hauptsächlich von Fusarium nivela, F. gramininearum und F. poae gebildet.

Zearalenon (ZEA) wird durch eine Reihe verschiedener Fusarien gebildet. Die Substanz besitzt eine ausgeprägte östrogene Wirksamkeit und wirkt anabolisch. Zearalenon kann im Stoffwechsel in alpha-Zearalenol umgewandelt werden, das eine höhere östrogene Wirksamkeit hat als Zearalenon.

Durch die Änderung der Kontaminantenverodnung der EU (Nr. 466/2001) wurden für OTA Grenzwerte (rohe Getreidekörner 5 µg/kg und Getreideerzeugnisse 3 µg/kg) festgesetzt. Für DON, NIVA und ZEA gibt es zur Zeit noch keine Grenzwerte. Es wird jedoch innerhalb der EU diskutiert, zumindest für DON einen Grenzwert festzusetzen.

Material und Methode

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bisher 136 Proben auf ihren Gehalt an Ochratoxin A, Deoxynivalenol Nivalenol und Zearalenon untersucht. Dabei handelte es sich hauptsächlich um Weizen- und Roggenmehle verschiedener Typen aus mittel- und nordhessischen Mühlenbetrieben bzw. Bäckereien.

Die Bestimmungen der hier genannten Mykotoxine erfolgten mittels HPLC.

Ergebnisse

Die bisher ermittelten minimalen und maximalen Mykotoxingehalte sowie die Mittelwerte der positiven Proben sind nachfolgend zusammengefasst.

Mykotoxin	n	Minimum	Maximum	Mittelwert
• OTA	113	<0,03	3	0,43
• ZEA	93	<1	49	10
• DON	136	<10	327	55
• NIVA	136	<10	50	23

Nivalenol produzierende *Fusarium graminearum* Isolate von Winterweizen aus Deutschland

Ellner, Frank M.
Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Ökotoxikologie und Ökochemie im Pflanzenschutz, Berlin

Die in den vergangenen fünf Jahren durchgeführten Untersuchungen zum Vorkommen von Fusarien und *Fusarium*-Toxinen in Getreide ergaben eine stetige Zunahme an Nivalenol (NIV) positiven Proben. Vor allem in Winterweizen der Jahre 2000 und 2001 waren Proben von verschiedenen Standorten mit bis zu 3,5 mg/kg NIV belastet. Besonders auffällig war, dass in einigen Proben NIV und Deoxynivalenol (DON) in äquivalente Mengen nachgewiesen werden konnte. Die weitere Charakterisierung dieser Proben ergab, dass weder eine Infektion mit *Fusarium Poae* noch mit *F. culmorum*, den hauptsächlich an Getreide vorkommenden NIV-Produzenten, vorlag. Neben verschiedenen Hefen und Alternaria konnte als potentieller Trichothecen-Bildner nur *F. graminearum* [*Gibberella zeae*] isoliert werden. Es ist bekannt, dass *F. graminearum* in unterschiedliche Chemotypen vorkommen kann, die in der Lage sind, entweder NIV oder DON zu bilden. In Europa ist der DON-Typ dominierend und es gibt nur wenige Hinweise auf *F. graminearum* als Ursache einer NIV Belastung in Weizen unter natürlichen Bedingungen.
Ungewöhnlich ist aber, dass NIV und DON in ein und derselben Probe in hohen Konzentrationen vorkommen, obwohl nur eine Infektion mit *F. graminearum* vorlag. Deshalb wurden mehrere Isolate von *F. graminearum* aus den Proben gewonnen und näher charakterisiert. Anhand morphologischer Merkmale sind die einzelnen Isolate nicht voneinander zu unterschieden aber hinsichtlich des Mykotoxinspektrums können sie mindestens zwei Gruppen zugeordnet werden. Eine Gruppe bildet auf Weizengries als Nährsubstrat DON und ZEA während Isolate der anderen Gruppe NIV und ZEA produzieren. In einzelnen Versuchen war bei Isolaten vom DON-Typ kein ZEA im Kulturmedium nachweisbar. Auch die Bildung der Vorstufen α- bzw. β-Zearalenol erfolgte nicht bei allen Isolaten gleichmäßig. Inwieweit hier eine weitere Differenzierung vorzunehmen ist, muss noch geklärt werden. Die Untersuchungen haben somit ergeben, dass unter natürlichen Bedingungen in Deutschland beide Chemotypen von *F. graminearum* gemeinsam in Winterweizen vorkommen und sowohl DON als auch NIV in relevanten Konzentrationen bilden können.

Vorkommen von Fusariumtoxinen in Silomais – aktuelle Daten, Bewertung, Minimierung

Elisabeth Oldenburg, Frank Höppner
Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Institut für Pflanzenbau und Grünlandwirtschaft, Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig

Silomais nimmt eine bedeutende Stellung im Ackerfutterbau ein. Die Anbaufläche von Silomais betrug in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2002 1,12 Mio. ha, die Jahreserzeugung liegt bei ca. 50 Mio. Tonnen als Grünmasse. Silomais wird als Ganzpflanze geerntet, gehäckselt und zu Gärfutter (Maissilage) verarbeitet und hat eine große Bedeutung in der Rinderfütterung (Bullenmast, Milchkühe). Der Anteil von Gundfutter (z.B. Maissilage) in einer Rinderration variiert zwischen 40 – 100% der Gesamtration.
Im Jahr 2000 wurden vom Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft Orientierungswerte für Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) im Rinderfutter herausgegeben, bei deren Unterschreitung die Gesundheit und Leistungsfähigkeit der Tiere nicht beeinträchtigt wird (Rind präruminierend 2,0 mg DON bzw. 0,25 mg ZON/ kg Futter, weibliches Aufzuchtrind/Milchkuh 5 mg DON bzw. 0,5 mg ZON/kg Futter, Mastrind 5 mg DON/kg Futter; bei 88 % Trockensubstanz).

Es wurde eine Erhebungsstudie zum Vorkommen von Fusariumtoxinen in Silomais zum Zeitpunkt der Ernte durchgeführt, um abzuschätzen, ob bzw. in welchem Ausmaß mit einer Überschreitung der Orientierungswerte in der praktischen Fütterung zu rechnen ist.
Dazu wurden im Rahmen eines Gemeinschaftsprojektes mit der Universität Kiel, dem Deutschen Maiskomitee, verschiedenen Länderdienststellen des Sortenprüfwesens sowie Maiszüchtungsunternehmen Silomais-Proben der Ernte 2000 (Sortenversuch an 11 Standorten in 6 Bundesländern) auf Deoxynivalenol und fallweise auf Zearalenon untersucht.
Von den insgesamt 196 Proben lagen 2,6 % über 5 mg DON/kg (88%TM) und 9,2 % über 2 mg DON/kg (88%TM). Mit zunehmenden Reifegrad des Silomaises stieg der Anteil an DON-positiven Proben von 34% (30% TM Erntegut) über 69% (35% TM Erntegut) auf 86% (40% TM Erntegut) deutlich an. Die Mittel- (um ca. 1 mg/kg TM) bzw. Maximalwerte (bis 12 mg/kg TM) der DON-positiven Proben lagen jedoch bei den drei Reifegrad-(TM)-Stufen in ähnlichen Bereichen.
Mit zunehmender Stängelfäule-Anfälligkeit der Sorten war ein ansteigendes Risiko zu höheren DON-Gehalten im Erntegut tendentiell erkennbar, jedoch scheinen weitere Faktoren das Infektionsgeschehen und die Toxinbildung zu beeinflussen.
Da beim Silomais Fusarientoxine häufig im unteren Stängelbereich bzw. den Blättern angereichert werden, wurde am Standort der FAL zudem untersucht, inwieweit durch unterschiedliche Schnitthöhen bei der Ernte DON-haltige Pflanzenteile auf dem Feld zurückgelassen und somit aus dem Ernteprodukt herausgehalten werden können. Eine Anhebung der Schnitthöhe von 20 auf 40 cm führte zu einer durchschnittlichen Reduzierung der DON-Gehalte im Erntegut von ca. 40%.

Zur Reduzierung des Fusariumtoxin-Risikos beim Silomais wird empfohlen, die Ernte nicht über den optimalen TM–Bereich von 30-35 % zu verzögern, möglichst gegen Stängelfäule widerstandsfähige Sorten zu wählen und die Schnitthöhe bei der Ernte zu erhöhen.

On the efficacy of detoxifying agents in the prevention of fusariotoxicoses – A critical evaluation of the situation

S. Dänicke, S. Döll

Institut für Tierernährung, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Bundesallee 50, 38116 Braunschweig
e-mail: sven.daenicke@fal.de

The Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) are of practical relevance in animal feeding since they might occur in concentrations which can affect health and performance of farm animals. For this reason, the former German Ministry of Nutrition, Agriculture and Forestry published orientation values for critical dietary concentrations of DON and ZON which should not be exceeded in order to avoid detrimental effects in animal production (BML, 2000).
On the other hand, many attempts have been made to search for detoxification of contaminated feedstuffs or diets in order to cope with the problem.
The use of detoxifying agents which are added to the diet as dry supplements became quite popular, especially in so-called "Fusarium-years", whereas technical treatments of contaminated feedstuffs prior feeding are rarely used mainly because of their high costs.
Detoxifying agents are supposed to detoxify the contaminated feedstuff during the passage through the digestive tract by adsorbing and/or degradation of mycotoxins under the pH-, temperature- and moisture-conditions of the digestive tract. Active components of such agents are, for example, several clay minerals, yeast cell wall components or micro-organisms. The mode of action of such agents sounds promising and in vitro-results seem to be convincingly. However, their efficacy in avoiding toxic effects in animals is often not tested or proven, or inadequately proven. In order to be in accordance with the guidelines of the Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN, 1999) the efficacy has to be proved by using an experimental design justified according to the claim for the use of the additive. Consequently, in the animal studies parameters need to be examined which clearly demonstrate the effects which are claimed for the detoxifying agents. For example, if adsorption or degradation of DON within the digestive tract is claimed for a given agent, whereby absorption by the body and consequently toxic effects are avoided, then it is necessary to demonstrate this effect by comparative blood profiles of the toxin in the absence and presence of the detoxifying agent in a DON-containing diet. Reviewing to the literature, such demands are fulfilled by only a few studies which demonstrated no measurable detoxifying effects so far. Most other in vivo studies were limited to the record of performance parameters only. Moreover, only 3 experimental groups were tested in most cases, namely a positive toxin-free control group, a negative toxin-exposed control group and a detoxifying agent and toxin-exposed group. In the view that performance parameters are rather non-specific and that detoxifying agents as feed additives might exert unspecific effects as well, such an incomplete experimental design is not suited to prove the efficacy according to the claim since unspecific effects of the agent might also occur in toxin-free control groups.
Since mycotoxin-specific effects were tested only in a few cases, the literature was evaluated for the effects of detoxifying agents on pig and poultry performance only. The majority of the experiments did not demonstrate preventive effects. Therefore, it is concluded that testing of currently available detoxifying agents did not follow the SCAN-guidelines since the claim for their use was not proven.

Einfluss von Fusarientoxinen auf die Mast- und Schlachtleistung von Broilern und Puten

Rudolf Leitgeb[1], Christian Raffaseder[1], Peter Ruckenbauer[2], Marc Lemmens[2], Josef Böhm[3], Elisabeth Wagner[3], Rudolf Krska[4] und Alexandra Parich[4]

1 Universität für Bodenkultur, Inst. für Nutztierwissenschaften, A-1180 Wien
2 Universität für Bodenkultur, Inst. für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, A-1180 Wien
3 Veterinärmedizinische Universität, Inst. für Ernährung, A-1210 Wien
4 Universität für Bodenkultur, IFA-Tulln, Abt. Analytikzentrum, A-3430 Tulln

Einleitung

Mikroorganismen sind die Hauptverursacher des Futtermittelverderbs. In den vergangenen 10 Jahren wurden die Mykotoxine als Hauptverursacher von Leistungsdepressionen und Immunschwächen angesehen. Häufig lagen den Zuordnungen eher Vermutungen als Beweise zugrunde. Die Fusarien sind den gemäßigten Klimazonen Europas gut angepasst. Lange Vegetationszeiten und feucht-kaltes Wetter bei der Abreifung fördern das Wachstum der Fusarien und die Mykotoxinbildung.

Der gegenständliche Beitrag basiert auf vier Versuchen. Ein Broiler- und Putenversuch wurden mit natürlich kontaminiertem Futtermais und ein Broiler- und Putenversuch mit Fusarium subglutinans inokuliertem Futtermais durchgeführt.

Versuchsdurchführung

Alle vier Versuche wurden im Geflügelversuchsstall, Äussere Wimitz 3, A-9311 Kraig, durchgeführt. Im ersten Broilerversuch mit 4 Futtergruppen (FG) wurden 54,66 % des unkontaminierten Maises sukzessive durch 0/3, 1/3, 2/3 und 3/3 kontaminierten Mais (9,8 ppm DON, 1,04 ppm MON, 1,43 ppm BEA) und im zweiten Broilerversuch mit ebenfalls 4 FG wurden von den 59,3 % des unkontaminierten Maises 0, 5, 10 und 15 % durch kontaminierten Mais (18,3 ppm MON und 84,4 ppm BEA) ersetzt.

Im ersten Putenversuch betrug der Maisanteil in den Phasenfuttermischungen (PF) 1, 2 und 3 37, 49 und 59 %. In den FG 1, 2, 3 und 4 wurden 0, 1/3, 2/3 und 3/3 des unkontaminierten Maises durch kontaminierten Mais (4,94 ppm MON, 3,24 ppm BEA und 2,02 ppm DON) ersetzt. Im zweiten Putenversuch waren in den PF 1, 2 und 3 38, 50 und 57 % Mais enthalten. In den PF der FG 1, 2, 3 und 4 wurden 0, 3, 6 und 9 % unkontaminierter Mais durch 0, 3, 6 und 9 % kontaminierten Mais (26,22 ppm MON und 27,62 BEA) ersetzt.

Als Leistungsparameter wurden die Mast- und Schlachtleistung, Organgewichte, Schlachtkörper-, Mykotoxinrückstands- und Blutanalysen erhoben.

Versuchsergebnisse

Entgegen allen Erwartungen zeigten die Tiere nur minimale Reaktionen auf die unterschiedlichen Mykotoxingehalte in den Futtermischungen. Die Ausfälle waren in allen 4 Versuchen gering. In den Schlachtkörpern konnten keine Mykotoxinrückstände nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Versuche weisen darauf hin, dass der Verdauungstrakt des Geflügels anscheinend ein vollfunktionsfähiger Filter für Fusarientoxine ist und weitestgehend fusarientoxinfreie Lebensmittel garantiert.

Danksagung

Für die finanzielle Unterstützung des ersten Hühner- und Putenversuches wird dem BM für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft, Wien und für die finanzielle Unterstützung des zweiten Hühner- und Putenmastversuches der Universität für Bodenkultur Wien, aufrichtig gedankt.

Absorption, metabolism and excretion of type-B trichothecenes in pigs

Hans Pettersson, Gunnar Sundstøl Eriksen
Department of Animal Nutrition and Management, Swedish University of Agricultural Sciences, P. O. Box 7024, SE-750 07 Uppsala, Sweden

Deoxynivalenol (DON) and nivalenol (NIV) are common type-B trichothecenes in European cereals. Their toxicity and risk assessments are dependent on their absorption, metabolism and excretion, which may differ between animals. The epoxy-group in their chemical structure is important for their toxicity. A de-epoxidation activity has been found in intestinal contents from pigs in certain studies but has been lacking in others. During a feeding study with NIV to pigs the de-epoxidation activity appeared in faeces after feeding the pigs for 1-2 weeks. It was assumed that exposure to trichothecenes could induce the activity and be a marker for trichothecene exposure. Pigs from farms in the surroundings of Uppsala were later investigated for the faecal de-epoxidation ability. Pig's faeces from all farms, except two experimental farms had the ability. They had also a high capacity to de-acetylate 3acetylDON. Experimental pigs without de-epoxidation activity were fed DON contaminated feed for 7 weeks without acquiring the de-epoxidation activity. They were then exposed to faeces from sows, which already had the ability and acquired the de-epoxidation ability within a week.

Most of the pigs lacking the de-epoxidation activity have been from experimental farms. It is possible that pigs in most ordinary farms normally have this de-epoxidation activity, since the ability easily can be transferred between pigs kept together.

Absorption, metabolism and excretion of the type-B trichothecenes were studied in separate feeding trials with 2.5 ppm of either NIV or 3ADON to pigs. Blood, urine and faeces were collected. Faeces from pigs fed 3ADON had the ability to de-epoxidise trichothecenes before the feeding study, while those fed NIV lacked the ability. Both NIV and DON were rapidly absorbed into the blood and the max concentration was reached after approx. 3 hours. The max concentration was nearly 10 times higher in the pigs fed 3ADON (44-64 ng DON/ml) than in those fed NIV (3-6 ng/ml). The absorption of NIV continued during a longer period than for DON. Most of DON disappeared from the blood within 8 hours, while NIV accumulated in the blood with feeding days. The apparently slower absorption of NIV compared to DON may be a result of NIV being more polar. No glucuronide conjugates could be detected in blood from pigs fed NIV while 42% of the DON was glucuronide conjugate in pigs fed 3ADON. De-epoxy metabolites could neither be found in the blood of NIV nor 3ADON fed pigs.

A high portion (32-33%) of NIV and most of DON were excreted into the urine. Between 20 and 87 % of the total 3ADON fed to the animals was recovered as DON and its glucuronide conjugate in the urine. A little more than 50 % of DON excreted in the urine was glucuronide conjugated, while no glucuronide conjugate of NIV could be found in urine from pigs fed NIV. No de-epoxy metabolite of neither NIV nor DON could be found in the urine. Low concentrations and amounts (0.2-1 %) of DON were found in faeces, while up to 68 % of the recovered NIV was found in faeces. The de-epoxy metabolite of DON (0.6-0.9 %) was also found in faeces, while no de-epoxy metabolite of NIV were found in faeces from the NIV fed pigs.

The lack of de-epoxy DON in blood and urine of pigs indicates that the metabolite is not absorbed from the intestine. It could be that the de-epoxidation activity is mainly in the lower intestine, where the absorption normally is low. This means that this metabolism will have low influence on the toxicity of the trichothecenes.

Fusarium toxin residues in physiological samples of piglets

(*Fusarium*-Toxin Rückstände in physiologischen Proben von Ferkeln)

Susanne Döll, S. Dänicke, K.-H. Ueberschär, Hana Valenta and G. Flachowsky
Institut für Tierernährung, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Bundesallee 50, 38116 Braunschweig

Fusarium toxins, especially deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON), are common contaminants of feedstuffs. Especially pigs react most sensitive to these mycotoxins, whereas DON may lead to decreased feed intake and may modulate the immune response and ZON may cause reproductive disorders. Since these symptoms are rather unspecific, the diagnosis of *Fusarium* toxin toxicosis is difficult and often controversial. Feedstuff analysis may not represent the exposure of the animal since the toxins are unevenly distributed within the batch. Furthermore, other sources of mycotoxins such as bedding material contribute to the overall mycotoxin exposure of the animal. Attempts have been made to use mycotoxin concentrations of physiological samples for diagnostic purposes but little data on the *Fusarium* toxin concentrations in such samples from experiments feeding practically relevant concentrations are available.

The concentrations of *Fusarium* toxins was investigated in physiological samples of 100 piglets fed diets containing 0.01, 0.06, 0.15, 0.22 and 0.42 mg ZON and 0.2, 0.8, 1.0, 1.9 and 3.9 mg DON per kg, respectively. The contamination of the diets was achieved by the inclusion of 0, 6, 12.5, 25 and 50% contaminated maize at the expense of control maize in the diet. The piglets were housed in pens (5 piglets per pen, 4 pens per treatment group) with *ad libitum* access to feed and water. After the feeding period of 35 ± 1.5 days (12.4 ± 2.2 kg to 32.5 ± 5.6 kg LW) the animals were slaughtered on 4 consecutive days. To standardize and document the last feed intake the feed was withdrawn from the animals 16 hours prior slaughtering for 12 hours after which the piglets had 1 hour access to feed again. Samples of blood, liver, bile fluid and urine were taken for mycotoxin analysis 3-4 hours after the feeding. Urine samples were pooled per group since limited number of samples were available. ZON and its metabolites were analysed by HPLC with fluorescence detection and DON and de-epoxy-DON using HPLC with DAD.

ZON and its metabolites could be detected in bile fluid samples of all feeding groups with increasing mean concentrations of 59, 134, 193, 269 and 575 ng ZON plus metabolites/g corresponding to the increasing ZON concentrations in the diets of the respective groups. In liver samples, low concentrations of ZON and α-ZOL could be detected for all groups from which a carry over factor (total liver concentration of ZON plus α-ZOL divided by the dietary ZON concentration) of 0.02 could be calculated. In the pooled samples of urine increasing concentrations of ZON and α-ZOL could be detected as well while in serum samples neither ZON nor its metabolites could be detected.
The concentrations of DON in the serum were strongly related to the amount of DON consumed 3-4 hours prior slaughtering. The mean concentrations were 0, 1, 5, 6, and 11 ng/ml for the groups receiving 0.2, 0.8, 1.0, 1.9 and 3.9 mg DON/kg diet. The DON concentrations in the bile fluid were characterized by a high variation. Values in the feeding group receiving 50% contaminated maize in the diet ranged from below detection limit to 56 ng/ml while the values for the group receiving no contaminated maize in the diet ranged from below detection limit to 36 ng/ml. The highest concentrations of DON were found in the pooled urine samples where the metabolite de-epoxy-DON was detected as well.

Fütterungseinfluss von DON-belastetem Weizen bei Ferkeln

J.Böhm, E. Razzazi

Institut für Ernährung / Veterinärmedizinische Universität Wien

Schweine scheinen besonders empfindlich gegenüber DON im Futter zu reagieren. Die klinischen Auswirkungen werden folgendermaßen beschrieben: Appetitverlust, verminderte Fresslust, geringere Futteraufnahme, Futterverweigerung und letztlich Erbrechen nach Futteraufnahme. Durch das verzögerte Wachstum verursacht DON einen hohen wirtschaftlichen Verlust.
Die von uns durchgeführten Fütterungsversuche sollten die Auswirkungen einer hohen kurzfristigen und einer mittleren längeren DON-Belastung in der Ferkelaufzucht aufzeigen und die Diskussion über DON-Richtwerte im Futter anregen.
Eine Weizenration mit 7,7 mg DON je kg Futter wurde eine Woche lang an drei Edelschweinwürfe mit einem Absetzalter von 3, 4 und 5 Wochen ad libitum verfüttert. In einem weiteren Versuch wurden jeweils 15 fünf Wochen alte männlich kastrierte Absetzferkel der Rasse Deutsches Edelschwein / Pietrain acht Wochen lang mit einer natürlichen DON- Dosierung von 3 mg pro kg in der Versuchsgruppe und einem nichtbelasteten Futter in der Kontrolle gefüttert. An Blutparametern wurden im vierwöchigen Abstand untersucht: Alk. Phosphatase, GammaGT, GLDH, GOT. Weiters wurden Immunparameter wie CRP, Haptoglobin, Neopterin und ImmunglobulinG bestimmt. Im Zuge der drei Kurzversuche mit Konzentrationen von 7,7 ppm DON in der Ration konnten bei den abgesetzten Ferkeln keine klinisch auffälligen Symptome wie Erbrechen oder Futterverweigerung beobachtet werden. Als bemerkenswertes Resultat war in den Kurzversuchen die Beobachtung gemacht werden, dass die Tiere mit den geringeren Körpermassen relativ besser zunahmen. Dieser Effekt konnte nach der ersten Woche des Ferkelaufzuchtversuches wiederholt beobachtet werden. Bereits nach drei Wochen konnte ein signifikanter Unterschied in den Zunahmen zwischen der Versuchsgruppe mit 3 mg DON/ kg Futter und der Kontrollgruppe beobachtet werden, die eine um 0,5 kg höhere Körpermasse aufwiesen. Nach sechswöchiger Fütterung hatte die mit DON gefütterte Versuchsgruppe bereits eine um 3 kg und nach acht Wochen um 4 kg geringere Körpermasse. Die Tiere der Kontrollgruppe wogen am Versuchsende nach achtwöchiger Fütterung 49,8 kg und die des Versuchs 45,7 kg. Der Futterverzehr war in der Versuchsgruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren zwischen 4 und 19 % reduziert. Die Kontrollgruppe (n=13) verzehrte gesamt an die 1203 kg und die Versuchsgruppe (n=15) 1210 kg an losem Aufzuchtfutter. Der Futteraufwand (kg Futterverzehr pro kg Zuwachs) war in der Versuchsgruppe durchschnittlich um ca. 3 % besser. Die in vierwöchigen Intervallen untersuchten Blutproben wiesen bei den untersuchten Parametern der Leberenzyme und der Entzündungs- und Belastungsparametern keine Unterschiede auf.
Im Rahmen dieser Arbeit konnte die wirtschaftliche Bedeutung des Mykotoxins Deoxynivalenol gezeigt werden. Die Wirtschaftlichkeit wurde durch verlängerte Aufzuchtzeiten wegen geringerer Tageszunahmen bei DON belasteten Ferkeln beeinträchtigt. Paradoxe leistungssteigernde Kurzzeiteffekte einer hohen DON-Dosierung konnten bei besonders kleinen Ferkeln unmittelbar nach der Absetzphase beobachtet werden.
Der in Österreich empfohlene Richtwert von maximal 0,5 mg DON/kg Futter für Schweine kann als angemessen angesehen werden.

On the toxicokinetics and the metabolism of deoxynivalenol in the pig

S. Dänicke, H. Valenta, S. Döll

Institut für Tierernährung, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Bundesallee 50, 38116 Braunschweig, e-mail: sven.daenicke@fal.de

Pigs respond quite sensitive to the presence of deoxynivalenol (DON) in the diet among other farm animals. DON is metabolized to de-epoxy-DON which is not any longer regarded as a toxic compound and several studies have shown that microbes of the digestive tract of pigs are capable for this detoxifying reaction. However, only a little is known on the metabolism of DON when it passes the digestive tract of the pigs. Hence, the aim of the present study was to follow the DON-passage through subsequent segments of the digestive tract and in the blood with special consideration of the occurrence of de-epoxy-DON by a comparative slaughter technique.

Eleven male castrated pigs weighing 88.1kg±3.9kg on average were adapted to a DON-containing diet (4.2 mg DON/kg) over a period of 7 d. Feed was given restrictively at an amount of 1.1 kg per meal (2 meals per day) to ensure that all pigs consumed the same amount within a short period of time (approximately 10 min). Diet was provided as a coarse meal and mixed with approximately the double amount of water in the trough just before feeding. At the day of measurement, all pigs were slaughtered at different time intervals after the DON-containing morning meal (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 15, 18 and 24 h after feeding) with the exception of one pig which was slaughtered unfed.

Pigs were electrically stunned and subsequently killed by cutting the neck blood vessels. Mixed trunk blood was collected and prepared for serum. Carcasses were quickly dissected and the digestive tract distal from the oesophagus was partitioned in the following digesta sampling sites: stomach, small intestine divided into 3 segments of a similar length, caecum, colon and rectum. Digesta of each segment was quantitatively collected, frozen and subsequently freeze dried. All specimens were analyzed for DON and de-epoxy-DON according to Valenta et al. (this issue). Data were expressed as toxin amounts (toxin concentrations multiplied by digesta amount and corrected for dry matter) relative to toxin intake.

Gastric emptying of dry matter and of DON was characterized by a first order kinetics and the half-lifes were estimated at 4.8 h and 1.8 h, respectively. The much more rapid stomach passage of DON might indicate that DON probably emptied with the liquid phase of the diet. The decrease in the DON-amounts of the stomach coincided with a rapid increase of DON-amounts entering the small intestine 1. After reaching a maximum peak at 3.4 h corresponding to a very small fraction of the ingested DON-amount of less than 1 %, the DON-amount remaining in this segment started to decline and reached the baseline level after approximately 15 h. A similar time-concentration shape was observed for the serum with a maximum peak concentration at 4.1 h. De-epoxidation of DON was detected in the small intestine 2 and 3 although at a limited extent whereas de-epoxy-DON amounted approximately 80 % of the sum of DON and de-epoxy-DON in the large intestine (caecum, colon, rectum) where no time-dependent changes in the recovered DON-amounts were observed.

The results make clear that the majority of the ingested DON is quickly and nearly completely absorbed in the proximal part of the small intestine. De-epoxidation takes place mainly in the large intestine and does probably not much contribute to a detoxification in the pig.

Moreover, detoxifying agents which are supposed to adsorb or degrade DON need to be effective under the physiological conditions in the stomach and the duodenum within a very limited period of time.

Einfluß niedriger DON-Belastungen auf den IgA-Blutspiegel beim wachsenden Schwein

W. Drochner, S. Götz, M. Schollenberger, U. Lauber, H.-P. Piepho*, F. Klobasa** und U.Weiler***

Institut für Tierernährung der Universität Hohenheim,
*Professur Biostatistik der Universität Hohenheim,
**Forschungsanstalt für Landwirtschaft , Mariensee/Neustadt,
*** Institut für Tierzucht und Tierhaltung, Universität Hohenheim

In einem Belastungsversuch wurde die Wirkung reinen Deoxynivalenols (DON) , das speziell für diesen Versuch isoliert wurde, geprüft. Für den Versuch standen 36 weibliche Absetzferkel in einem 4x 9 Versuchsdesign, angelegt nach dem lateinischen Quadrat, zur Verfügung. Neben einer Kontrolle wurden Dosierungsstufen von 300, 600 und 1200 Mikrogramm DON pro kg Futtermittel eingesetzt.

Die Diät wurde getreidefrei konzipiert, die Nährstoffversorgung entsprach den Empfehlungen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. Zur Überprüfung physiologischer Reaktionen auf praxisrelevante Dosierungen reinen DONs wurden eine Reihe von Parametern geprüft, die bereits in früheren Beiträgen dargestellt wurden (Proceedings zum 19. und zum 20. Mykotoxin-Workshop, Dissertation Götz, Hohenheim/ München, 2003).

Während des gesamten Versuches über 8 Wochen zeigten die Tiere sämtlicher Belastungsstufen keinerlei gruppenabhängigen Störungen des Allgemeinbefindens und der Futteraufnahme. Wichtige gemessene Blutparameter lagen im Referenzbereich. Unterschiede im Gewichtsverlauf wurden nicht festgestellt. Die pathophysiologische Beurteilung der Organe nach Schlachtung ergab keine Anhaltspunkte für nachhaltige schädigende Wirkungen des zugelegten DONs.

Regressionsberechnungen zwischen Dosierungsstufen und Verlauf der IGA-Konzentration im Serum zeigten aber einen klaren dosis- und altersbedingten steigernden Effekt. Durch Berechnung standardisierter Dosen auf Basis des Stoffwechselgewichtes und Einsatz eines Ausreißertests für die IGA-Konzentration zu Beginn des Versuches ergaben sich statistisch signifikante Beziehungen zwischen DON-Aufnahme und IGA-Konzentrationen im Serum.

Die gemessene IGF-1- Konzentration zeigte darüberhinaus dosisabhängig im Einzelvergleich gegen Ende des Versuches statistisch signifikant erniedrigte Werte. Die Blutglukosekonzentrationen war dosisabhängig signifikant erniedrigt.

Die Bedeutung der Befunde hinsichtlich potentieller Wirkungen chronisch erhöhter IGA-Spiegel bei Mensch und Tier werden diskutiert.

Langzeitwirkung von Fusarientoxinen auf Gesundheitsstatus und Reproduktionsleistungen bei Sauen

Anke Jadamus, Dieter Schneider, Institut für Tierernährung, Brümmerstr. 34, D- 14195 Berlin

Die Verwendung von Getreiden, die mittlere bis hohe Konzentrationen an Fusarientoxinen enthalten, führten bei Sauen zu Gesundheitsschäden und erheblichen Leistungsdepressionen. Im vorliegenden Versuch an 30 Zuchtsauen lagen im verwendeten Alleinfutter Konzentrationen von rund 2600 µg Deoxynivalenol und rund 180 µg Zearalenon je kg vor. ZON- bedingte Fruchtbarkeitsstörungen, die sich in einer erhöhten Umrauschrate, Aborten und Symptomen des Hyperöstrogenismus bei neugeborenen Ferkeln äußerten, traten schon nach kurzer Expositionsdauer während des 1. Reproduktionszyklus auf.

Die Reaktion der Sauen auf den hohen DON- Gehalt im Futter war bezüglich der Futteraufnahme besonders während der Laktation individuell sehr unterschiedlich ausgeprägt. Bei Ferkeln traten äußerlich sichtbare Schädigungen von Haut, Ohren und Schwänzen in Form von Läsionen, Nekrosen und Ödemen sowie Koordinationsstörungen und Deformationen der Extremitäten vermehrt erst im 2. und 3. Reproduktionszyklus auf. Bei reduzierter Anzahl abgesetzter Ferkel je Wurf war die Lebendmasseentwicklung während der Laktation durch die Fusarientoxinbelastung der Sauen nicht beeinflusst. Die Mehrzahl der in der mit Fusarientoxinen belasteten Fütterungsgruppen abgehenden Sauen zeigte an Nieren, harnableitenden Wegen, Gebärmutter, Gesäuge , Lunge, Leber und Verdauungstrakt pathologische Veränderungen infolge generalisierter bakterieller Infektionen. Diese gehäuft auftretenden Bakteriaemien lassen eine Schwächung des Immunsystems der Sauen vermuten. Ein detoxifizierender Futterzusatz reduzierte Umrauschrate, Verzehrsdepression, Aufzuchtverluste, Organinfektionen und pathologische Veränderungen an Gebärmutterschleimhaut und Ovarien. Die an Ferkeln beobachteten Symptome des Hyperöstrogenismus, der Fehlstellungen und Koordinationsstörungen der Extremitäten, der Nekrosen an Ohren, Schwanz und Zitzen sowie die Läsionen und Ödeme der Haut traten unter dem Einsatz des getesteten Futterzusatzes in verminderter Ausprägung und deutlich reduzierter Anzahl auf.

On the toxicokinetics and the metabolism of zearalenone in the pig

S. Dänicke[1], E. Swiech[2], L. Buraczewska[2], K.-H. Ueberschär[1]

[1]Institute of Animal Nutrition of the Federal Agricultural Research Centre (FAL), Bundesallee 50, 38116 Braunschweig, Germany
[2]The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, ul. Instytucka 3, 05-110 Jablonna near Warsaw, Poland

The fate of a single bolus of the Fusarium mycotoxin zearalenone (ZON) given intravenously to piglets was followed. Piglets, additionally equipped with a duodenal re-entrant fistulae at the duodenum, were divided into 3 groups. The control group was injected with ZON (Co), a second group was also injected with ZON but duodenal digesta was quantitatively exchanged with another piglet not injected with ZON for 12 h. Therefore, the latter two groups had a disrupted entero-hepatic cycling of ZON (DEHC) and an introduced entero-hepatic cycling of ZON (IEHC), respectively.
Pharmacokinetic evaluation of the plasma data revealed that the terminal elimination half-life of ZON was reduced from 2.63 h in Co-piglets to 1.1 h when entero-hepatic cycling of ZON was disrupted for 12 h (DEHC-group). The maximum ZON-concentration in plasma of the piglets with the introduced entero-hepatic cycling of ZON (IEHC) was found at 2.73 h after giving the bolus to their counterparts.
In addition, α-zearalenol (α-ZOL) was detected as the only metabolite of ZON. All pigs were slaughtered 14 d after the initiation of the experiment and ZON- and α-ZOL concentrations in bile or liver were lower than the detection limits of the applied method.
The results would strongly suggest that a massive single bolus of ZON is completely eliminated from the body within this period of time.

On the effects of Fusarium toxins on the fermentation and nutrient utilization in the rumen of dairy cows

S. Dänicke, K. Matthäus, P. Lebzien, H. Valenta, K.-H. Ueberschär
Institut für Tierernährung, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Bundesallee 50, 38116 Braunschweig, e-mail: sven.daenicke@fal.de

Ruminants are regarded as quite resistant to Fusarium toxins such as deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) due to the detoxifying potential of rumen microbes. Several studies have shown that the epoxid group bearing parent toxin DON is metabolized to de-epoxy-DON whereas several metabolites are formed from ZON with β-zearalenol (β-ZOL) and α-zearalenol (α-ZOL) are being the most important from a quantitative viewpoint.
However, relatively little is known about the effects of these toxins on the activity of rumen microbes themselves in utilizing nutrients. Therefore, the aim of the present study was to examine the effects of feeding Fusarium toxin contaminated wheat as the only component of the concentrate portion of the daily ration of dairy cows on fermentation and nutrient utilization in the rumen.
Six dairy cows equipped with a large rumen cannula and a simple T-shaped cannula at the proximal duodenum close to the pylorus were used in 2 experiments. The experiments consisted of a control period in which the uncontaminated control wheat was fed and a period in which the control wheat was replaced by the Fusarium toxin contaminated wheat (8.05 and 7.15 mg DON/kg and 0.26 and 0.1 mg ZON/kg in exp. 1 and 2, respectively). The wheat portion of the daily ration amounted 50 % on a dry matter basis and rations were completed by hay or grass silage. Five of the 6 cows were non-lactating and the total daily dry matter intake ranged between 4 and 12 kg.
The pH-value and the concentration of volatile fatty acids in the rumen fluid were not influenced by feeding the contaminated wheat when measured over 5 h after start of feeding and at 3 h after feeding, respectively. In contrast, ammonium concentration was consistently higher when the mycotoxin contaminated wheat was fed over 5 h after start of feeding which might be the result of the higher protein intake due to the higher crude protein concentration of the contaminated wheat and/or due to a decreased capacity of rumen microbes to utilize the released ammonium for microbial protein synthesis. Moreover, the flow of microbial protein and of undegraded dietary crude protein at the duodenum was reduced at the same time. The efficiency of microbial protein synthesis expressed as the ratios between microbial protein at the duodenum and the ingested metabolizable energy or organic substance fermented in the rumen were also reduced.
The concentrations of DON and ZON and of their metabolites in freeze dried duodenal digesta were either not detectable or negligible during the control periods whereas distinct concentrations were measured during the periods where the contaminated wheat was fed. DON was nearly completely metabolized to de-epoxy-DON and the flow at the duodenum ranged between 2 and 16 % of DON-intake. The parent toxin ZON and its metabolite α-ZOL were recovered at the duodenum whereas β-ZOL could not be detected due to a chromatographic interference. Their recovery as percentage of ZON-intake ranged between 33 and 88 % but could well exceed 100 % when β-ZOL can be measured adequately.
In conclusion, feeding of Fusarium toxin contaminated wheat altered the ruminal protein utilization. If this effect is a result of the mycotoxin presence in the rumen or of Fusarium growth related structural (cell wall) changes of the wheat grain need to be clarified.
The low recovery of DON at the duodenum would indicate either a complete degradation of the molecule in the rumen or an absorption by the mucosa of the rumen.

Reclamatory processes in liver and kidney of broilers exposed to short term of acute poisoning with T-2 and ochratoxin

Sefer D, Nedeljkovic Trailovic J, Sinovec S, Sinovec Z

Die Mykotoxinproblematik in Südostasien

E. Razzazi[1], W. Tassaneeyakul[2], J. Böhm[1], N. Nuryono[3]

[1]Institut für Ernährung / Veterinärmedizinische Universität Wien
[2]Department of Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Science,
Khon Kaen University / Thailand
[3]Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Gadjah Mada University, Yogyakarta / Indonesia

Mykotoxine stellen in den tropischen Ländern Südostasiens große wirtschaftliche und gesundheitliche Risiken dar. Aflatoxine sowie andere Mykotoxine sind in verschiedenen besonders erdnusshaltigen Lebensmitteln häufig nachweisbar.
Über das Vorkommen, die Häufigkeit und das Ausmaß der Mykotoxinkontamination in südostasiatischen Ländern sind mit Ausnahme von Thailand keine genauen Daten bekannt, da auch keine routinemäßigen Erhebungen durchgeführt werden. Die Mykotoxine stellen somit eine große Gefahr für die dortige Bevölkerung dar.
Um dieses Problem in südostasiatischen Ländern aufzuzeigen, finden seit fünf Jahren regelmäßig Mykotoxin-Trainingskurse vor Ort statt. Im Rahmen dieser Kurse werden theoretische Grundlagen der Mykotoxikologie, Bedeutung der Mykotoxine in der Human- und Tierernährung und deren gesundheitspolitische Aspekte sowie mögliche Präventivmaßnahmen erörtert. Die TeilnehmerInnen lernen verschiedene Methoden zur Erfassung und Bestimmung der Mykotoxine in Lebens- bzw. Futtermittelproben kennen. Im Zuge der praktischen Arbeiten führen sie selbständig Untersuchungen mykotoxinkontaminierter Lebensmittel im Labor durch. Dieses Projekt der ASEA-UNINET (Asean-European University Network) Organisation stellt somit ein Weiterbildungsangebot bzw. ein postgraduales Trainingsprogramm für die WissenschaftlerInnen der verschiedenen südostasiatischen Universitäten dar.
Im Rahmen weiterer Kooperationsprojekte der ASEA-UNINET Organisation wurden mehrere Lebens- und Futtermittelproben aus Indonesien und Thailand auf Aflatoxine und Zearalenon analysiert. Die Proben wurden direkt am Wochenmarkt bzw. Supermarkt gezogen. Darüber hinaus konnten einige Heilkräuterproben thailändischer Herkunft auf Aflatoxine untersucht werden.
Für die Analyse der Toxine wurde ein quantitativer ELISA Test verwendet. Einige positive Proben wurden dann mittels HPLC Analyse mit Fluoreszenzdetektion bestätigt. Die Probenvorbereitung erfolgte mit Immunoaffinitätssäulchen.
In 35% der untersuchten Erdnussproben traten Aflatoxine bis zu einer Menge von 382 µg/kg auf. In Erdnuss-Chilli Mischungen wurden 75% positive Proben (7-206 µg/kg) registriert.
Zusätzlich wurden 28 Heilkräuterpräparate auf Aflatoxine analysiert, in 5 dieser Proben konnten Aflatoxine nachgewiesen werden (1,7-11.3 µg/kg total).
In einigen Lebensmittelproben auf Maisbasis konnte Zearalenon (ZON) in Konzentrationen zwischen 4–589 µg/kg nachgewiesen werden. In industriell verarbeiteten Proben wurden Werte zwischen 11-22 µg/kg für ZON gefunden. Die Ergebnisse zeigen, dass die industriell verarbeiteten Produkte niedrigere Mykotoxingehalte aufwiesen als die sog. „homemade" Produkte, die vergleichsweise sehr stark kontaminiert sind.

Ochratoxin A in Kaffee – Vergleichende Auswertung bundesweiter Daten der Jahre 1995 - 1999 und 2000 - 2002

Herbert Otteneder[1] und Bernd Gabel[2]

[1] Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz – Institut für Lebensmittelchemie Trier – Maximineracht 11a, 54295 Trier

[2] Landesuntersuchungsamt für Chemie, Hygiene und Veterinärmedizin St. Jürgen-Straße, 28205 Bremen

Ausgewertet werden die Ochratoxin A-Daten von 21 Untersuchungsinstituten bundesweit, die zwischen Januar 2000 und Dezember 2002 erhoben wurden. Insgesamt handelt es sich um 777 Proben. Die Ergebnisse wurden den zwischen 1995 und 1999 zusammengefassten und ausgewerteten Daten gegenübergestellt*).

OTA-Gehalte verschiedener Kaffeeerzeugnisse

Warengruppe	N	Min (µg/kg)	Max (µg/kg)	% positiv	Mittelwert (µg/kg)	Median (µg/kg)
Rohkaffee						
1995 - 1999	84	<0,2	24,5	26,2	1,29	<0,24
2000 - 2002	151	<0,15	64,2	36,4	1,46	<0,15
Röstkaffee						
1995 - 1999	435	<0,06	12,1	43,9	0,98	<0,24
2000 - 2002	227	<0,05	7,4	38,3	0,66	<0,20
Röstkaffee, behandelt						
1995 - 1999	72	<0,15	2,7	36,1	0,53	<0,24
2000 - 2002	89	<0,02	6,5	46,1	0,79	<0,18
Kaffeeextrakt						
1995 - 1999	41	<0,24	4,8	70,7	1,01	0,60
2000 - 2002	124	<0,12	7,3	58,1	1,00	0,66

Die Untersuchung ergab, dass das Kontaminationsniveau der Kaffeeerzeugnisse offensichtlich abgenommen hat.

Weiterhin wurden herkunftsbedingte Unterschiede der OTA-Gehalte bei Rohkaffee festgestellt. Prognostiziert wurden die Ablehnungsquoten bei einem möglichen Grenzwert von 3 bzw. 5 µg/kg für Rohkaffee und Röstkaffee, die sich zwischen 3,1 und 7,5 % bewegten.

Die Problematik der Bestimmung von Medianwerten bei Datenkollektiven mit einem hohen Anteil von Proben unter der Nachweisgrenze wird dargestellt.

*) siehe 22. Mykotoxin-Workshop 2000, Bonn

Vorkommen von Fumonisinen in Spargel (*Asparagus officinalis* L.) und Knoblauch (*Allium sativum L.*) aus Deutschland

W. Seefelder[1], A. Knecht[1], M. Goßmann[2], S. Kleta[2], C. Büttner[2], H.-U. Humpf[1*]

[1]Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Lebensmittelchemie, Corrensstrasse 45, 48149 Münster
[2]Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften, FG Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin

Bei Fumonisinen handelt es sich um eine Gruppe von kanzerogenen Mykotoxinen, die hauptsächlich von *Fusarium verticillioides (*früher *F. moniliforme)* gebildet werden. Daneben werden Fumonisine auch von andere Fusarien wie z.B. *F. proliferatum* (Matushima) Nirenberg, produziert. Von einem Befall sind neben Mais auch Reis und Spargel betroffen [1]. Es war daher von Interesse festzustellen, ob *F. proliferatum* in eine Schädigung der Spargelpflanzen verwickelt ist und ob infolgedessen die zum Verzehr verwendeten Teile der Pflanze von einer Kontamination mit Fumonisinen betroffen sind.
Für unsere Untersuchungen wurde daher in der Nachernteperiode (Juli 2000) Pflanzenmaterial gesammelt, das äußerlich von Fäulnis und Wachstumsdepressionen gekennzeichnet war. Der Spargel wurde hierbei von ausgewählten Standorten in Deutschland entnommen. Ingesamt sind drei *Fusarium*-Spezies von den Sprossen isoliert und identifiziert worden nämlich, *F. oxysporum, F. proliferatum* und *F. sambucinum* [2]. Die fungale Kontamination war dabei am unteren Ende der Spargelstangen am stärksten ausgeprägt. Um festzustellen, ob Fumonisine auch auf deutschem Spargel zu finden sind, wurden die mit *F. proliferatum* infizierten Spargelstangen mittels HPLC-ESI-MS analysiert [3]. FB_1 ist in neun der zehn untersuchten Proben nachgewiesen worden (36 bis 4514 ng/g, bezogen auf das Trockengewicht), FB_2 und FB_3 waren hingegen nur in sechs der zehn Proben vorhanden [4]. Damit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass auch bei deutschem Spargel von einer Kontamination mit Fumonisinen ausgegangen werden muss. In weiteren Proben aus der Hauptstechperiode (Juni 2002) gelang zwar der Nachweis von *F. proliferatum* (6% der Proben), eine Belastung mit Fumonisinen war mittels HPLC-MS/MS allerdings nicht nachweisbar.
Nachdem bereits der Befall von deutschen Knoblauchknollen durch *F. proliferatum* in einer vorhergehenden Studie erfolgreich nachgewiesen wurde, sollte untersucht werden, ob der Schimmelpilz bei einem Befall auch in der Lage ist, die Knollen mit Fumonisinen zu kontaminieren. In einem Modellversuch wurden daher Knoblauchknollen in einer mit *F. proliferatum* durchsetzten Erde fünf Monate lang kultiviert. Nach Erreichen des Reifestadiums wurden die Knollen oberflächendesinfiziert und danach auf einen *F. proliferatum*-Befall untersucht. Die Knollen, in denen mit Hilfe der Methode von Nirenberg eine Kontamination mit dem Pilz nachgewiesen werden konnte, wurden anschließend mittels HPLC-ESI-MS auf das Vorkommen von Fumonisinen untersucht. Von den vier untersuchten Knollen ist in allen eine Kontamination mit den Fumonisinen FB_1 (26 bis 94 ng/g), FB_2 und FB_3 nachgewiesen worden [4]. Somit wurde erstmals bewiesen, dass *F. proliferatum* in der Lage ist, Knoblauchknollen zu infizieren. Außerdem zeigt der Nachweis der Toxine, dass *F. proliferatum* auch ein Potenzial zur natürlichen Kontamination von Knoblauch mit Fumonisinen besitzt. Dies wird verstärkt durch die Tatsache, dass die zur Kontamination der Erde verwendete Pilzkultur von kommerziell erhältlichen Knoblauch-knollen isoliert wurde.

Literatur

1. Logrieco *et al.*, J Agric Food Chem **1998**, 46, 5201-5204.
2. Goßmann et al., Pflanzenschutzberichte **2001**, *59*, 45-54.
3. Humpf et al., J Agric Food Chem **1999**, 47: 5078-5083; **2001**, 49: 2146-2151.
4. Seefelder *et al.*, J Agric Food Chem **2002**, 50, 2778-2781.

The mitogen activated protein kinase ERK is a key protection factor against Ochratoxin A toxicity in the proximal tubule of the kidney

Christoph Sauvant, Hildegard Holzinger and Michael Gekle
Physiologisches Institut der Universität Würzburg
Röntgenring 9, 97070 Würzburg; Germany

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin showing nephrotoxic properties. OTA a ctivates the mitogen activated protein kinases ERK, JNK and p38 in renal epithelial cells. In brief, activation of ERK supports mitosis, growth and differentiation, whereas JNK and p38 are considered to induce the opposite effects. The balance of the mentioned key protein kinases decides the further fate of the cell. In renal disease, the proximal tubule of the nephron often is affected first.

Thus, we investigated the effect of OTA incubation (24 or 48 hours) on proximal tubular OK cells (oppossum) and/or NRK-52E cells (rat) in presence of an inhibitor of ERK activation (U0126). U0126 (25µM) completely abolished ERK activation induced by OTA. Parameters indicating necrosis, apoptosis, epithelial tightness, fibrosis, trans-differentiation and inflammation were determined. In presence of U0126, OTA led to a decrease of cell number as compared to OTA alone. U0126 in presence of OTA increased LDH release as compared to OTA alone. OTA alone did not change epithelial integrity, whereas OTA in presence of U0126 reduced epithelial tightness. 100 nM OTA alone did not increase apoptosis, while addition of U0126 to OTA induced apoptotis. U0126 stimulated the secretion of collagen induced by OTA. Furthermore, as investigated by RT-PCR, the effect of OTA on markers of inflammation (NF-κB) and trans-differentiation (α-smooth muscle actin) was also more pronounced when ERK was inhibited.

ERK inhibition enhanced the effects of OTA. Thus, activation of ERK after OTA is a protective mechanism. We conclude, that ERK not only acts anti-apoptotic but also is beneficial on cell viability, epithelial tightness, interstitial fibrosis, inflammation and trans-differentiation. We further conclude that ERK is a key protection factor in the proximal tubule. However, long term OTA exposition could lead to clonal selection of kidney cells overexpressing ERK. As strong expression of ERK is found in various tumours not only of the kidney, we hypothesise that the mentioned clonal selection could be a mechanism inducing the cancerogenic action discussed for OTA.

(supported by the Wilhelm Sander Stiftung and the Universitätsbund Würzburg)

OCHRATOXIN A ANALYSEN IM BLUT VON ARBEITNEHMERN IN DER ABFALLWIRTSCHAFT

G. H. Degen[1], M. Blaszkewicz[1], Y. Lektarau[1], C. Grüner[2]

[1] Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund (IfADo), Ardeystr. 67, D-44139 Dortmund, Germany
[2] LGA Baden-Württemberg, Wiederholdstr. 15, D-70174 Stuttgart

An Arbeitsplätzen im Bereich der Abfallwirtschaft (Sammlung von Hausmüll und Biomüll, Wertstoffsortierung und Recycling („Gelbe Tonne"), Deponierung und Kompostierung) treten Bakterien und Schimmelpilze auf. Es ist daher von einer Gefährdung der Beschäftigten durch Inhalation von Bioaerosolen und Stäuben auszugehen, die zu *luftgetragenen* Mykotoxin-Expositionen führen können. Im Rahmen einer arbeitsmedizinischen Studie an Arbeitnehmern aus Betrieben der Abfallwirtschaft im Land Baden-Württemberg wurden ca. 500 Blutproben (Serum) asserviert. In den Proben sind Ochratoxin A (OTA) Gehalte analysiert worden, um *i)* Expositionen gegen das Mykotoxin für diese Personengruppen (Wertstoffsortierer und Deponiearbeiter) zu ermitteln, und *ii)* die Frage zu untersuchen, inwieweit sich OTA als Biomarker für Expositionen gegenüber Bioaerosolen eignet.

Beim 24. Mykotoxin-Workshop sind Daten für 157 analysierte Proben (n=39 Deponierer und n=118 Wertstoffsortierer) vorgestellt worden: Die erste Zwischenauswertung [**1**] der OTA-Serumspiegel ergab bei Wertstoffsortierern höhere Medianwerte (0,42 ng/ml) als bei Deponierern (0,26 ng/ml); die Maximalwerte der Arbeitnehmer aus der Abfallwirtschaft lagen aber nicht höher als Spitzenwerte, die in der bundesweiten Studie zur OTA-Belastung durch die Nahrung in der süddeutschen Bevölkerung ermittelt worden sind; deren Medianwerte waren allerdings niedriger (0,21 ng/ml) [**2**].

Inzwischen sind weitere (> 300) Proben analysiert worden, und zwar Seren von Deponiearbeitern und Wertstoffsortierern, aber auch Serumproben von Kontrollen (Büroangestellte) aus den gleichen Betrieben. Die Herkunft (das Geburtsland) der Beschäftigten kann (auch im gleichen lokalen Umfeld) zu unterschiedlichen Nahrungsgewohnheiten und daher verschieden hohen Hintergrundbelastungen an OTA beitragen. Um solche Einflüsse weitgehend auszuschliessen, wurden die OTA-Werte nach Tätigkeit *und* nach Herkunft der Personen gruppiert:

Tätigkeit	Gruppe	Anzahl	Max.	Mittelwert	Median
Kontrollen	EU-Inländer	84	2,00	0,49	0,39
Deponierer	EU-Inländer	84	1,65	0,51	0,38
W.-Sortierer	EU-Inländer	52	2,89	0,66	0,53
W.-Sortierer	And. Europäer	67	2,11	0,60	0,50
W.-Sortierer	Afrika/Asien	11	2,97	0,62	0,38

Ein Vergleich der Medianwerte der ersten drei Gruppen stützt den Verdacht einer *inhalativen* OTA-Exposition bei Wertstoffsortierern. In Relation zur OTA-Aufnahme über die Nahrung sind die zusätzlichen Belastungen nicht so hoch, dass unmittelbarer Handlungsbedarf besteht. Schutzmassnahmen gegen Stäube und Bioaerosole werden aber als sinnvoll erachtet, um luftgetragene Expositionen der Arbeitnehmer gegen Keime und bisher nicht analysierte Mykotoxine zu minimieren.

[**1**] Degen GH, Lektarau Y, Blaszkewicz M, Grüner C (2002) Ochratoxin A Analysen im Blut von Wertstoffsortierern und Deponie-Beschäftigten: Zwischenauswertung. Abstracts / Proceedings des 24. Mykotoxin-Workshop, 3-5. Juni 2002, Berlin.

[**2**] Rosner H, Rohrmann B, Peiker G (2000) Ochratoxin A in human serum. Archiv für Lebensmittelhygiene 51: 104-107

Uptake and genotoxic effects of ochratoxin A in cultured porcine urinary bladder epithelial cells

Wolfram Föllmann und Stefan Lebrun

Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund, Ardeystr. 67, 44139 Dortmund

The mycotoxin ochratoxin A (OTA) is nephrotoxic and suspected to be involved in the generation of urinary tract tumors in patients suffering from Balkan Endemic Nephropathy. The ability of renal tubular cells to reabsorb OTA from urine results in a high cellular OTA concentration which is discussed as one reason for the kidney specific toxicity of OTA. As OTA reaches the urinary bladder with the urine, the lower urinary tract is also regarded as a target for the adverse effects of OTA.

In the present study, we examined the ability of porcine urinry bladder epithelial cells to take up OTA and the correlation between OTA uptake and genotoxic and/or cytotoxic effects.

Therefore, the uptake of radiolabelled OTA into porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) was measured under neutral (pH 7.4) and acidic (pH 5.0) conditions. Genotoxicity of OTA was evaluated with the Comet assay and cytotoxicity with the neutral red uptake assay.

Under acidic pH-conditions, the bladder cells were able to take up more OTA than at neutral conditions. Cytotoxic effects were not increased at pH 5.0 compared to pH 7.4, but higher OTA uptake correlated with stronger genotoxic effects in the Comet assay at pH 5.0 compared to pH 7.4.

These results demonstrate that uptake of OTA has to be regarded as an important factor for the toxicity of OTA as adverse effects depend on the amount of OTA taken up by the cells.

Effekte einer Langzeitexposition mit OTA oder OTC auf Funktionen einer humanen Monozyten-Zelllinie

Heike Köhler, Martin Heller, Wilfried Erler, Günter Müller
Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Standort Jena,
Naumburger Strasse 96a, D-07743 Jena

Die Ergebnisse der Studie zur Belastung des Verbrauchers und der Lebensmittel mit Ochratoxin A (1) belegen, dass unter mitteleuropäischen Bedingungen die größte Gefährdung für die menschliche Gesundheit von einer Langzeitexposition mit niedrigen Dosen dieses Mykotoxins ausgeht. Das Vorkommen von Ochratoxin C (OTC) in Lebensmitteln wurde bisher nicht systematisch untersucht. Zimmerli und Dick (2) fanden in verschiedenen Traubensäften und Tafelweinen, die mit Ochratoxin A (OTA) belastet waren, auch OTC. Die OTC-Konzentrationen betrugen etwa 10% des OTA-Gehaltes. Bisher wurde der Toxizität von OTC wenig Bedeutung beigemessen. In eigenen Untersuchungen zur Beeinflussung immunologischer Reaktionen konnten wir jedoch zeigen, dass die immunsuppressive Wirkung von OTC bis zu 100fach stärker ist als die von OTA (3).
Die gesundheitlichen Folgen einer Langzeitexposition mit geringen Mykotoxin-Dosen lassen sich in Tierexperimenten nur unzureichend nachweisen, da es häufig nur zu unspezifischen Veränderungen kommt, die schwer reproduzierbar sind. Permanente Zelllinien ermöglichen es, Veränderungen auf zellulärer Ebene unter relativ gut standardisierten Bedingungen hinreichend reproduzierbar zu untersuchen.
Ziel der hier vorgestellten Studie war es, die Wirkung einer Langzeitexposition mit geringen Konzentration von OTA und OTC auf die Vitalität und funktionelle Eigenschaften einer humanen Monozyten-Zelllinie (THP-1) zu untersuchen. Die Zellen wurden über 15 d unter Zusatz von 1 ng/ml OTA, OTC, einem OTA-haltigen *Aspergillus ochraceus*-Rohtoxin bzw. einer aus dem Rohtoxin isolierten HPLC-Fraktion (RE 2), die mit OTC identisch war, subkultiviert. Parallel dazu wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Am Versuchsende wurde die Beeinflussung von Vitalitätsparametern (Prozentsatz lebender Zellen, Zellmembranintegrität, mitochondriale Aktivität, Proliferation) und Zellfunktionen (Differenzierung, Phagozytose, Expression von Zelloberflächenmarkern, Zytokinproduktion) untersucht.
Die 15-tägige Exposition mit Ochratoxinen in einer Konzentration von 1 ng/ml führte zu Modulationen der Vitalität und der Funktion der THP-1-Zellen, wobei die verschiedenen Parameter eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber der Mykotoxin-Wirkung aufwiesen. Die mitochondriale Aktivität der Zellen und die Produktion von Interleukin-6 wurden durch alle Toxinpräparationen erhöht. Die Zellmembranintegrität, die Proliferation sowie die Produktion von TNF-α und Interleukin-8 wurden gehemmt, dabei waren die stärksten Effekte nach Einwirkung von OTC und der HPLC-Fraktion RE 2 nachweisbar.
Die humane Monozyten-Zelllinie THP-1 ist ein geeignetes Modell, um die Effekte von Langzeitexpositionen mit Mykotoxinen in geringen Konzentrationen auf die Monozytenfunktion zu untersuchen. OTA und besonders OTC verursachen subtile Veränderungen in der Vitalität und der Funktion dieser Zellen, die weitreichende gesundheitliche Auswirkungen haben können. Vor diesem Hintergrund erscheint es notwendig, das Vorkommen von OTC in Lebensmitteln und Futtermitteln intensiver zu untersuchen.

(1) J. Wolff, H. Bresch, C. Cholmakow-Bodechtel et al., 2000: Belastung des Verbrauchers und der Lebensmittel mit Ochratoxin A. Abschlußbericht.
(2) B. Zimmerli, R. Dick (1996): Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. Food Additives and Contaminants, 13, 655-668.
(3) G. Müller, H. Rosner, B. Rohrmann et al., 2003: Effects of the mycotoxin ochratoxin A and some of its metabolites on the human cell line THP-1. Toxicology, 184, 69-82.

Einfluss des Kraftfutter-Rauhfutter-Verhältnisses in der Ration auf Abbau und Absorption von Ochratoxin A beim Schaf

R. Blank[1], J.-P. Rolfs[1], K.-H. Südekum[1], A. A. Frohlich[2], R. R. Marquardt[2] und S. Wolffram[1]
[1]Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie, Christian-Albrechts-Universität, 24098 Kiel
[2]Department of Animal Science, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba R3T 2N2, Canada

Einleitung: Wiederkäuer gelten aufgrund der umfangreichen ruminalen Hydrolyse von Ochratoxin A (OA) zum weniger toxischen Ochratoxin α (Oα) als weitestgehend resistent gegen akut toxische Effekte von OA. Es gibt jedoch Hinweise, dass die Rationszusammensetzung (Kraftfutter:Rauhfutter-Verhältnis, KRV) die ruminale Abbaukapazität begrenzen und die systemische Verfügbarkeit von OA beim Wiederkäuer deutlich erhöhen. Ziel unserer Untersuchung war es, den Einfluss des KRV in der Ration auf die Konzentrationen von OA im Blut und Pansensaft, sowie die Elimination über Harn und Kot bei Fütterung von Rationen mit moderaten OA-Gehalten zu untersuchen.

Material und Methoden: Zwölf adulte Schafe wurden auf die folgenden 4 Behandlungsgruppen verteilt: 1) KRV 30:70, 2) KRV 70:30, 3) KRV 30:70 + OA und 4) KRV 70:30 + OA. Die Rationen setzten sich aus Grassilage, Weizen und Sojaextraktionsschrot zusammen. Die Dosierung von OA (inokulierter Weizen) betrug 14,3 µg/kg KG. Das Versuchsdesign entsprach einem balanzierten Zwei-Perioden-Wechselversuch, wobei jede Periode einen Zeitraum von 29 Tage umfasste. An den Tagen 1 (Nullwert), 5, 9, 13, 23 und 29 wurde den Tieren jeweils vor der Morgenfütterung eine Blutprobe aus der Vena jugularis entnommen. Vom 15. bis 22. Versuchstag wurde eine quantitative Sammlung von Harn und Kot durchgeführt. Zusätzlich wurde den Tieren am 24. und 25. Versuchstag zu verschiedenen Zeitpunkten mittels einer Schlundsonde Pansenflüssigkeit entnommen. In den Blut- Harn-, Kot und Pansensaftproben wurden OA und Oα mittels HPLC analysiert. Weiterhin wurden die Nährstoffe in den Futtermitteln und Kot zwecks Ermittlung der Verdaulichkeiten bestimmt.

Ergebnisse: Ein hoher Kraftfutteranteil in der Ration (KRV 70:30) führte zu einem deutlich niedrigeren pH-Wert im Pansen nach der Fütterung im Vergleich zu einem KRV von 30:70. Diese Beobachtung ging mit einer verlängerten Aufenthaltsdauer von OA im Pansen sowie höheren Konzentrationen von OA im Serum einher (siehe Tabelle). Die Gesamtausscheidung von OA und Oα (in % der aufgenommenen Menge an OA) über Kot und Harn war nicht vom KRV beeinflusst und betrug 77,9 bzw. 81,3 % für Behandlung 3 und 4. Die renale Ausscheidung in Form von Oα war bei hohem Rauhfutteranteil in der Ration im Vergleich zur Ration mit hohem Kraftfutteranteil deutlich verringert (58,2 % vs. 67.5 %), während die fäkale Ausscheidung von Oα bei einem KRV von 30:70 deutlich höher ausfiel (14,4 % vs. 9,1 %).

Ration	1 + 2	3	4	Ration	1 + 2	3	4
Tag	**OA im Serum (ng/ml)**			h, nach Fütterung	**OA im Pansensaft (ng/ml)**		
1	-	-	-				
5	-	4,0	5,1	1	-	$18,6^{A}$	$25,4^{B}$
9	-	2,9	4,2	4	-	$5,2^{A}$	$11,3^{B}$
13	-	3,4	5,7	7	-	$0,2^{A}$	$6,7^{B}$
23	-	$3,8^{A}$	$7,1^{B}$	10	-	0,1	1,4
29	-	$3,8^{A}$	$9,4^{B}$	13	-	0,2	0,3
SEM	-	0,7	0,7	SEM	-	1,8	1,8

[A, B] Least squares means mit unterschiedlichen Hochbuchstaben in der gleichen Zeile für OA sind signifikant verschieden ($p < 0,05$)

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, das ein hoher Kraftfutteranteil in der Ration, die Absorption von OA aus dem Verdauungstrakt signifikant steigert und das Potential für einen „Carry over" von OA unter intensiven Produktionsbedingungen deutlich erhöht.

UNTERSUCHUNGEN ZUM VORKOMMEN VON OCHRATOXIN A IN KATZENNIEREN UND KATZENFUTTERMITTELN

PÜHRINGER S.[1], RAZZAZI E.[1], IBEN C.[1], BÖHM J.[1], KÜBBER – HEISS A.[2]

[1]Institut für Ernährung der Veterinärmedizinischen Universität, 1210 Wien, Österreich
[2]Institut für Pathologie der Veterinärmedizinischen Universität, 1210 Wien, Österreich

Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 101 Katzennieren mit und ohne pathologischen Veränderungen auf einen Ochratoxin A (OTA) Gehalt untersucht. Nach Homogenisierung und Extraktion erfolgte die Probenvorbereitung zum Nachweis von OTA mit RIDA® Immunaffinitätssäulchen. Die Bestimmung erfolgte mittels einer HPLC (High Performance Liquid Chromatograph) Anlage.

Von den untersuchten Katzennieren waren 39 positiv. Bei 16 (15,8 %) positiven Nieren traten Werte zwischen 0,31 bis 5,18 µg/kg auf. Ein geringer Gehalt an OTA im Bereich von 0,11 bis 0,30 µg/kg wurde bei 23 (22,8%) Katzennieren gemessen Ein ursprünglich vermuteter signifikanter Zusammenhang zwischen einem Ochratoxin A Gehalt in der Katzenniere und pathologischen Veränderungen der Nieren konnte im Rahmen der Stichprobenauswahl nicht festgestellt werden.

Zusätzlich erfolgte eine Untersuchung von 55 Katzenfuttermitteln, davon entfielen 45 auf Feuchtfuttermittel und 10 auf Trockenfuttermittel. Von den insgesamt untersuchten Futtermitteln wiesen 14 (25,5 %) einen positiven Gehalt im Bereich von 0,11 bis 2,17 µg OTA/kg ursprünglicher Substanz auf. Von 45 Feuchtfuttermittel waren 7 Proben in einem Bereich von 0,63 bis 2,33 µg OTA/kg positiv Ochratoxin A wurde in 7 Proben von 10 untersuchten Trockenfuttermittel in einem Bereich von 0,31 bis 0,80 µg OTA/kg Trockensubstanz gefunden.

Typ A Trichothecene – Analyse mittels LC-MS, sowie Verbreitung in österreichischem Mais und Hafer

E. Fuchs, J. Handl, B. Rabus, E.M. Binder
Erber AG, Biomin und Romer Gruppe, Industriestr. 21, A-3130 Herzogenburg, www.biomin.net

Bisher sind etwa 400 strukturell verschiedene Mykotoxine bekannt. Eine wichtige Gruppe der Mykotoxine sind die Trichothecene, die von Pilzen der Gattung *Fusarium* gebildet werden. Trichothecene wirken immuno-suppressiv, sie führen zu Futterverweigerung oder bei sehr hohen Konzentrationen zum Erbrechen und Hautläsionen. Aufgrund dieses Wirkungsspektrums kommt es durch erhöhte Trichothecen-Kontaminationen im Futter zu großen Leistungseinbußen in der Tierproduktion.
Trichothecene vom Typ B – sie zeichnen sich durch eine Keto-Gruppe am C8-Atom aus – absorbieren im UV-Bereich und können daher mittels HPLC-UV oder nach einer Derivatisierung mit GC-ECD analysiert werden. Trichothecene vom Typ A – sie besitzen eine Hydroxylgruppe oder eine Seitenkette am C8-Atom - absorbieren kaum im UV-Bereich und waren daher bisher einer HPLC-Analyse mangels Detektionsmöglichkeiten kaum zugänglich. Aufgrund der verbesserten LC-MS Technologie ist es nun möglich eine sensitive Methode zur Analyse von Trichothecenen des Typ A zu präsentieren.

Die Extraktion der gemahlenen Maisproben erfolgte durch ein Acetonitril/Wasser-Gemisch. Nach dem clean-up mit einer Mycosep™ 227 Säule wurde ein Aliquot des gereinigten Überstands bei 60°C auf dem Heizblock zur Trockene eingeengt. Der getrocknete Rückstand wurde in einem Aliquot des Laufmittels gelöst, das bereits 200µg/l des internen Standards T-2 Toxin d3 enthielt.
Die so bereiteten Proben wurden auf einer LC-ESI-MS (Agilent Technologies) analysiert, wobei die chromatographische Trennung auf einer Zorbax® Bonus-RP Säule (2,1x150mm, 5µm) mittels Gradient erfolgte. Für den Gradienten wurden Acetonitril und 10mmol Ammoniumformiatpuffer pH=3,6 bei einer Flussrate von 0,3ml/min gemischt.

Die eluierenden Mykotoxine wurden anhand ihrer Retentionszeit und der charakteristischen m/z Verhältnisse identifiziert. Für jede Substanz und für den internen Standard wurden je zwei intensive Massenspuren aufgenommen und für die quantitative Auswertung herangezogen.

Für die Validierung der Methode wurde unkontaminierter Mais und unkontaminierter Hafer mit je sieben verschiedenen Konzentrationsstufen einer Mischung der drei Analyten dotiert und nach der beschriebenen Methode aufgereinigt und analysiert. Es wurden drei Wiederholungen jedes Levels und des Blanks herangezogen. Aus diesen Versuchen wurden die Wiederfindungen und die Nachweisgrenzen für jeden Analyten berechnet.

Mit der beschriebenen Methode ist es möglich alle drei Analyten in einem Aufreinigungsschritt zu reinigen, wobei je nach Analyt Wiederfindungen von 70 – 103% erhalten werden. Bei der anschließenden HPLC-Analyse ist es möglich, die drei A-Trichothecene in nur 20 Minuten ohne störende Interferenzen von der Säule zu eluieren. Die chromatographische Trennung ist hervorragend und so ist es möglich über den internen Standard die Nachweisgrenzen zu errechnen.

Mit der vorliegenden Methode ist es nun möglich, drei wichtige Vertreter der Typ A Trichothecene mit nur einem Aufreinigungsschritt und innerhalb eines chromatographischen Trennungs- und Detektionschrittes sehr sensitiv zu analysieren. Durch die Verwendung des Massenspektrometers als Detektor ist es noch leichter eine eindeutige Identitätsbestimmung vorzunehmen, die nicht nur auf der Retentionszeit der Substanz im chromatographischen System beruht.
Anhand der vorliegenden Methode wurden verschiedene Mais- und Haferproben, die zur routinemäßigen Untersuchung auf Zearalenon und Deoxynivalenol in unser Labor kamen, zusätzlich auf ihre Kontamination mit Typ A Trichothecenen untersucht.

Die aus dem Screening bisher gewonnen Daten sollen präsentiert und diskutiert werden.

Beurteilung chemometrisch ausgewerteter Infrarot Spektren zur Bestimmung von Deoxynivalenol in Mais

Gregor Kos, Hans Lohninger, Rudolf Krska
Interuniversitäres Forschungsinstitut für Agrarbiotechnologie (IFA-Tulln)/Analytikzentrum
Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln, Österreich

Die Beurteilung der Qualität von Klassifikations- und Quantifizierungsergebnissen in der multivariaten Datenanalyse ist von erheblicher Wichtigkeit. Neben der Qualität der Kalibrationskurve liefert auch die Vorhersage der gesuchten Gehalte in „unbekannten" Testproben Aufschluss über die Qualität der Regression [1], wobei der Gehalt in der „unbekannten" Probe mit einer Referenzmethode bestimmt und mit dem vorhergesagten Wert des Modells verglichen wird. Es stehen verschiedene Möglichkeiten der Validierung zu Verfügung (z.B. Test-Set Validierung, Kreuzvalidierung) [2]. Ermittelte Kenndaten geben Auskunft über den Vorhersagefehler.

RWA2 Mais, der in unterschiedlichem Ausmaß natürlich mit Deoxynivalenol kontaminiert war (300-2600 µg/kg) wurde in dieser Studie mittels Infrarotspektroskopie mit abgeschwächter Totalreflexion vermessen. Der Fingerprintbereich der Mid-infrarotspektren wurde zur Klassifikation in „verpilzt/nicht verpilzt" (mittels Hauptkomponentenanalyse und Clusteranalyse) und zur Erstellung einer Kalibration mit Partial Least Squares Regression genutzt.

Die Kalibrationsdaten und die Ergebnisse nach einer vollen Kreuzvalidierung ergaben dabei folgendes Bild [3]:

	Calibration	Validation
Slope	0.9852	0.7512
Offset	10.99	21.92
Correlation coefficient	0.9926	0.8111
Root Mean Square Error of Calibration/Cross Validation	95.01	494.5
Standard Error of Calibration/Prediction (SEC/SEP)	98.59	484.2
Bias	-0.00066	-163.80

Die Steigung zeigt eine gute Übereinstimmung zwischen vorhergesagten und gemessenen Werten, sowie eine zufriedenstellende Korrelation. Auch der Kalibrationsfehler hält sich in noch in Grenzen. Nach der Kreuzvalidierung ist der RMSECV (Root Mean Square Error of Cross Validation) allerdings schon sehr hoch. Eine weitere Hinzufügung von Proben kann die Stabilität des Modells erhöhen, aber auch den RMSECV senken, da allenfalls eine größere Variabilität in den Proben abgedeckt werden kann.

Referenzen:

[1] Danzer K., Hobert H., Fischbacher C. Jagemann K.-U., Chemometrik - Grundlagen und Anwendungen, Springer, Heidelberg (2003)
[2] Naes T, Isaksson T., Fearn T., Davies T., Multivariate Calibration and Classification, NIR Publications, Chichester (2002)
[3] Kos G., Lohninger H., Krska R., Development of a Method for the Determination of Fusarium Fungi on Corn Using Mid-Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflection and Chemometrics, Analytical Chemistry (2003) 75, 12, 1211-1217

Strategien zur Kontrolle von Fusarium in Getreide

Carin Jansen, Elke Stein, Rebekka Fensch und Karl-Heinz Kogel

Institute for Phytopathology and Applied Zoology, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Giessen, Germany

Pilze der Gattung Fusarium produzieren Mykotoxine, die in einem hohen, heute leider noch weitgehend unterschätzten, Ausmaß die Nahrungsqualität von Mensch und Tier massiv bedrohen. Das Ziel der im Rahmen dieses Vortrags vorgestellten Projekte ist die Isolierung, funktionelle Charakterisierung und agronomische Nutzung von Schlüsselelementen der pflanzlichen Abwehr gegenüber nekrotrophen Schaderregern dieser Pilzgattung. Das Auffinden der Schlüsselelemente soll zum einen durch cDNA-Arrays innerhalb eines in der Deutschen Pflanzengenominitiative GABI-1b eingebundenen Projekts geschehen, und zum anderen über einen Kandidatengenansatz, bei dem einzelne Getreidegene gezielt untersucht werden, die möglicherweise zu einer verbesserten Resistenz gegenüber hemibiotrophen und nekrotrophen Erregern beitragen können. Die Bewertung der Funktion von Testgenen aus beiden Ansätzen soll zunächst in einem transienten Transformationssystem an Gerstenwurzeln und Ähren vorgenommen werden. Dazu werden die Gene mit Hilfe von Agrobakterien transformiert und zur Expression gebracht. Gene, die sich in diesem System als resistenzfördernd erweisen, sollen anschließend stabil in Gersten- und Weizenpflanzen transformiert, und die agronomischen Eigenschaften dieser Pflanzen im Bezug auf Ertrag, Proteinqualität, Widerstandsfähigkeit gegenüber Pathogenen und abiotischem Stress bewertet werden. Insgesamt soll die Widerstandfähigkeit von Getreiden verbessert, und so ein Beitrag zur ökologisch nachhaltigeren, aber auch kostengünstigeren Produktionsweise von Kulturpflanzen geleistet werden.

Im Vortrag präsentieren wir erste Ergebnisse der Genexpressionsanalysen, von cytologischen Arbeiten über den Infektionsverlauf von *Fusarium* an Gerste und der Dosis-Effekte von Toxinen an Pflanzengewebe.

Diversität der *Fusarium*-Arten an Weizen und Analytik des Mykotoxinspektrums

G. Meyer[1], T. Feldmann[2], E.-C. Oerke[1], U. Steiner[1], B. Oertel[2], H.-W. Dehne[1]
[1] Institut für Pflanzenkrankheiten, Nussallee 9, 53115 Bonn
[2] Institut für Obstbau und Gemüsebau, Auf dem Hügel 13, 53121 Bonn

Im Rahmen des vorbeugenden Verbraucherschutzes hat die Quantifizierung der Mykotoxinbildung durch *Fusarium*-Arten im Getreideanbau eine immer größere Bedeutung erlangt. Dabei konzentrierte sich die Forschung in den letzten Jahren vor allem auf *Fusarium graminearum* und *F. culmorum* und die von ihnen gebildeten (Leit-)Toxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA).
In wieweit sich die Befallssituation aus anderen Bundesländern auf Nordrhein-Westfalen übertragen lässt und ob eine Beschränkung der Toxinanalytik auf DON und ZON zulässig ist, soll durch Untersuchungen von Kornproben aus fünf Standorten der Landessortenversuche der Landwirtschaftskammern Rheinland und Westfalen geklärt werden. Für die Befalls- und Toxinuntersuchungen wurden 2001 und 2002 aus sieben unterschiedlich anfälligen Sorten Proben gezogen. Die Befallshäufigkeit mit den verschiedenen *Fusarium*-Arten wurde durch Auslegen auf Selektivnährmedium ermittelt[1] und diese anschließend mikroskopisch bestimmt[2].
Höhere Niederschläge im Sommer führten 2001 in Westfalen mit rund 16 % befallener Körner zu einem deutlich höheren Befall als im Rheinland mit circa 4%. Der Anteil der einzelnen *Fusarium*-Arten an den verschiedenen Standorten variierte erheblich, wobei mit Ausnahme von Haus Düsse, sowohl im Rheinland als auch in Westfalen *F. avenaceum* und *F. poae* dominierten. Der Anteil der von *F. graminearum* und *F. culmorum* befallenen Körner lag im Rheinland bei unter 0,3%, erreichte in Ascheberg und Lage-Ohrsen 2-3% und bei Haus Düsse nach der Vorfrucht Mais knapp 10%. Im Jahr 2002 lag das Befallniveau im Rheinland in Kerpen ungefähr doppelt so hoch wie 2001, während der Befall in Neukirchen Vluyn wiederum sehr gering war. Auffällig war trotz später Ernte ein geringerer Befall in Westfalen und das starke Auftreten von *Fusarium tricinctum* am Standort Ascheberg.

Ausgehend vom Auftreten der verschiedenen *Fusarium*-Arten wurde eine Methode zur Erfassung eines möglichst breiten Spektrums der im Korn auftretenden Mykotoxine entwickelt. In die Untersuchung wurden neben Deoxynivalenol (DON), und Zearalenon (ZON), auch Nivalenol (NIV), Diacetoxyscirpenol (DAS), T2-Toxin (T2) sowie Trichothecin (TIN) einbezogen. Nach Extraktion der Kornproben mit Acetonitril/Wasser (84/16) und Aufreinigung über Mycosep®-Zearalenon-Säulen erfolgt die Bestimmung und Quantifizierung der Trichothecene (DON, NIV, DAS, T2-Toxin, TIN) sowie von Zearalenon mittels HPLC/MS/MS [3].

Die Ergebnisse der Befallsuntersuchung werden ebenso voergestellt wie die erarbeitete Methode zur Mykotoxinanalytik in ihrem aktuellen Stand mit Wiederfindungsraten und Nachweisgrenzen.

[1] Abildgren et al. (1987): Czapek-Dox-Agar containing iprodione an dichloran as a selective medium for the isolation of Fusarium species; Letters in Applied Microbiology 5, 83 – 86.
[2] Nelson, P.E. (1983): Fusarium species, An illustrated Manual for Identification; Pensylvania State University Press;
[3] Berger, U. (2000): Structure elucidation and quantification of trichothecenes and bisphenol diglycidil ether derivates in food by HPLC combined with multiple mass spectrometrie. Dissertation Universität Basel

Fusarium-Besatz in suboptimal gelagertem Weizen: I. Kultureller und Multiplex-PCR-Nachweis von *Fusarium* in Bezug zum Deoxynivalenol-Gehalt

Barbara Birzele, Alexander Prange

Landwirtschaftliche und Lebensmittel-Mikrobiologie, Institut für Pflanzenkrankheiten, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Meckenheimer Allee 168, D-53115 Bonn

F. graminearum, *F. culmorum*, *F. avenaceum* und *F. poae* zählen zu den am häufigsten von Getreide isolierten *Fusarium*-Arten. Als Deoxynivalenol (DON)-Bildner sind nur *F. culmorum* und *F. graminearum* bekannt, die neben DON noch weitere Mykotoxine bilden können.
Mit verschiedenen methodischen Ansätzen wurde verfolgt, welchen Einfluss eine suboptimale Lagerung von Weizen auf die *Fusarium*-Population, speziell die von *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* und *F. poae*, hat. Diese Ergebnisse wurden in Bezug zum DON-Gehalt gesetzt. Untersuchungen mit suboptimal gelagertem Weizen zeigten, dass sich der DON-Gehalt innerhalb weniger Wochen vervielfachen kann [1].
Die Lagerungsversuche wurden 3 Monate bei einer Temperatur von 20°C mit nicht befeuchtetem Weizen, mit befeuchtetem Weizen (Kornfeuchte 20%) sowie mit Weizen, der mit *F. culmorum*-inokuliertem Weizen vermischt und ebenfalls auf eine Kornfeuchte von 20% befeuchtet wurde, durchgeführt. Die Lagerung erfolgte in Klimaschränken mit der Möglichkeit zur Regulation von Feuchte und Temperatur. Die Proben befanden sich während der Lagerungsversuche in sterilen Tüten ($SacO_2$, Belgien), die durch Filter den Gasaustausch ermöglichten, aber einen Sporenaustritt verhinderten. Die zweiwöchentlich genommenen Proben wurden auf ihren DON-Gehalt sowie kulturell und mittels PCR auf das Vorkommen verschiedener *Fusarium*-Arten untersucht. Um das *Fusarium*-Spektrum des Weizens zu erfassen, wurden die Arten durch Verwendung selektiver Nährmedien [2] von den Körnern isoliert und mikroskopisch nach [3] identifiziert. Zum PCR-Nachweis von *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* und *F. poae* wurde ein Multiplex-Nachweis auf der Grundlage vorhandener Einzelnachweise entwickelt [4].
Die Befeuchtung der Weizenkörner auf eine Kornfeuchte von 20% führte bereits innerhalb von 2 Wochen zu einem stark veränderten Pilzspektrum, was sich ebenfalls in den Mykotoxin-Gehalten widerspiegelte. Dies lässt erkennen, dass Interaktionen zwischen verschiedenen Schimmelpilzen die Mykotoxinbildung beeinflussen. Die Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis von *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* und *F. poae* wurde erfolgreich eingesetzt und lieferte im Vergleich zum kulturellen *Fusarium*-Nachweis ein deutlich schnelleres Ergebnis.

Literatur:

[1] Birzele B, Prange A, Krämer J (2000) *Food Add Contam* 17: 1027-1035
[2] Abildgren MP, Lund F, Thrane U, Elmholt S (1993) *Lett Appl Microbiol* 5: 83-86
[3] Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO (1983) *Fusarium* species. Penns. State Univ. Press, London, 193 pp.
[4] Schilling, A. G., Möller, E. M., Geiger, H. H. (1996) *Phytopathol* 86: 515-522

Fusarium-Besatz in suboptimal gelagertem Weizen: II. XANES-Spektroskopie als methodischer Ansatz zur Charakterisierung des Einflusses von Schimmelpilzen auf die Schwefel-Speziation im Weizenkleber und die Backqualität

Alexander Prange, Barbara Birzele
Landwirtschaftliche und Lebensmittel-Mikrobiologie, Institut für Pflanzenkrankheiten, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Meckenheimer Allee 168, D-53115 Bonn

Schimmelpilzinfektionen von Weizen können zur einer entscheidenden Qualitätsbeeinträchtigung durch die Bildung von Mykotoxinen und die Minderung technologischer Eigenschaften führen. Von besonderer Bedeutung ist die Backqualität, die hauptsächlich durch die Weizenkleberproteine bestimmt wird. Die Cystein-enthaltenden Proteine (inbes. die Glutenin-Untereinheiten) sind entscheidend für die Funktionalität von Teigen, da die Ausbildung von Disulfidbrücken die Bildung des dreidimensionalen Weizenklebernetzwerks ermöglicht. Zur Charakterisierung der Schwefel-Struktur in Weizenkleberproteinen wurde kürzlich die Röntgenabsorptionsspektroskopie mit Synchrontronstrahlung im Nahkantenbereich (X-ray Absorption Near Edge Structure = XANES) erstmals verwendet [1]. Die XANES-Spektroskopie ist für die Untersuchung biologischer Probensysteme *in situ* hervorragend geeignet, da kein Hochvakuum notwendig ist und die Messung weitestgehend zerstörungsfrei ist. Die Methode erlaubt Einblick in die elektronische (z.B. Valenz) und geometrische Struktur der Umgebung (Koordinationsgeometrie) eines absorbierenden Atoms. Eine Einführung in die physikalischen Grundlagen der Methode und deren Anwendung in der bio- und agrarwissenschaftlichen Forschung ist in [2] dargestellt.
Mittels XANES-Spektroskopie an der Schwefel K-Kante wurden Low Molecular Weight (LMW)-Untereinheiten von Glutenin aus unterschiedlich stark mit *Fusarium* spp. sowie mit *Penicillium* spp. und *Aspergillus* spp. infizierten Weizenproben untersucht und die Schwefel-Speziation mit Hilfe der Software Mn_Fit 4.04/15 [3] quantitativ analysiert. Parallel wurden die entsprechenden Weizenproben in Backversuchen verbacken [4] und der DON- bzw. OTA-Gehalt mittels ELISA bestimmt. Zwischen gering (natürliche Infektion) und stark (künstliche Infektion zum Zeitpunkt der Weizenblüte) *Fusarium*-infiziertem Weizen waren im Backvolumen kaum Unterschiede -im Gegensatz zu Studien anderer Autoren- erkennbar, was auf keine Veränderung des Klebernetzwerks hindeutet. Dies bestätigte sich in den XANES-Messungen, die keine signifikante Veränderung in der Schwefel-Speziation erkennen ließen. In den künstlich infizierten Proben waren die DON-Gehalte (5480 und 12334 µg/kg) um den Faktor 100 höher als in dem natürlich infizierten Weizen. Der suboptimal gelagerte, stark mit *Penicillium*- und *Aspergillus*-Arten infizierte Weizen (DON: 820 µg/kg; OTA: 1,6 µg/kg) zeigte ein stark vermindertes Backvolumen, was auf die Zerstörung des Klebernetzwerks durch die Lagerpilze hinweist. Bei der Untersuchung der LMW-Untereinheiten von Glutenin mit der S K-XANES-Spektroskopie wurde ein erhöhter Anteil höherer Oxidationsstufen des Schwefels (Sulfoxid, Sulfonat) festgestellt. Dieser Anteil steht für den Thiol-/Disulfidaustausch bei Ausbildung des Klebernetzwerks nicht mehr zur Verfügung, was die Reduktion des Backvolumens erklärt. Für den Verbraucherschutz lässt sich als Ergebnis ableiten, dass ein hohes Backvolumen eine starke *Fusarium*- und ggf. DON-Kontamination des Mehls nicht ausschließt.

Literatur:

[1] Prange A, Kühlsen N, Birzele B, Arzberger I, Hormes J, Antes S, Köhler P (2001) *Eur Food Res Technol* 212: 570-575
[2] Prange A, Modrow H (2002) *Re/Views Environ Sci Bio/Technol* 1: 259-276
[3] http://zina06.physik.uni-bonn.de/~brock/mn_fit.html
[4] Kieffer R, Wieser H, Henderson MH, Graveland A (1998) *J Cereal Sci* 27: 53-60

Konstruktion und mögliche Anwendungen eines Hefe-Bioassays für Zearalenon

R. Mitterbauer[1], H. Weindorfer[1], H. Bachman[1], N. Safaie[2], R. Krska[3], G. Adam[1*]

1, Zentrum für Angewandte Genetik, Universität für Bodenkultur, Wien
2, Tarbiat Modarres University, Tehran, Islamic Republic of Iran
3, Analytikzentrum, IFA Tulln, Austria
*, Corresponding Author

Zearalenon (ZON) ist ein östrogen-aktives Mykotoxin, das von Pilzen der Gattung *Fusarium* (vor allem *F. graminearum* und *F. culmorum*) im Zuge der Pathogenese von Mais, Weizen und anderen Getreidearten gebildet wird. Während die Hinweise auf eine Beeinträchtigung der menschlichen Gesundheit durch ZON nicht unumstritten sind, besteht wenig Zweifel, dass ZON-kontaminiertes Futter Fortpflanzungsstörungen bei Schweinen hervorrufen kann. Eine internationale Harmonisierung der Grenzwerte für ZON ist noch ausständig, in Österreich und Deutschland liegt der empfohlene Richtwert für Zuchtsauen-Futter bei 50 µg ZON/kg. Durch eine feuchtwarme Witterung zur Zeit der Blüte und vor der Ernte wird das Wachstum von *Fusarium* begünstigt, hohe ZON-Gehalte im kontaminierten Getreide und eine hohe Überschreitung der Richtwerte können die Folge sein. In normalen Jahren sind jedoch nur wenige Proben hochpositiv. Ein umfassendes ZON-Monitoring wäre wünschenswert, ist aber aufgrund der hohen Analysekosten (üblicherweise mittels HPLC, nach relativ aufwendiger Probenaufbereitung) und dem geringen Wert von Futtermitteln unwirtschaftlich.

Das Prinzip des von uns entwickelten biologischen Testsystems (1) basiert auf der Hormon-Wirkung und somit letztendlich auf der hohen Affinität des ZON zum humanen Östrogenrezeptor. Es wurde ein Hefestamm (YZRM7) konstruiert, der nicht nur das Gen für den humanen Östrogenrezeptor exprimiert, sondern auch ein modifiziertes Gen (*URA3*) aus dem Pyrimidin-Biosyntheseweg der Hefe aufweist, das östrogen-abhängig exprimiert wird. Der genetisch veränderte Hefestamm kann nur dann wachsen, wenn im Medium östrogen wirksame Substanzen enthalten sind. Der Bioassay wurden anhand verschiedener Referenzmaterialen (z.B. Maismehl mit bekannter ZON Konzentration) getestet. Dazu wurde ein Teil des Mediums durch einen Acetonitril-Extrakt der zu untersuchenden Getreideprobe ersetzt. Maismehl mit 50 µg ZON pro kg wurde z. B. eindeutig als "ZON-positiv" getestet.

Der Test ist somit ein gutes Screening-Werkzeug, das die Anwesenheit von ZON und Derivaten in Getreide und Futtermittelrohstoffen kostengünstig und sensitiv anzeigen kann. Weitere Anwendungen, aber auch Einschränkungen für den Bioassays werden diskutiert.

Darüber hinaus wurden auch Hefestämme konstruiert, die zusätzliche Reportergene enthalten (z.B. *ADE2*, Kolonienfärbung rot/weiß). Solche Stämme sind nützliche Werkzeuge für die Klonierung von ZON-Detoxifikationsgenen. Mit Hilfe dieser Indikatorstämme konnten auch Insertionsmutanten von *Fusarium graminearum* identifiziert werden, die kein Zearalenon bilden.

Lit.

1. Mitterbauer R, Weindorfer H, Safaie N, Krska R, Lemmens M, Ruckenbauer P, Kuchler K, Adam G (2003) A sensitive and inexpensive yeast bioassay for the mycotoxin zearalenone and other compounds with estrogenic activity. Appl. Environ. Microbiol. 69(2): 805-811.

Toxinbildungsvermögen der Gattung *Alternaria* unter Laborbedingungen und auf dem Feld

Marina Müller, Marion Tauschke
Zentrum für Agrarlandschafts- und Landnutzungsforschung (ZALF), Institut für Primärproduktion und Mikrobielle Ökologie, Gutshof 7, D-14641 Paulinenaue,
e-mail: mmueller@zalf.de

Pilze der Gattung *Alternaria* sind ubiquitär verbreitet. Als Saprophyten und perthotrophe Pathogene werden sie auf den unterschiedlichsten Substraten, in der Luft und im Boden gefunden, sie befallen die verschiedensten Pflanzengattungen sowohl als samen-, als auch boden- und/oder luftbürtige Sporen oder Hyphenfragmente.
Alternarien sind typische Vertreter der sogenannten Feldpilzflora und gehören damit zum natürlichen Besatz von wachsenden und erntefrischen landwirtschaftlichen Nutzpflanzen. In Mitteleuropa werden sie regelmäßig auf allen Getreidearten, sowohl in den Ähren als auch im Stroh nachgewiesen. Eigene Untersuchungen in den Jahren 2000-2002 beim Winterweizen zeigen einen mittleren bis starken Befall der Ähren mit *Alternaria* spec. bereits 6 Wochen vor der Ernte, ihr Anteil an der Gesamtzahl der kultivierbaren Schimmelpilze liegt zwischen 5 und 28%.
Viele *Alternaria*-Stämme sind pflanzenpathogen und zur Bildung einer Vielzahl von wirtsspezifischen Phytotoxinen befähigt. Besondere Bedeutung hat die Gattung aber durch ihre Fähigkeit zur Mykotoxinbildung. *Alternaria*-Mykotoxine werden nach ihrer Häufigkeit und toxikologischen Relevanz in „major" und „minor" Toxine unterteilt. Zu den am häufigsten gebildeten Toxinen gehören Alternariol (AOH), Alternariolmonomethylether (AME) und Tenuazonsäure (TeA). Da es bis jetzt nur wenige Untersuchungen zum Vorkommen dieser Pilze und ihrer Toxine in Getreide in Deutschland gibt, wurden 2002 von Praxisflächen in Nordostdeutschland 80 *Alternaria*-Stämme von Winterweizenpflanzen und –körnern isoliert, gereinigt und charakterisiert. Auf Grund verschiedenen Koloniemerkmale nach Wachstum auf zwei Nährmedien, der Sporulationshäufigkeit und der Auswertung der Sporenformen und -größen konnten die *Alternaria*-Stämme in mindestens 3 Gruppen unterteilt werden.
Darüberhinaus unterschieden sich diese Gruppen in der Anzahl und Menge der gebildeten Mykotoxine. Für diese Untersuchungen wurden alle isolierten *Alternaria*-Stämme 4 Wochen auf Reis kultiviert, anschließend mit organischen Lösungsmitteln extrahiert und die Toxine AOH, AME, TeA und Altertoxin mittels HPLC analysiert. 44 % aller Stämme gehören zu den starken Toxinbildnern, die teilweise über 6.000 ppm AOH, 2.000 ppm AME und 20.000 ppm TeA bildeten. Die Mehrzahl dieser Stämme produzierte hohe Konzentrationen aller drei „major" Toxine, nur bei 7 Stämmen wurde lediglich eines der drei Toxine in großen Mengen nachgewiesen.
In einer noch laufenden molekulargenetischen Untersuchung wurden die Pilzextrakte direkt für die Amplifikation der ITS-Region in PCR Reaktionen mit den Primern ITS 1 und ITS 4 verwendet. Die Musterauswertung der mit HinfI gespaltenen ITS-Fragmente ermöglichte eine erste Gruppierung der Pilze in zwei Gruppen, bei der die stark toxinbildenden Stämme in einem Cluster zusammengefasst werden konnten.
Damit sind diese potentiell hochtoxischen *Alternaria*-Stämme sowohl makroskopisch durch ihre Koloniefarbe und Sporenmenge als auch durch ihren molekulargenetischen Nachweis relativ einfach und sicher zu identifizieren. Die Ergebnisse weisen nachdrücklich auf die potentielle Kontamination von Getreide unter unseren einheimischen Wachstumsbedingungen hin. Gleichzeitig werden erste Ergebnisse vorgestellt über natürlich kontaminierte Weizenkörner aus verschiedenen landwirtschaftlichen Betrieben Brandenburgs.

Mykophenolsäure – Einfluss auf die Tiergesundheit und Rückstände in Lebensmitteln

K. Meyer[1], Anna Mohr[1], Angelika Notzon[1], M. Pfaffl[2], H.H.D. Meyer[2], J. Bauer[1]
Technische Universität München, [1]Lehrstuhl für Tierhygiene und [2]Lehrstuhl für Physiologie, 85354 Freising-Weihenstephan

Mykophenolsäure (MPA), ein Stoffwechselprodukt von *Penicillium roqueforti*, kommt häufig in beträchtlichen Mengen in Silagen vor. Gleichzeitig wird diese Verbindung aufgrund ihrer immunsuppressiven Wirksamkeit in der Humanmedizin als Morpholinoethylester Mycophenolat Mofetil zur Unterdrückung von Transplantatabstoßungen eingesetzt. Aus diesem Grunde sollte in einem Fütterungsversuch an Schafen geklärt werden, inwieweit praxisrelevante Mykophenolsäuremengen den Gesundheitsstatus von Wiederkäuern beeinträchtigen. Weiterhin wurden der Metabolismus und die Rückstandsbildung von Mykophenolsäure in Geweben und Körperflüssigkeiten dieser Tierspezies untersucht.

Die Versuchstiere (n=36) wurden in 4 Gruppen aufgeteilt und MPA in abgestufter Dosierung (0, 10, 70 und 300 mg MPA/Tier/Tag) oral verabreicht. Der Gesundheitsstatus wurde im Untersuchungszeitraum (56 d) durch eine tägliche Allgemeinuntersuchung und anhand von hämatologischen und klinisch-chemischen Blutparametern (Erythrozytenzahl, Hämatokrit, Hämoglobinkonzentration, Leukozytenzahl, Differentialblutbild, Thrombozytenzahl, Glucosekonzentration, Bilirubinkonzentration, Alanin-Amino-Transferase-Aktivität, Aspartat-Amino-Transferase-Aktivität und Glutamat-Dehydrogenase-Aktivität) erfasst. Die Rückstandsanalysen der Blut-, Urin- und Faecesproben sowie der nach Tötung der Tiere am Schlachthof gewonnenen Leber-, Lunge-, Niere-, Milz-, Herzmuskulatur-, Skelettmuskulatur-, Galle- und Fettproben erfolgten mittels LC-MS. Eine interne Validierung der eingesetzten Verfahren ergab für MPA und MPAG (Mykophenolsäure-Glucuronid) Nachweisgrenzen zwischen 0,0005 µg/g (Fett) und 0,012 µg/ml (Urin) bzw. zwischen 0,002 µg/g (Fett) und 0,005 µg/g (Leber, Milz, Skelettmuskel). Die durchschnittlichen Wiederfindungsraten lagen zwischen 32,3% (MPA, Faeces) und 106,0% (MPAG, Plasma).

Im betrachteten Untersuchungszeitraum konnte keine MPA-bedingte Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes der Versuchstiere festgestellt werden. Die Höchstgehalte der gemessenen Rückstände in essbaren Geweben betrugen durchschnittlich 3,26 mg/kg in der Niere, 2,18 mg/kg in der Leber, 1,43 mg/kg in der Lunge, 0,23 mg/kg im Skelettmuskel und 0,27 mg/kg im Fett. Diese Werte lassen unter Berücksichtigung der Verzehrsgewohnheiten des Menschen und der vorliegenden toxikologischen Daten keine klinisch relevante Beeinträchtigung des Immunsystems des Verbrauchers erwarten.

Bestimmung von Citrinin in Lebensmitteln

Stefan Schmidt, Gerhard Thielert
Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Sigmaringen, Hedingerstraße 2/1, 72488 Sigmaringen

Das Mykotoxin Citrinin gilt aufgrund von Tierversuchen als hepatotoxisch (leberschädigend) sowie nephrotoxisch (nierenschädigend) und steht im Verdacht, Nierenkrebs auslösen zu können [1, 3]. Da als Produzenten des Toxins auch zahlreiche Penicillium-Arten in Frage kommen, die überwiegend tiefere Temperaturen bevorzugen, beschränkt sich das Vorkommen nicht nur auf tropische oder subtropische Klimazonen (Aspergillus-Arten, Monascus-Arten); Citrinin ist auch in Ländern mit gemäßigtem Klima zu finden, wobei es häufig neben dem nephrotoxischen Ochratoxin A vorkommt, da beide Toxine von denselben Schimmelpilzarten gebildet werden.
Im Vergleich zum Ochratoxin A wurde dem Mykotoxin Citrinin hinsichtlich chemisch-analytischer Forschungsaktivitäten jedoch bisher nur wenig Beachtung geschenkt, was möglicherweise nicht zuletzt an der schwierigen Bestimmbarkeit dieses Mykotoxins liegt. So wird in einigen Publikationen auf ein starkes Tailing des Citrininpeaks bei HPLC-Methoden hingewiesen, welches die chromatographische Trennung des Citrinins von der Probenmatrix und damit die quantitative Bestimmung stark erschwert.
Als weitere mögliche Gründe für das Schattendasein des Citrinins werden u.a. eine vermeintliche Instabilität in Lebensmitteln genannt, sowie die Möglichkeit, dass es nicht so häufig wie Ochratoxin A vorkommt [2]. Die letztere These scheint sich in neueren Publikationen zwar nicht zu bestätigen, birgt aber dennoch die Gefahr eines Teufelskreises: fehlt die Möglichkeit, den Analyten Citrinin mit ausreichend empfindlichen und sicheren Methoden zu bestimmen, werden die vorhandenen Datenmengen auch in Zukunft relativ klein bleiben, was wiederum zu dem (falschen?) Schluß führen könnte, es komme nicht so häufig vor.
Eine letzte Möglichkeit, die zu dem bisher geringen „Interesse" an Citrinin gegenüber Ochratoxin A geführt haben könnte, ist seine möglicherweise geringere Toxizität. Zwar ist die akute Toxizität von Citrinin tatsächlich relativ gering, Citrinin besitzt darüber hinaus jedoch auch starke genotoxische Wirkungen, die durchaus kritisch zu bewerten sind [3]. Ferner liegen Studien vor, die belegen, dass bei gleichzeitiger Aufnahme von Ochratoxin A und Citrinin synergistische Effekte auftreten [4].
Vor diesem Hintergrund erscheint es sinnvoll, auch die Citrininanalytik in den gesundheitlichen Verbraucherschutz zu integrieren, um so die Datenlage zu erweitern und ein möglichst wirklichkeitsgerechtes Bild der Belastung der Lebensmittel und damit der Verbraucher zu erstellen.
Am Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Sigmaringen wurde aus diesem Grund eine empfindliche HPLC-Methode entwickelt, mit der die Mykotoxine Citrinin und Ochratoxin A parallel bestimmt werden können. Einzelheiten der Methode, die sich in der Routineerprobung befindet, werden vorgestellt.

[1] Marti, L.R., Wilson, D.M., Evans, B.D. (1978) J. AOAC 61 , 1353-1358
[2] Reinhard, H., Zimmerli, B. (1999) J. Chromatogr. A 862, 147-159
[3] Dietrich, R., Usleber, E., Märtlbauer, E., Gareis, M. (1999) Archiv für Lebensmittelhygiene 50, 17-21
[4] Kanisawa, M. (1984) aus: Proceedings of the Mycotoxin Symposia held in the third Int. Mycological Congress, Tokyo 30.08.-3.09.1983, Elsevier, 245-255

Investigation of different yeast strains for the detoxification of Ochratoxin A

Schatzmayr, G.[1], Heidler, D.[1], Fuchs, E.[2], Mohnl, M[3]., Täubel, M[3]., Loibner, A.P.[3], Braun, R.[3] and Binder, E.M.[2]

[1] Biomin IAN GmbH, Industriestr. 21, A-3130 Herzogenburg; e-mail: gerd.schatzmayr@biomin.net
[2] Erber AG, Industriestrasse 21, A-3130 Herzogenburg
[3] IFA-Tulln, Department of Environmental Biotechnology, Konrad Lorenzstr. 20, A-3430 Tulln, Austria

Due to their toxic properties ochratoxins lead to economic losses in animal production. Ochratoxin A (OTA) is the most common representative of these group of secondary fungal metabolites. Immunosuppression, nephrotoxicity and hepatotoxicity are the most prevalent properties of this mycotoxin, thus it affects the growth of animals during production.

In the past many substances were tested to adsorb OTA prior to its resorbtion in the gastrointestinal tract of animals. Although this strategy works for detoxifying aflatoxins any practical approach to deactivate ochratoxin A by binders failed due to the physical and chemical properties of OTA.

Degradation and biotransformation by microorganisms represents an alternative, provided metabolites are non-toxic. Further advantages of the microbiological approach are the specificity and the irreversibility of the degradation. In the present study several habitats were screened for microorganisms with the capability to cleave OTA in the nontoxic Otα and phenylalanine. Apart from anaerobic bacteria isolated from rumen fluid and intestinal content of pigs and aerobic isolates obtained from water and soil (Schatzmayr, 2002a) various yeast strains were screened for their ability to deactivate ochratoxin A. From this screening process several strains with the capability to cleave OTA could be obtained. These yeast strains belong to the genera of *Trichosporon*, *Rhodotorula* and *Cryptococcus*. A comprehensive investigation protocol was established to determine the strain best suitable to be applied in animal feed. Thus degradation studies under various conditions were conducted. It could be shown that 35°C in comparison to 25°C led to an increase in OTA - detoxification activity. After 2,5 hours 80-100% of OTA had been degraded by the most active strains. In an anaerobic environment the activity turned out to be a bit lower in comparison to aerobic conditions. Incubations studies in phenylalanine containing medium solution revealed that some Isolates (Nr. 124, 171, 193) were inhibited by high concentration of this amino acid whereas the degradation activity of some other strains was not influenced at all. Among other investigations fermentation studies were conducted to prove the possibility of the production. After fermentation the broth was concentrated and the obtained slurry was stabilized by freeze drying. These lyophilisates were subjects of degradation studies to investigate the time for regaining activity in a liquid environment. Several of these lyophilisates were used in an *in vitro* model consisting of pig intestine to prove the ability to deactivate OTA in a natural environment. Considering the results of all investigations the strain *Trichosporon sp. nov.* was selected for deactivating OTA in animal feed.

Further investigations revealed that this strain is also able to metabolize zearalenone to non estrogenic compounds – this could be shown in an E-SCREEN assay conducted at the University of Utrecht.

Schatzmayr, G., Heidler, D. Fuchs, E., Loibner, A.P., Braun, R. and Binder E.M. (2002a). Evidence of Ochratoxin A -Detoxification Activity of Rumen Fluid, Intestinal Fluid and Soil Samples as well as isolation of relevant microorganisms from these environments. Lecture at 24th Mycotoxin Workshop in Berlin, 3. - 5. June 2002, Mycotoxin research, in print.

Schatzmayr, G., Fuchs, E., Heidler, D., Loibner, A.P., Braun, R. and Binder, E.M. (2002b). Microbial Deactivation of Ochratoxin A. Lecture at the Conference "Mycotoxins in the environment of people and animals". 25. – 27. September 2002, Bydgoszcz. Proceeding in "Mycotoxin in the Environment of People and Animals" ISBN 83-912646-1-0, page 157-162.

Entwicklung von zertifizierten Kalibrationslösungen für die DON und ZON Analytik

R. Krska

Institut für Agrarbiotechnologie (IFA-Tulln), Abteilung Analytikzentrum,
Konrad-Lorenzstr. 20, 3430 Tulln

Several previous interlaboratory studies in the field of mycotoxin analysis revealed substantial problems shown by high between-laboratory standard deviations, and non-comparable and non-traceable results. One main reason is the lack of proper calibrants for external calibration. During a large-scale Standard Measurement and Testing (SMT) project of the European Commission (EC) dealing with the preparation and certification of reference materials for the determination of the mycotoxin zearalenone (ZON) in maize, a ZON calibrant in acetonitrile was prepared and checked for purity, homogeneity, and stability. Prior to the certification on the basis of the preparation the calibrant was checked in a mini-interlaboratory study by UV spectrophotometric determination. Associated with the spectrophotometric check the molar absorptivities of ZON in acetonitrile at 236 nm, 274 nm, and 314 nm were established. As a main result a common reference wavelength of 274 nm with a molar absorptivity of $12623 \pm 111\ L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ can be recommended for ZON in acetonitrile. Finally, on the basis of the preparation, a concentration and expanded uncertainty of the ZON calibrant of 9.95 ± 0.08 µg/mL was calculated as a preliminary value prior to the final evaluation through the certification panel of the European Commission.

A lack of comparability of measurement has also been encountered for B-trichothecene analysis as a result of the use of inappropriate calibrants. The objective of a project which started in December 2002 and which has also been funded by the EC is to develop the ability to produce and certify calibrants for their concentrations of four relevant B-trichothecenes including deoxynivalenol related to the monitoring of these mycotoxins in cereals, food and feed. Research work to be carried out within the proposed project comprises studies on isolation and characterisation of purified solid B-trichothecenes at purity levels >97%, the preparation of calibrants as test batches for future certified reference materials, the determination of molar absorption coefficients, homogeneity and stability studies and the performance of an intercomparison study which is carried out by a consortium of 5 main partners plus 9 laboratories from 7 different countries.

Neue Ansätze bei der Probenahme von Mycotoxinen

J. Stroka[1*], M. Spanjer[2], S. Buechler,[3] S. Barel[4], and E. Anklam[1]

1, Insitute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium
2, IHP Inspectorate for Health Protection, Alkmaar, The Netherlands
3, RAY Detection Technology, Tel Aviv, Israel
4, National Residue Control Laboratories, Bet Dagan, Israel
*Corresponding Author

Bei der Bestimmung von Mycotoxinen ist eine geeignete und repräsentative Probenahme der Waren von ausserordentlicher Wichtigkeit, da Kontaminationen von Lebensmitteln durch Mycotoxine durch eine hohe Inhomogenität gekennzeichnet sein können. Dies ist besonders bei Aflatoxinen der Fall.

Viele Anstrengungen wurden in der Vergangenheit gemacht, um statistisch/mathematisch korrekte Modelle ueber die Verteilung von Mycotoxinen in Lebensmitteln zu erhalten. Ziel dieser Arbeiten war es ausreichend genaue Probenahmepläne zu erstellen, die eine möglichst zuverlässige Vorhersage der Gesamtbelastung durch Mycotoxine zulassen. Diese Probennahmepläne sind überwiegend aus Berechnungen und Untersuchungen zur Verteilung von Aflatoxinen abgeleitet.
Da eine unzureichend repräsentative Probenahme fehlerhafte Analysenergebnisse zur Folge hat und zu einem mangelndem Verbraucherschutz führen kann hat der Gesetzgeber mit entsprechenden Rechtsverordnungen reagiert (z.B. EC/53/1998).
Gemäss der Richtlinie EC/53/1998 kommt es in Abhängigkeit der Menge des zu untersuchenden Lebensmittels zu Probenahmemengen von bis zu 30 kg pro Los (Wareneinheit).
Derartige Probenahmemengen gestalten eine regelmässige und möglichst lückenlose Untersuchung aller gefährdeter Güter mitunter sehr schwierig und stellt Untersuchungslaboratorien nicht nur vor große Probleme in der Probenaufarbeitung sondern auch in der Entsorgung von Lebensmittelproben.
Neue Untersuchungsergebnisse mittels zerstörungsfreier Probenahme geben Hinweise, dass die Kontrolle von Mycotoxinen mit aller Wahrscheinlich vereinfacht werden kann. Zusammen mit entsprechend einfachen und schnellen Methoden wird eine Überwachung von Lebensmitteln selbst am Probenahmeort möglich.

Poster

B-trichothecene Analysis by HPLC-FLD and post column derivatisation

G. Buttinger, R. Krska

Christian Doppler Laboratory for Mycotoxin Research, IFA-Tulln, Konrad Lorenz Str. 20, 3430 Tulln, Austria, http://www.ifa-tulln.ac.at

Fusarium graminearum, one of the most important moulds occurring on grain, produces B-trichothecenes. These trichothecenes not only cause damage by decreasing the nutritive value of the feed, leading to losses in livestock productivity, but also through their toxicity. B-trichothecenes exhibit an immuno-supressive effect. Nausea, dermatitis and gastrointestinal disorder are also signs of an intoxication.

In order to reduce prevent health risks several countries have set up guideline and action limits, which vary for food from 500 to 1000 $\mu g.kg^{-1}$ and for animal feed from 5000 to 10,000 $\mu g.kg^{-1}$.

In this study a method has been established to measure all five B-trichothecenes simultaneously in cereals following a method described by Sano [1]. The trichothecenes were extracted from the cereal with an acetonitrile/water mixture. The extract was purified by using a Mycosep™ #227 cleanup column and afterwards dried under nitrogen atmosphere.

After dissolving the trichothecenes were separated by reversed phase high performance liquid chromatography (HPLC). In a two step post column reaction the analytes were transformed into a fluorescent lutidin derivative. This derivative was quantified by fluorescence detection (FLD).

The method was validated for wheat and maize and allowed determination of the trichothecenes in the $\mu g.kg^{-1}$ range. For example the achieved recovery rate for DON in wheat was 90%. The limit of detection was 8 $\mu g.kg^{-1}$ and the limit of quantification 29 $\mu g.kg^{-1}$.

1. Sano, A.; Matsutani, S.; Suzuki, M.; Takitani,S. *Journal of Chromatography* **1987**, 410, 427-36.

Determination of Deoxynivalenol in Cereals by HPLC-UV

Ludwik Czerwiecki, Grażyna Wilczyńska
Institute of Agricultural and Food Biotechnology, Department of Food Analysis,
Rakowiecka 36, 02-532 Warsaw, Poland

Deoxynivalenol (DON) is now to be an important trichothecene because many instances of contamination of foodstuff by this toxin have been reported. DON is supposed to have a serious impact to human health. Several analytical techniques (TLC, HPLC, GC, GC-MS or HPLC-MS) are used for determination of DON. The presented method is our own modification of procedure (extraction and HPLC steps) described original by Vicam (DON-Test HPLC Instruction Manual, Vicam, May 4, 1999) and it consists of following steps: 1) extraction by blending of ground cereal grain sample with methanol, 2) evaporation in vacuum of filtered solvent aliquot and dissolving the residue in water, 3) clean-up of extract on immunoaffinity column and 4)HPLC analysis on Nucleosil C-18 column, with mobile phase consists of CH_3CN/H_2O/2- propanol (110/ 860/30), at flow rate - 0,35 ml/min, injection volume - 100 µl (loop), and UV detection at 218 nm. For improving the identification, co-chromatography was performed. For this purpose the extract was divided into two parts. Part one was chromatographed, and second one was mixed with the standard DON that was to be measured. The method was validated (table 1).

Table1 Some statistical parameters of the method (level of fortification 1000µg/kg)

Sample	DON mean conc. µg/kg	Mean recovery %	SD/CV %	LOD µg/kg	LOQ µg/kg
Wheat	668.6	66.9	50.6/7.57	10 µg/kg	50 µg/kg
Rye	684.9	68.5	35.3/5.14		
Barley	596.7	59.7	139.4/23.4		

Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) was determined by using of signals of blank reagent samples registered (n=6). These parameters were quantified as: LOD = $\overline{X}bl.$ + 3SD and LOQ = $\overline{X}bl.$ + 6SD. The linear range of DON standard and the working range of the method is 50-2000 µg/kg (r= 0,999). The above described method seems to be simple and because of its LOD and LOQ parameters my be useful for determination of DON, particularly in wheat and rye grain samples. Because of limitation in using of GC-MS or HPLC-MS for a routine practice, presented method seems to be useful for determination of this mycotoxin. By using described analytical procedure DON was analysed in 3 samples of animal feed (61; 27 µg/kg), 11 samples of malt (1229; 263 µg/kg), 3 samples of corn (12 µg/kg), 3 samples of rice (53 µg/kg) and in two samples of buckwheat flour (78 µg/kg).

On the effects of increasing deoxynivalenol (DON) concentrations in pig feed on growth performance and utilization of nutrients and of DON

S. Dänicke[1], H. Valenta[1], T. Goyarts[1], E. Razzazi[2], J. Böhm[2]

[1]Institut für Tierernährung, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Bundesallee 50, 38116 Braunschweig; e-mail: sven.daenicke@fal.de
[2] Institut für Ernährung, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien

The former German Ministry of Nutrition, Agriculture and Forestry published orientation values for critical dietary concentrations of DON for farm animals and recommended not to exceed 1 mg DON per kg pig diet in order to avoid detrimental effects on health and performance (BML, 2000).
The validity of this critical concentration is discussed quite controversial. For this reason, a dose-response study with fattening pigs was carried out covering practically relevant dietary DON-concentrations of 0.2, 0.7, 1.2, 2.5 and 3.7 mg/kg.
Control wheat and artificially with Fusarium culmorum inoculated and mainly with DON-contaminated wheat were gradually blended to give the increase in dietary DON-concentration at a total wheat content of 400 g/kg diet. Performance was recorded over a live weight range between 34 kg and 104 kg (n=18 per group). Blood was drawn from the vena jugularis after 5 weeks on the experimental diets for determination of clinical-chemical parameters and for DON-concentration. In addition, a balance study was carried out with the groups fed the diets with the lowest and the highest DON-concentration to test the combined effects which could result from the mycotoxin presence and the Fusarium caused damage of the wheat grain on nutrient digestibility and DON-metabolism. DON and its metabolite de-epoxy-DON were analyzed in physiological samples by HPLC after clean-up by immuno-affinity columns (IAC) and analyses were confirmed by HPLC/MS in selected samples.
Performance of pigs were not significantly affected by increasing dietary DON-concentrations although there was a trend for a decrease for the group fed the diet with 3.7 mg DON/kg. Serum clinical-chemical parameters, such as albumin, total protein, GLDH, ASAT, γ-GT and immune globulins were not influenced by dietary treatments. DON-concentration in serum increased in a dose-response-related manner and did clearly reflect the DON-exposure of the animals. However, a relationship to adverse effects on performance was obvious only for the group fed the diet with the highest DON-concentration.
No significant differences were measured for nutrient digestibility of the tested diets. Regarding to the DON-balance and metabolism, urine was the main excretory route where 52.3 % of the ingested DON was eliminated as the parent toxin whereas 2.6 % were excreted as the metabolite de-epoxy-DON in the group fed the diet with 3.7 mg DON/kg. The excretion of both substances accounted for approximately 98 % of the total DON-recovery with urine and feces which indicates the major role of the urinary elimination route. De-epoxy-DON accounted for approximately 5 % of the urinary excretion of de-epoxy-DON plus DON whereas in feces a ratio of approximately 97 % was found which underlines the role of the digestive tract in the metabolism of DON in the pig.

The effect of increasing concentrations of *Fusarium* toxins in diets for piglets on histological parameters of the uterus (Einfluss steigender *Fusarium*-Toxin Konzentrationen im Ferkelfutter auf histologische Parameter des Uterus)

Susanne Döll[1)], S. Dänicke[1)] und Ute Schnurrbusch[2)]

[1)] Institut für Tierernährung, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Bundesallee 50, 38116 Braunschweig

[2)] Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik, Universität Leipzig, An den Tierkliniken 29, 04103 Leipzig

The *Fusarium* toxin zearalenone (ZON), which is known to exhibit oestrogenic properties, may lead to hyperoestrogenism when it is fed to farm animals. Especially prepubertal female piglets are most susceptible to this mycotoxin. The German Federal Ministry of Nutrition, Agriculture and Forestry (BML, 2000) published orientation values for critical concentrations of ZON in diets for prepubertal female piglets of 0.05 mg/kg diet (at 88 % DM). But especially in practice problems were reported at dietary concentrations below the orientation value. Most studies on the effects of ZON on pigs focus on the uterus weight as the parameter to characterize the oestrogenic properties. This implies that changes which are not reflected by the organ weight remain undetected.
The aim of the present study was to elaborate on the effects of practically relevant concentrations of *Fusarium* toxins on the uterus of prepubertal piglets.

Uterus sections of a total of 50 prepubertal piglets which received diets containing 0.01, 0.06, 0.15, 0.22 and 0.42 mg ZON and 0.2, 0.8, 1.0, 1.9 and 3.9 mg DON/kg for *ad libitum* consumption over a feeding period of 35 ± 1.5 days, were investigated.
The reproductive tract of the animals was removed at slaughtering. The uterus was dissected, weighed and preserved in 10% formaldehyde solution buffered with $CaCO_3$. The uteri were embedded in paraffin, sectioned and stained with haematoxylin and eosin.
The uterus sections were visually evaluated and morphometric investigations were carried out without knowledge of the feeding group of the individual.

There were no marked differences in the in the general appearance of the uterus sections in between the feeding groups. The morphometric parameters investigated so far showed no statistically significant effects ($p>0.05$) of feeding diets containing increasing concentrations of *Fusarium* toxins to prepubertal piglets.

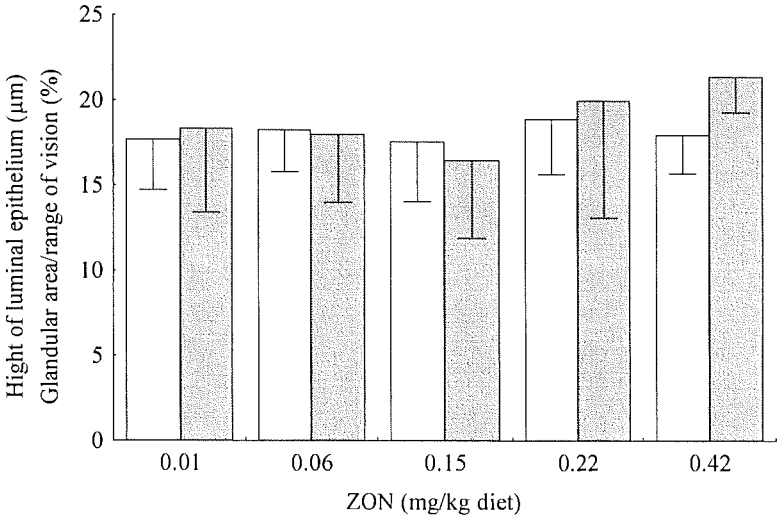


Figure: Hight of luminal epithelium (□) and glandular area per range of vision (▨) of uterus sections of prepubertal piglets fed diets containing increasing concentrations of *Fusarium* toxins (n=10).

Bestimmung von Deoxynivalenol in Brot und Bier

V. Curtui[1], C. Seidler[1], R. Dietrich[2], E. Märtlbauer[2], E. Schneider[1], E. Usleber[1]

1, Professur für Milchwissenschaften, Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität, Ludwigstr. 21, D-35390 Giessen
2, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität, Veterinärstrasse 13, D-80539 München

Brot und Bier stellen aufgrund der Verzehrsmengen einen erheblichen Anteil am Gesamtverzehr von Getreide dar und sind somit im Hinblick auf die Aufnahme von Fusarientoxinen von besonderem Interesse. In diesem Beitrag wird die Entwicklung einer enzymimmunchemischen Routinemethode zur Bestimmung von Deoxynivalenol in diesen Matrices beschrieben. Zur Validierung wurden Brot- bzw. Bierproben mittels Enzymimmuntest (EIA) bzw. HPLC/UV auf Deoxynivalenol (DON) vergleichend untersucht.

Zur Analyse von Brot mittels EIA wurde DON mit 10% Methanol/PBS extrahiert, das Filtrat mit Ethylacetat ausgeschüttelt, die organische Phase im Rotationsverdampfer eingeengt, der Rückstand mit PBS aufgenommen und im EIA eingesetzt. Bierproben wurden entgast, DON ebenfalls mit Ethylacetat extrahiert und entsprechend weiter aufgearbeitet. Hierbei wurden Nachweisgrenzen für DON von 15 µg/kg (Brot) bzw. 2 µg/l (Bier) erreicht, die Wiederfindungsraten lagen für Brot bei 81,5% (VK 14%, n=13) und für Bier bei 91,3% (VK=15%, n=14).

Die Bestimmungen mittels HPLC erfolgten aus demselben Rohmaterial unter Verwendung einer immunaffinitätschromatographischen Reinigungsmethode. Die Nachweisgrenzen der HPLC-Methode lagen bei 7 µg/kg (Brot) bzw. bei 2 µg/l (Bier). Die Wiederfindungsraten der HPLC-Methodik lagen für Brot bei 81% (VK= 6%, n=10), in Bier bei 92,5% (VK=4,5%, n=8).

Sowohl EIA- als HPLC-Methode weisen somit hinreichende Empfindlichkeit für die Untersuchung auf DON in Brot und Bier im Hinblick auf die geplanten Höchstmengen auf. Natürlich kontaminierte Brotproben (n=17) und Bierproben (n=14) wurden mittels HPLC und EIA-Methoden untersucht. Die Korrelationsfaktoren (Brot: r=0,99; Bier: r=0,92) zeigen, dass beide Methoden vergleichbare Ergebnisse liefern. Mittels EIA wurde DON in über 90% der untersuchten Brotproben (n=103) bzw. Bierproben (n=83) nachgewiesen. Die höchste DON-Belastung lag bei 375 µg/kg in Brot bzw. 41 µg/l Bier. Aufgrund dieser Ergebnisse eignet sich der EIA für eine quantitative Routineuntersuchung auf DON mit hohem Probendurchsatz.

Die Arbeiten an diesem Projekt wurden aus Mitteln des Bundesministeriums für Gesundheitlichen Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft im Rahmen des "Forschungsverbundes Fusarientoxine" (BLE 00HS055) gefördert.

Schimmelpilze und Mykotoxingehalt in Lebens- und Futtermitteln in Polen im Jahr 2001-2002

Jan Grajewski[1], Magdalena Twaruzek[1], Beata Miklaszewska[1], Katarzyna Lamkiewicz[1], Agnieszka Wozniak[1], Josef Böhm[2]
[1]Institut für Biologie und Umweltschutz, Kazimierz Wielki – Bydgoszczer Akademie Chodkiewicza-Str. 30, PL-85-064 Bydgoszcz
[2]Institut für Ernährung, Veterinärmedizinische Universität, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien

Schwierige Witterungsbedingungen während der Vegetationsdauer der landwirtschaftlichen Erzeugnisse in den letzten Jahren auf dem Gebiet Polens verursachen oft schlechtere Qualität der Rohstoffe und der fertigen Kraftfuttermittel, was mit verschiedenartigen Misserfolgen bei der Tierproduktion (vor allem bei Geflügelhaltung) verbunden ist. Vor allem Mais, der heutzutage auf dem gesamten polnischen Gebiet angebaut wird, wird oft nach Herbstfrost geerntet und bildet wegen der mangelnden Trocknungstechnologie die wichtigste Quelle des Befalls mit Schimmelpilzen und ihren Erzeugnissen. Der Zweck der Untersuchungen der Jahre 2001 – 2002 war die Beurteilung des Standes der Befalls mit Schimmelpilzen und mit den vier grundlegenden Mykotoxinen (Aflatoxin-AFLA, Ochratoxin A-OTA, Deoxynivalenol-DON und Zearelenon-ZEA) in einigen Hundert Rohstoffproben und fertigen Kraftfuttermitteln sowie in einigen Proben von Arachidnüssen, Bier und Kräutergewürzen. Die durchgeführten Untersuchungen hatten vom Prinzip her den Charakter der Intervention und wurden auf Proben durchgeführt die der Belastung verdächtigt waren.
Die Bestimmung der Gesamtzahl der Schimmelpilze wurde mittels der Flächensaat nach Koch auf YGC bestimmt. Die Mykotoxinanalyse (AFLA, OTA, ZEA) wurde mittels HPLC (Merck-Hitachi) mit Fluoreszenzdetektion und für DON mittels der immunenzymatischen Methode ELIZA durchgeführt. Die Proben nach Extraktion wurden auf den Immunaffinitätssäulen: Ochraprep, AflaTest, ZearalaTest entsprechend (Rhone-Diagnostic, Vicam) gereinigt. Für AFLA wurde das Derivationssystem mit KobraCell eingesetzt.
Es wurde ein sehr hohes Niveau der Pilze und Schimmel in der Mehrheit der analysierten Getreidekörner festgestellt (max. 4 x 10^8 KBE), in den Kraftfuttermitteln war das Niveau jedoch niedriger, was von einer entsprechenden Qualitätskontrolle des Rohstoffs zeugt. Die Mehrheit der Proben der Maiskörner war organoleptisch einwandfrei, aber das Niveau der bestimmbaren Fusariummykotoxine war sehr hoch. In den zu beurteilenden Körnern und Kraftfuttermitteln wurden alle untersuchten Mykotoxine entdeckt, aber 100% der Proben war mit DON befallen. Das höchste Befallniveau mit DON und ZEA trat in Maiskörnern auf (für DON Medianwert – 1292 und max. 16000 ppb; für ZEA Medianwert – 120 und max. 1425 ppb). In Mais wurde auch AFLA (Medianwert -4,61 und max. 20,40 ppb) entdeckt, was auf die Fehler bei der Rohstofflagerung hinweist (zu hohe Feuchtigkeit).
In rohen Arachidnüssen wurde OTA und AFLA in einem breiten Befallbereich entdeckt. In den Kräutergewürzen herrschte OTA vor. In Bier aus der lokalen Brauerei wurden in (80%) der Proben OTA bestimmt, die Werte waren jedoch sehr niedrig.
Es wurde nachgewiesen, dass vor allem Maiskörner einen extrem hohen Gehalt an *Fusarium* - Metaboliten aufwiesen. Die Belastung der Kraftfuttermittel: 12,5% AFLA, 72% OTA, 84% ZEA und 100% DON weist darauf hin, dass die Mykotoxine eine der bedeutendsten Ursachen der ständigen Misserfolge in den Tierherden waren.

Zearalenone and ergosterol contents in corn samples of Romania

Macri, A.[1], Schollenberger,[2] M., Dancea, Z. [1] and Drochner, W. [2]

[1]Institute of Veterinary medicine, University Cluj Napoca, Romania

[2] Institute of Animal Nutrition, University of Hohenheim, Germany

Maize is one of the most important grains in Europe and plays an important role in human and animal nutrition especially in Romania (FAO, 2000).

Several Fusarium species are widespread pathogens on maize in temperate and semi-tropical areas (Logrieco et al. 2002) producing several mycotoxins such as trichothecenes, zearalenone and fumonisins among others. Informations about contamination with *Fusarium* strains and *Fusarium* toxins are available about the most European maize growing areas but to our knowledge nothing is known about the situation in Romania.

70 corn samples for feed use out of the harvests of the years 2001 and 2002 were collected randomly in Transsylvania, Romania and analysed for zearalenone and for ergosterol as fungal mass indicator. Zearalenone was determined with HPLC/fluorescence detection after sample preparation with a immunoaffinity column (Schollenberger et al.,1999), ergosterol by HPLC/UV-detection after saponification according to Schwadorf and Müller (1989).

High ergosterol contents were found in some samples with a maximum value of 72 mg/kg, zearalenone contents showed values between 5 and 2500 µg/kg in samples positive, indicating a rather high degree of fungal contamination as well as a serious zearalenone contamination.

References:

Food and Agriculture Organization of the United Nation (2000). FAOSTAT Database Collections, Food Balance Sheet, http://apps.fao.org/lim500.

Logrieco, A., Mule, G., Moretti, A. and Bottalico, A. (2002). Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. European Journal of Plant Pathology 108, 597-609.

Schollenberger, M., Suchy, S., Terry-Jara, H., Drochner, W. and Müller, H.-M. (1999). A survey of *Fusarium* toxins in cereal-based foods marketed in an area of southwest Germany. Mycopathologia 147, 49-57.

Schwadorf, K. and Müller, H-M. (1989). Determination of ergosterol in cereals, mixed feed components and mixed feeds by liquid chromatography. J. Assoc Off. Anal Chem. 72, 457-462.

A survey of the occurence of fungi with mycotoxic potential in grain of Transilvania

Zoe Dancea*, Alecsandru I. Baba, Maria Virginia,
Cornel Catoi, Adrian Macri, Wienfried Drochner, Margit Schollenberger

*University of Agricultural Science and Veterinary Medicine, Cluj-Napoca
Str. Manastur, nr. 3, 3400 Cluj-Napoca, Romania

Under the ecological conditions of the central areas of Transilvania, grains are often infested with mycotoxine producer fungi. This can affects animals but also human population through the direct consuming of vegetal products as well as through the indirect consuming of food of animal provenience, from animals feeded with grains containing mycotxins.

The paper presents results of researches made on grains from farms, located in the central areas of Transilvania. The samples were collected according to the standard normes.

Following tests were done: the organoleptic properties, the analysis of the compostition based on the Weende Analysis, mycologic examinations (insemination on Sabouraud medium, thermostating at 24°C with the results expressed in spores number per gram product and indentification of the species of fungi with high frequency).

The results emphasised that over 50% of the examined grains samples presented a high degree infestation with fungi. Constantly, these could be correlated with high humidity caused by the climatic condition, harvesting, drying and inadequate storage. The prevalent fungi species were from the species Fusarium, Aspergillus, Alternaria, Penicillium.

In parallel, tests on 1-50 days old Broiler chickens were done. These were feeded with combined feedingstuffs, containing over 8% wheat infested with Fusarium graminearum Schw. Compared with the control sample, the tested sample presented a retarded growth and the decreasing of the proteins digestive use coefficient as well as of the azote use coefficient.

Fusarium mycotoxins in cereals grown in Switzerland

Andreas Gutzwiller, Walter Glauser, Jean-Louis Gafner
Federal Research Station for Animal Production, CH - 1725 Posieux

In cereal collection centres and feed mills in different parts of Switzerland 417 cereal samples were collected in the years 2000 and 2001, and 353 in the year 2002.
All samples were assayed for deoxynivalenol (DON) and zearalenone, and 137 samples were also analysed for T-2 toxin. When >500 µg/kg DON, >100 µg/kg zearalenone or >100 µg/kg T-2 toxin were detected with the ELISA assay, the samples were analysed again using GC-MS for DON and T-2 toxin and HPLC for zearalenone.

Table 1. Percentage of randomly sampled cereals of Swiss origin contaminated with either <200, 200-500 or > 500 µg/kg DON (ELISA method).

year	**2000 and 2001**				**2002**			
cereal	**n**	<200	200-500	>500	**n**	<200	200-500	>500
wheat	**199**	89%	9%	2%	**193**	69%	20%	11%
triticale	**49**	47%	31%	22%	**71**	42%	38%	20%
barley	**137**	95%	5%	0%	**46**	78%	15%	7%
oats	**15**	67%	7%	27%	**27**	100%	0%	0%
rye	**17**	82%	18%	0%	**16**	88%	12%	0%

Table 2. Percentage of randomly sampled cereals of Swiss origin contaminated with either <50, 50-100 or > 100 µg/kg zearalenone (ELISA method).

year	**2000 and 2001**				**2002**			
cereal	**n**	<50	50-100	>100	**n**	<50	50-100	>100
wheat	**199**	96%	4%	0%	**193**	90%	5%	4%
triticale	**42**	74%	19%	7%	**71**	77%	11%	11%
barley	**137**	93%	7%	0%	**46**	98%	2%	0%
oats	**15**	13%	87%	0%	**27**	100%	0%	0%
rye	**17**	100%	0%	0%	**16**	81%	19%	0%

The highest percentage of samples contaminated with significant DON and zearalenone levels (>500 µg/kg and > 100 µg/kg) occurred in triticale (tables 1 and 2). The percentage of wheat and barley samples contaminated with significant DON levels was higher in 2002 than in the previous years, reflecting the favourable growth conditions for *Fusarium* during the rainy summer 2002. DON levels > 1 mg/kg were found in 1% of wheat samples and in 5 % of triticale samples using the GC-MS detection method; zearalenone levels > 200 µg/kg were found in 0.5 % of wheat and in 6% of triticale samples using the HPLC detection method.
Three of seven analysed oats samples contained >100 µg/kg T-2 toxin (confirmed by GC-MS), whereas all other samples analysed for T-2 toxin contained < 100 µg/kg (ELISA). T-2 toxin contamination does not seem to be widespread under Swiss cereal growing conditions.

With the exception of triticale the percentage of samples which are contaminated with *Fusarium* toxins is considered to be low. The risk of fusariotoxicosis in animals that consume compound feeds formulated with cereals grown in Switzerland cereals therefore seems to be quite small.

Vorkommen von Ochratoxin A in Gerste, Malz und Bier in der Türkei

Tuncay Gümüs **Muhammet Arici** **Mehmet Demirci**

Institute für Lebensmittelingenieurwesen, Landwirtschaftliche Fakultät, Trakya Universität, TR-59030 Tekirdag, Türkei

Das Ochratoxin A (OA) ist ein Sekundärstoffwechselprodukt einer Vielzahl von Schimmelpilzen (z.B. *Aspergillus ochraceus* und *Penicillium verrucosum*) in den Lebens- und Futtermitteln weitverbreitet. Die meisten Daten bezüglich des natürlichen Auftretens von OA wurden von Europa, besonders aus skandinavischen Ländern, Deutschland und Balkanländern erhalten. In der Türkei wurden begrenzte Forschungen über OA in Lebensmitteln durchgeführt. Jedoch ist eine zugelassene Begrenzung (5 µg/kg für unverarbeitete Getreide, 3 µg/kg bzw. µg/L für verarbeitete Getreideprodukte) durch das Ministerium der Landwirtschaft 2002 angegeben worden.

In dieser Arbeit wurden 150 Bierproben, davon 15 Proben von importierten Bieren, aus Tekirdag Provinz durch Zufallsstichprobe gesammelt. Die Gerste Proben (30 Proben) wurden von Bahri Dagdas International- Wintergetreide-Forschungszentrum und die Malzproben (25 Proben) von drei unterschiedlichen Firmen genommen.

Die quantitativen Analysen von Ochratoxin A (OA) wurden in Gerste, Malz- und Bierproben mittels Elisa-Methode (RIDASCREEN) durchgeführt. In 27 aus 30 Gersteproben wurde ein OA-Gehalt zwischen 0,22 und 12 µg/kg festgestellt. In 24 aus 25 Malzproben wurde OA zwischen 0,2 und 6,6 µg/kg gefunden (96 %). In nur einer Probe konnte kein OA nachgewiesen werden. Die OA Gehalte waren zwischen 0,08 und 8,10 µg/L in 53 (35,34 %) aus 150 Bierproben. In 97 (64,66 %) von diesen Bierproben waren OA Gehalt auf nicht nachweisbarem Niveau. Nur eine Bierprobe enthielt mehr als 5 µg/L.

Trichothecenresistenz in Weizen: Entwicklung molekularer Marker für *PDR* (pleiotropic drug resistance) Gene

R. Mitterbauer[1], M. Heinrich[1], R. Rauscher[1], M. Lemmens[2], H. Bürstmayr[2], G. Adam[1*]

1, Zentrum für Angewandte Genetik, Universität für Bodenkultur, Wien, Austria
2, Interuniversitäres Forschungsinstitut für Agrarbiotechnologie (IFA), Tulln, Austria
*, Corresponding Author

Die wichtigsten Erreger der Ährenfusariose bei Getreide sind *Fusarium graminearum* und *F. culmorum*. Schwere Epidemien können nicht nur zu beachtlichen Ertragseinbußen sondern auch zur Kontamination des Ernteguts mit *Fusarium*-Mykotoxinen wie den Trichothecenen führen. Trichothecene, deren bedeutendster Vertreter das Deoxynivalenol (DON) ist, inhibieren die eukaryontische Protein-Biosynthese und spielen für den Pathogen vermutlich eine wichtige Rolle als Suppressoren der pflanzlichen Abwehrreaktion. Mutanten des Pilzes, die unfähig sind Trichothecene zu bilden, sind weniger virulent. Bei Weizen ist die Feldresistenz gegen *Fusarium* korreliert mit der *in vitro* Resistenz gegen DON. Toxinresistenz scheint somit eine wichtige Komponente der *Fusarium*-Resistenz zu sein. Bisher ist sehr wenig über molekulare Mechanismen der Resistenz bekannt.
Für das eukaryontische Modellsystem *Saccharomyces cerevisiae* konnten wir zeigen, daß die Expression des Gens *PDR5* (pleiotropic drug resistance) verantwortlich für die hohe basale DON-Resistenz der Hefe ist. Das Genprodukt von *PDR5* wirkt als plasmamembran-lokalisierte, ATP-abhängige Effluxpumpe mit breiter Substratspezifität und verleiht Resistenz gegenüber einer Vielzahl toxischer Substanzen. Eine Analyse der vollständig sequenzierten Genome von *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* zeigt, dass *PDR*-Gene auch in Pflanzen vorkommen: 15 Gene in *A. thaliana*, etwa 25 Gene (inklusive möglicher Pseudogene) in *O. sativa*. Die physiologische Relevanz der entsprechenden Proteine ist noch nicht geklärt, eine Rolle in der Toxin-Resistenz ist jedoch naheliegend.
Ziel dieses Projektes ist die Entwicklung molekularer Marker für *PDR*-Gene in Weizen für die pflanzenzüchterische Anwendung (Marker-gestütze Selektion). Zur Kartierung der *PDR*-Kandidatengene stehen zwei experimentelle Kreuzungspopulationen (Doppelhaploide) bereit, die einerseits die brasilianische Sorte Frontana bzw. andererseits die chinesische Sorte Sumai3 als resistenten Elternteil enthalten.
Die Entwicklung der Marker erfolgt auf der Basis von Sequenzdaten aus der Weizen-dbEST (database of expressed sequence tags), die in Summe bereits mehr als 415.000 Einträge für *Triticum aestivum* aufweist. Erschwerend für das Unterfangen sind nicht nur die teilweise niedrige Qualität der Einträge, sondern vor allem die Genomstruktur des allohexaploiden Weizens. Es sind jeweils drei homeoallele Sätze von etwa 25 *PDR*-Genen im Genom des Weizens zu erwarten. Das hohe Maß an Konservierung innerhalb der Genfamilie, besonders aber innerhalb der Homeoallele (> 97 % Idendität bzgl. der Nukleotid-Sequenz) macht es sehr schwierig SCAR (sequence characterized amplified region)- Marker anhand Locus-spezifischer Oligos zu generieren. Als potente Methode zur Detektion von Unterschieden zwischen Sorten (single nucleotide polymorphism) hat sich die SSCP (single-strand conformational polymorphism)-Analyse erwiesen.

Fusarientoxine in Thüringer Getreide, Getreideerzeugnissen und Futtermitteln - Ergebnisse des Jahres 2002

U. KIRCHHEIM, H. HARTUNG, L. HEROLD und B. MEIXNER

Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Naumburger Straße 98, 07743 Jena

In den letzten 10 bis 15 Jahren haben die Probleme durch Pilzbefall, insbesondere durch Ährenfusarien, zugenommen. Die gebildeten Mykotoxine - bedeutsam sind v. a. Deoxynivalenol (**DON**) und Zearalenon (**ZEA**) - können die Verarbeitungseigenschaften des Getreides (Back-, Malzqualität) sowie die Gesundheit und damit das Leistungspotential landwirtschaftlicher Nutztiere beeinträchtigen.
Im Rahmen des Thüringer Fusarientoxin-Monitorings wurden auch in 2002 entsprechend der Getreideanbaustruktur im Freistaat insgesamt 307 Getreideproben (Winterweizen, Winterroggen, Wintertriticale, Winter-, Sommergerste) auf ihren Gehalt an **DON** und **ZEA** untersucht. Integriert in diese Untersuchungen waren ebenso Getreidemuster (n = 21, Winterweizen) des ökologischen Landbaus. Komplettiert wurde das Monitoring mit Fusarientoxinanalysen in speziellen Futtermitteln (n = 40; Mais, Kleien, Hafer). Die **DON**-Analytik erfolgte mittels kompetitivem ELISA (Getreide- und Öko-Proben; Fa. Biopharm, Nachweisgrenze [NWG] - 111 µg/kg) bzw. mittels LC/MS (Futtermittel, NWG - 50 µg/kg). **ZEA** wurde mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion (NWG - 20 µg/kg, Ernte 1998) bzw. kompetitivem ELISA (Fa. Biopharm, NWG - 25 µg/kg bestimmt.
Auch in 2002 war **DON** das dominierende Toxin, der Kontaminationsgrad in etwa vergleichbar mit dem des „Fusarienjahres"1998. Am stärksten betroffen waren wiederum Weizen und Triticale. So wiesen 17 % bzw. 37 % der Weizen- bzw. Triticaleproben DON-Gehalte größer 1 ppm auf. Ein ähnliches Niveau wie 1998 war bei den Triticalen im Maximalwert, beim Weizen im Median zu beobachten. Die DON-Gehalte in der Wintergerste lagen auf dem Level des Weizens, dagegen waren Roggen und Sommergerste weniger kontaminiert.
Wiederum waren in den Getreidemustern (vorwiegend Weizen) aus ökologischem Anbau insgesamt geringere **DON**-Gehalte feststellbar (Tabelle).

Tab.: DON - Gehalte in konventionell (konv.)und ökologisch (ökol.) erzeugtem Getreide (positive Proben)

	Anteil (%)			Median (ppm)			Maximum (ppm)		
	2002	**2001**	**1998**	**2002**	**2001**	**1998**	**2002**	**2001**	**1998**
Triticale	86	60	75	0,74	0,76	1,55	12,70	2,70	13,50
W-Weizen									
konv.	88	40	71	0,50	0,28	0,61	4,90	1,90	11,08
ökol.	48	23	54	0,32	0,14	0,46	1,20	0,52	4,01
W-Gerste	76	n. a.[1)]	n. a.	0,51	n. a.	n. a.	1,80	n. a.	n. a.
S-Gerste	20	51	n. a.	0,17	0,16	n. a.	0,64	0,95	n. a.
Roggen	48	24	34	0,22	0,16	0,23	2,10	0,34	2,94

[1)] n. a. – nicht analysiert

Effects of the botanical composition and weather conditions on mycotoxins in winter forage from grassland

Harald Laser, Wilhelm Opitz v. Boberfeld, Katrin Wöhler, Daniel Wolf
Justus-Liebig-University Giessen – Dep. of Grassland Management and Forage Production, Ludwigstr. 23, D-35390 Giessen

In Central European grassland mycotoxins are usually not detectable in herbage of spring and summer growth, but in the course of the growth period it is more likely that toxins like zearalenone and ochratoxin A occur (OPITZ V. BOBERFELD et al. 2000). Regarding animal health, this could pose a problem for low-input grassland systems in late autumn or winter (= extension of the grazing period or year-round outdoor-keeping to improve productivity by reducing costs for conserves and stables). Pure stands of *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne* were observed under standardized conditions in experiment 1 (OPITZ V. BOBERFELD & WOLF 2002), experiment 2 was focused on forage quality of mixed swards considering the plant communities *Lolio-Cynosuretum* and *Festuco-Cynosuretum* in ten different locations in altitudes from 320 to 475 m above sea level (OPITZ V. BOBERFELD & WÖHLER 2002). In both experiments, samples of three successive years were analysed to compare the effects of different courses of weather on fungal infections and mycotoxins. Samples were taken mid of December. The ergosterol concentration in herbage -determined to estimate the extend of fungal infections- was measured by HPLC (= UV detector) after saponification in petrolether. The concentrations of zearalenone and ochratoxin A were determined by HPLC using an immuno-affinity column at a flourescence detector. The extend of fungi infection– estimated by the concentration of ergosterol – was higher for *Lolium perenne* than for *Festuca arundinacea.* Apparently, flattened *Lolium perenne* leaves in ground level lay themselves more open to attack and affort a suitable microclimate for fungi. Analogously, the *Lolio-Cynosuretum* communities are more liable to fungi infections than *Festuco-Cynosuretum* plant communities. However, high amounts of ergosterol are no indication for high mycotoxin concentrations in herbage. In some cases the mycotoxins ochratoxin A und zearalenone were detected. Zearalenone is only detectable in few pure stands of *Lolium perenne* (= max. 0.02 mg kg^{-1} DM) or in *Lolio-Cynosuretum* plant communities (= max. 0.17 mg kg^{-1} DM), respectively. The occurrence of this toxin in individual swards is not intermittent over the years. Swards with relatively high zearalenone concentrations might have non-detectable values twelve month later. The occurrence of ochratoxin A is more frequent and less specific concerning the botanical composition. This mycotoxin was found in both, *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea* in varying years. The incidence of this toxin in mixed swards is apparently related to the weather conditions in autumn and winter. After the relatively moist and mild course of weather before December 2000 ochratoxin A was found in the majority of the samples whereas it was only detectable in few samples in 2001 with a more dry summer and a cool November and December. There was no evidence that particular locations have a higher or a lower risk for high ochratoxin A concentrations than others. This could be emphasized by the sward with maximum concentration (= 0,096 mg ochratoxin A kg^{-1} DM) in 1999 and null detection in 2001.

References

OPITZ v. BOBERFELD, W., H. SCHRÖDER and H. LASER, 2000: The effect of cutting date on herbage quality in extensive grassland systems. - Grassl. Sci. Europe 5, 170-172.
OPITZ v. BOBERFELD, W. und D. WOLF, 2002: On the effect of agronomical actions on DM-yield and quality of autumn-saved forage. - German J. Agron. 6, 9-16.
OPITZ v. BOBERFELD, W. and K. WÖHLER, 2002: Forage quality of low input winter pastures under varying conditions in central Germany. - Grassl. Sci. Europe 7, 222-223.

Zum Einfluß von Mutterkorn im Futter auf die Wachstumsleistung von Absetzferkeln und Masthähnchen

S. Mainka [1], S. Dänicke [1], J. Wolff [2], H. Böhme [1], G. Flachowsky [1]

[1] Institut für Tierernährung der FAL, Bundesallee 50, D- 38116 Braunschweig
[2] Institut für Biochemie von Getreide und Kartoffeln der BAGKF, Schützenberg 12, D- 32756 Detmold

Zur Toxizität von Mutterkorn (*Claviceps purpurea*), insbesondere in Abhängigkeit vom Alkaloidgehalt und -muster, liegen in der Literatur bisher kaum Erkenntnisse vor. Vor diesem Hintergrund wurden Orientierungsversuche an Ferkeln und Masthähnchen durchgeführt, um zunächst anhand der Wachstumsleistung die Wirkung von Mutterkorn mit definiertem Alkaloidgehalt und –muster zu ermitteln.

In beiden Versuchen enthielten die Futtermischungen identische Mutterkorngehalte (**0 / 0,05 / 0,1 / 0,2 / 0,4 %**) der selben Mutterkorncharge (Sklerotien von *Claviceps purpurea* aus der Roggenernte 2002). Das Mutterkorn wurde nach vorherigem Mahlen und Homogenisieren den einzelnen Futtermischungen zugelegt und unpelletiert an Ferkel bzw. Masthähnchen verfüttert. Sowohl das reine Mutterkorn als auch die Futtermischungen wurden auf die Gesamtalkaloidgehalte sowie auf deren Gehalte an Ergometrin, Ergotamin, Ergocornin, Ergocryptin und Ergocristin nach KLUG, (1986), modifiziert durch WOLFF (1988) untersucht.

Das Alkaloidmuster des reinen Mutterkorns setzte sich bei einem Gesamtalkaloidgehalt von 279 µg/ 100 mg wie folgt zusammen: Ergometrin: 8 %; Ergotamin: 5 %; Ergocornin: 3 %; Ergocryptin: 2 %; Ergocristin: 15 %; Rest: 67 %.

Tabelle 1: Mittlere Wachstumsleistungen der Gruppen (I – V) im Ferkel- und Hähnchenversuch mit Angabe der Mutterkorngehalte in den jeweiligen Futtermischungen (%)

Ferkel	**I** (0 %)	**II** (0,05 %)	**III** (0,1 %)	**IV** (0,2 %)	**V** (0,4 %)
Futterverzehr (g / Tier und Tag)	676 [a]	607 [ab]	635 [a]	655 [a]	556 [b]
LM- Zuwachs (g / Tier und Tag)	413 [a]	390 [ab]	420 [a]	443 [a]	347 [b]
Futteraufwand (kg / kg LM- Zuwachs)	1,64	1,57	1,53	1,48	1,62
Hähnchen	**I** (0 %)	**II** (0,05 %)	**III** (0,1 %)	**IV** (0,2 %)	**V** (0,4 %)
Futterverzehr (g / Tier und Tag)	46,1	45,9	45,3	45,1	46,9
LM- Zuwachs (g / Tier und Tag)	32,6	31,8	31,7	32,2	32,2
Futteraufwand (g / g LM- Zuwachs)	1,42	1,44	1,43	1,40	1,50

Im Ferkelversuch war die Wachstumsleistung der Gruppe V im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie zu den Gruppen III und IV signifikant reduziert. Bei den Masthähnchen konnte hingegen kein signifikanter Effekt der Mutterkornzulage auf die Wachstumsleistung beobachtet werden (Tabelle1).

KLUG, C. (1986): Max von Pettenkofer- Hefte **2**
WOLFF, J. (1988): ZUL- Veröffentlichung **27** (1), 1 – 22.

Deoxynivalenolgehalte in Lebensmitteln aus konventioneller und ökologischer Produktion

Schollenberger, M., Müller, H.-M. und Drochner, W.

Institut für Tierernährung der Universität Hohenheim,
Emil-Wolff-Str. 10, 70599 Stuttgart

Um die Produktionsformen des "ökologischen Landbaus" zu definieren, hat die Europäische Gemeinschaft eine Verordnung erlassen, die den rechtlichen Rahmen festlegt (1). Ökologisch erzeugte Lebensmittel auf Getreidebasis unterschieden sich von konventionellen durch die Erzeugung des zur Herstellung eingesetzten Getreides sowie ggf durch andere Herstellungsverfahren, die durch einen Verzicht auf Zusatzstoffe bedingt sein können (2).

Zur Belastungssituation von Lebensmitteln aus ökologischem und konventionellem Anbau mit Trichothecenen existieren wenige Studien, die teilweise auf geringen Probenzahlen basieren. Daher wurden in der vorliegenden Untersuchung Vorkommen und Gehalt der Trichothecene Nivalenol (NIV), Deoxynivalenol (DON), Fusarenon-X (FUS), 15-Acetyldeoxynivalenol (15-ADON), 3-Acetyldeoxynivalenol (3-ADON), HT-2 Toxin (HT-2) und T-2 Toxin (T2) in Weizenmehlen sowie Brot und Nudeln aus ökologischem und konventioneller Produktion verglichen. Die Proben stammten aus dem Lebensmittelhandel im Großraum Stuttgart. Die Bestimmung der Trichothecene erfolgte mittels GC/MS nach Probenaufarbeitung mit Festphasenextraktion, die Nachweisgrenzen für die Toxine lagen zwischen 1 und 12 µg/kg.

Von den analysierten Toxinen wurde Deoxynivalenol in den untersuchten Lebensmittelgruppen mit der größten Häufigkeit und mit den höchsten Gehalten bestimmt. Beim Vergleich der anderen Trichothecene hinsichtlich Vorkommen und Gehalten ergaben sich keine eindeutigen Unterschiede zwischen Lebensmitteln aus ökologischer und konventioneller Produktion.

Um die Toxinaufnahme des Verbrauchers mit Mykotoxinen abzuschätzen, wurde gemäß SCOOP (3) ein korrigierter Mittelwert für die Toxinaufnahme unter Einbeziehung der negativen Proben mit dem Wert der halben Nachweisgrenze vorgeschlagen. In der vorliegenden Untersuchung ergaben sich für die Produktgruppen Brot und Weizenmehl für die ökologischen Produkte niedrigere korrigierte mittlere Gehalte als für die entsprechenden konventionellen Produkte, für die Produktgruppen Nudeln lagen die Werte für die konventionellen Produkte unter denen der ökologisch erzeugten. Die medianen Gehalte der ökologisch erzeugten Lebensmittel lagen für alle drei Produktgruppen unter denen der konventionell erzeugten.

Literatur:

1. Verordnung (EWG) Nr. 2092/91 des Rates vom 24. Juni 1991 über den ökologischen Landbau und die entsprechende Kennzeichnung der landwirtschaftlichen Erzeugnisse und Lebensmittel, Amtsblatt Nr L198 vom 22/07/1991, 1-15.

2. Woese, K., Lange, D., Boess, Ch. Und Bögl, K. W. (1997) A Comparison of Organically and Conventionally Grown Foods - Results of a Review of the Relevant Literature. J. Sci. Agric. **74**, 281-293.

3. Directorate - General Health and Consumer Protection of the European Commission, - Reports on tasks for scientific cooperation, January 2002, Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU member States (SCOOP).

Mykotoxine in Hartweizen

Andreas Brockmeyer und Gerhard Thielert

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Sigmaringen,
Hedingerstr. 2/1, 72488 Sigmaringen

Die Bundesrepublik Deutschland hat einen Entwurf einer Verordnung zur Änderung der Mykotoxin-Höchstmengenverordnung und der Diätverordnung vorgelegt, in der unter anderem für die Mykotoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA) Höchst-mengen in Lebensmitteln vorgesehen werden. Für DON wird dabei in Speisegetreide, Getreideerzeugnisse und Teigwaren eine Höchstmenge von 500 µg/kg festgesetzt. Ausgenommen von der Rechtsetzung sollen Hartweizen und Hartweizenerzeugnisse sein. Begründet wird diese Ausnahme durch eine fehlende ausreichende Datengrund-lage zur Festsetzung eines Höchstwertes für diese Produkte.
Die Europäische Kommission hat „action levels" von 500 µg/kg für Getreide und Getreideprodukte im Handel sowie 750 µg/kg für Mehl, das als Zutat (Rohmaterial) zu Lebensmitteln verwendet wird, empfohlen. Diese „action levels" sind seit dem Jahr 2000 auch in den Niederlanden in Gebrauch und führten dazu, dass am Anfang des Jahres 2001 Teigwaren aus Baden-Württemberg im Schnellwarnsystem der EU mit überhöhten Gehalten an DON gemeldet wurden.
Daraufhin wurde in Baden-Württemberg verstärkt die Untersuchung von Hartweizen-grieß auf DON in die amtliche Lebensmittelüberwachung einbezogen. Da es im „Ländle" eine Vielzahl von Teigwarenherstellern gibt, wurde der Rohstoff Hartweizengrieß in der Regel direkt bei den Herstellern entnommen.
Die Ergebnisse der Untersuchungen aus dem Jahr 2001, 2002 und 2003 werden dargestellt. Zum Teil wurden sehr hohe Belastungen (Maximalwert 2180 µg/kg DON) festgestellt. Weiterhin zeigen die Untersuchungen, dass auch Chargen bei den Herstellern zur Verarbeitung kommen, die nicht oder nur relativ gering belastet sind. Daraus wird deutlich, dass durch geeignete Eigenkontrollen von Mühlen bzw. von Herstellern durchaus eine Einhaltung der geplanten Höchstmenge von 500 µg/kg möglich sein müsste.

Teigwaren werden häufig auch von Kindern in großem Umfang verzehrt. Die DON-Gehalte aus Hartweizen werden nahezu ohne Verdünnung in die Teigwaren über-nommen. Aufgrund der hohen Verzehrsmenge von Getreide und Getreideprodukte kann in ungünstigen Fällen von einer Erreichung bzw. sogar von einer gelegentlichen Überschreitung der tolerierbaren täglichen Aufnahmemenge bei einer Höchstmenge von 500 µg/kg ausgegangen werden. Aus diesem Grund ist eine Reduzierung der Kontamination von Getreide – insbesondere Hartweizen (Durum) - durch Deoxynivalenol dringend geboten.
Ein Großteil der Untersuchungen gehen in das Projekt „Analytik und Vorkommen wichtiger Fusarientoxine (Deoxynivalenol und Zearalenon) sowie Aufnahme dieser Toxine durch den deutschen Verbraucher", das von der Bundesanstalt für Landwirt-schaft und Ernährung (BLE) gefördert wird, ein.

Fusarientoxine im Brotgetreide des Landes Brandenburg - Vergleich von integriertem und ökologischem Anbau, 2000-2002

Ute Meister
IGV Institut für Getreideverarbeitung GmbH, Arthur-Scheunert-Allee 40-41,
D-14558 Bergholz-Rehbrücke

Weizen- und Roggenproben aus integriertem sowie aus ökologischem Anbau des Landes Brandenburg werden im Institut für Getreideverarbeitung seit vielen Jahren hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffe, ihrer teigrheologischen- sowie ihrer Mahl- und Backeigenschaften untersucht. In den Jahren 2000, 2001 und 2002 wurden diese Proben zusätzlich mittels HPLC auf die Fusarientoxine Deoxynivalenol und Zearalenon (Nachweisgrenzen: 0,05 mg/kg bzw. 3 µg/kg) untersucht. Es wurden jeweils ca. 60 Weizen- und ca. 60 Roggenproben von Landwirten aus allen Landkreisen des Landes Brandenburg eingeholt; die Probenanzahl je Landkreis orientierte sich am Ernteaufkommen. Ökologische Proben wurden verstärkt untersucht, um gesicherte Aussagen über ihre Qualität treffen zu können.

Wie die Untersuchungen zeigten, war die Belastung der Ernte 2002 mit Fusarientoxinen im Land Brandenburg höher als in den Jahren 2000 und 2001. In den Jahren 2000 und 2001 war eine sehr niedrige Fusarientoxinkontamination zu verzeichnen, die sicherlich auf die warme und trockene Witterung zum Zeitpunkt der Blüte zurückzuführen ist. 2000 enthielten lediglich 5% der 63 Weizen- und 16% der 61 Roggenproben DON (Weizen 0,05 - 0,28mg/kg, Roggen 0,05 - 0,20 mg/kg). Nur 1 Weizenprobe enthielt Zearalenon (18,5µg/kg). Alle DON-haltigen Weizen- und Roggenproben stammten aus integriertem Anbau.

Auch 2001 war die Belastung der Ernte im Land Brandenburg mit Fusarientoxinen gering. Lediglich 22% der 59 Weizen- und 16% der 62 Roggenproben enthielten DON (Weizen: 0,05 - 1,35 mg/kg, Mittelwert 0,29 mg/kg, Median 0,08 mg/kg; Roggen: 0,05 - 0,42 mg/kg, Mittel-wert 0,14 mg/kg, Median 0,06 mg/kg). Nur 2 Weizenproben überschritten den Grenzwertent-wurf von 0,50 mg/kg. Die Zearalenonbelastung der Ernte 2001 war noch geringer. Lediglich 14% der Weizenproben enthielten Zearalenon (3,8 - 67,5µg/kg, Mittelwert 14,1µg/kg, Median 7,9 µg/kg); nur 1 Probe überschritt den Grenzwertentwurf von 50 µg/kg. Im Roggen wurde kein Zearalenon nachgewiesen. Trotz der insgesamt geringen Belastung waren wieder Unter-schiede zwischen den Proben aus ökologischem und integriertem Anbau festzustellen. Von 13 DON-haltigen Weizenproben stammten 12, von 10 DON-haltigen Roggenproben 9 aus integriertem Anbau. Die DON-Gehalte der Proben aus ökologischem Anbau lagen knapp oberhalb / an der Nachweisgrenze; Zearalenon war nicht nachweisbar.

2002 war die Belastung der Ernte mit Fusarientoxinen höher. 62% der 60 Weizen- und 24% der 68 Roggenproben enthielten DON (Weizen: 0,05 - 4,87 mg/kg, Mittelwert 0,41 mg/kg, Median 0,20 mg/kg; Roggen: 0,05 - 0,75 mg/kg, Mittelwert 0,19 mg/kg, Median 0,12mg/kg). 8 Weizen- und 1 Roggenprobe überschritten den Grenzwertentwurf für DON. Zearalenon war in 45% der Weizen- und in 7% der Roggenproben nachweisbar (Weizen: 3,1 - 447,1 µg/kg, Mittelwert 42,6 µg/kg, Median 16,6 µg/kg; Roggen: 6,5-121,9 µg/kg, Mittelwert 34,2 µg/kg, Median 7,7µg/kg). 5 Weizen- und 1 Roggenprobe überschritten den Grenzwertentwurf von 50 µg/kg. Wie schon 2000 und 2001 waren auch 2002 Unterschiede zwischen ökologischem und integriertem Anbau festzustellen: Von 37 DON-haltigen Weizenproben stammten 31, von 16 DON-haltigen Roggenproben alle aus integriertem Anbau. Von 27 Zearalenon-haltigen Weizenproben stammten 24, von 5 Zearalenon-haltigen Roggenproben alle aus integriertem Anbau.

Nachweis von Citrinin in OTA-haltigen Produkten mit einer neu entwickelten HPLC- Methode

Ute Meister
IGV Institut für Getreideverarbeitung GmbH, Arthur-Scheunert-Allee 40-41,
D-14558 Bergholz-Rehbrücke

Das Mykotoxin Citrinin ist wie Ochratoxin A (OTA) nierenschädigend und möglicherweise auch für den Menschen kanzerogen. Im Tierversuch (Ratten) wurden Nierentumore erzeugt; in in vitro-Testsystemen zeigte Citrinin ähnlich wie Ochratoxin A ein genotoxisches Potential. Citrinin kann gemeinsam mit Ochratoxin A von Schimmelpilzen der Gattungen Penicillium und Aspergillus auf vielen landwirtschaftlichen Produkten gebildet werden und die Gesundheit von Mensch und Tier gefährden. Aber auch Stämme der Gattung Monascus sind in der Lage, Citrinin zu bilden.
Citrinin wurde bisher im Vergleich zu OTA wenig Beachtung geschenkt, was möglicherweise auf die schlechtere analytische Bestimmbarkeit zurückzuführen ist. In vielen Publikationen wird von analytischen Schwierigkeiten und der Instabilität des Toxins berichtet. Das Gesamtziel der Projektbearbeitung im Auftrag des Bundesministeriums für Verbraucher-schutz, Ernährung und Landwirtschaft bestand daher in der Entwicklung einer zuverlässigen und empfindlichen HPLC-Methode zur Citrininbestimmung im unteren µg/kg-Bereich, vorzugsweise in Getreide und Getreideprodukten.
Es wurde eine neue HPLC-Methode auf der Basis einer Festphasenextraktion an Polyamid-Säulen entwickelt und validiert. Durch die intensive Beschäftigung mit der Problematik der Citrininanalytik ist es gelungen, eine Methode zu erarbeiten, mit der Citrinin in Getreide-proben mit ausreichender Wiederfindungsrate sowie mit guter Nachweisempfindlichkeit und Präzision analysiert werden kann. Bei ausreichender Übung und Beherrschung der Methodik können präzise Ergebnisse, d. h. Variationskoeffizienten < 10 % erreicht werden. Die mittleren Wiederfindungsraten lagen bei 74 - 90 %. Die nach DIN 32645 ermittelten Nachweisgrenzen der neu entwickelten Methode lagen bei guter Präzision (Verfahrens-Standardabweichung 4-7 %) für Weizen, Roggen, Gerste, Mais und Hafer bei 1 µg/kg.
Die Untersuchung diverser OTA-haltiger Proben mit dieser neu entwickelten HPLC-Methode zeigte, dass Citrinin relativ häufig neben OTA nachweisbar ist, vor allem in Getreide-produkten wie Kleien, Nachmehlen und Futtermehlen, die einen größeren Anteil der äußeren Randschichten des Getreidekornes enthalten. Aber auch in Kakaoschalen und Rosinen war Citrinin neben Ochratoxin A enthalten (Bestätigung durch EIA, Universität München). In 14 OTA-haltigen Proben wurde Citrinin mit der neuen HPLC-Methode in Größenordnungen von ca. 1 - 8 µg/kg nachgewiesen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Citrinin auch in Rotschimmelreis mit der neu entwickelten Methode bestimmbar ist.

Das Poster gibt einen Überblick über die erzielten Ergebnisse.

Effect of deoxynivalenol (DON) on growing pigs and its modification by modified yeast cell wall or modified yeast cell wall and bentonite

Shehata, S.[1]; Richter, W.[2ITE]; Schuster, M. [2AQU]; Lindermayer, H.[2ITE]

1 Dept. of Animal Prod., Fac. of Agric., Zagazig University , Zagazig , Egypt.
2 Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft (ITE), Prof.-Dürrwaechter-Platz 3, 85586 Poing. Tel. 08999141 – 430 ; Telefax 08999141 – 412; e – mail: wolfgang.richter@LfL.bayern.de
Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen (AQU)
Prof. Zorn Straße 20c 85586 Poing

The prevention of deoxynivalenol (DON) toxicity in growing pigs was examined by feeding two adsorbents. Adsorbent I (AI) was, modified yeast cell wall + vitamins mixture + plant oil refined and adsorbent II (AII) was, bentonite + enzymes + modified yeast cell wall + vitamin E + trace elements. 24 male growing pigs (average initial body weight 11.5 kg) were assigned to one of six dietary treatments: control (uncontaminated diet); control + 0.5% AI; DON contaminated diet (1.73 mg / kg); DON contaminated diet + 0.5 % AI; control + 0.5% AII and DON contaminated diet + 0.5 % AII. Two digestibility trials were conducted on the second and fourth week of feeding period, each trial lasted for 7 days for determination the digestibility of nutrients and the DON in faeces and urine. At the end of experiments, the pigs were slaughtered. The blood haematology and biochemistry were analysed.

The results of the present study indicate that DON contaminated diet (1.73 mg / kg) fed to growing pigs decreased the daily body gain; feed intake; feed efficiency and water intake. The dry matter digestibility (DMD); organic matter digestibility (OMD); crude protein digestibility (CPD) and total digestible nutrient (TDN) decreased by DON. Counts of leukocyte and thrombocyte; % of lymphocyte, basophile granulocyte and monocyte; concentrations of albumin, glutamate pyruvate transaminase (GPT), gamma glutamyl transferase (GGT), alkaline phosphatase, urea nitrogen, creatinine, cholesterol, sodium, calcium, magnesium and organic phosphate decreased by DON. The percent of neutrophile and eosinophile granulocyte; total bilirubin and glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) increased by DON. Addition the adsorbents to DON contaminated diet not improve the daily body gain, feed intake and feed efficiency. The adsorbents increase the DMD; OMD; CFD and nitrogen free extract digestibility (NFED). Addition of adsorbents improved the TDN; increase the thrombocyte and leukocyte counts and percent of basophile granulocyte, monocyte and improve some of enzymes and minerals in serum. Addition the AI without effect but AII reduce the DON excretion in faeces. Adsorbents increase the DON in urine specialy at week 2. These data suggest that adding 0.5 % modified yeast cell wall or modified yeast cell wall + bentonite to the naturally DON – contaminated diets reduce the effect of DON on immunesystem of pigs but not play adequate role in detoxification of DON in growing pigs.

Morphologische Untersuchungen von Putenherzen nach Aufnahme von Fusarientoxinen durch das Futter

Christine Rosenkranz[1], Josef Böhm[2], Nicole Panholzer[1], Rudolf Leitgeb[3]

[1]Institut für Histologie und Embryologie, Veterinärmedizinische Universität, A-1210 Wien
[2]Institut für Ernährung, Veterinärmedizinische Universität, A-1210 Wien
[3]Institut für Nutztierwissenschaften, Universität für Bodenkultur, A-1180 Wien

Fusarium graminearum und Fusarium subglutinans sind die beiden häufigsten Fusarienarten auf österreichischem Mais. Letzteres produziert die Mykotoxine Moniliformin (MON) und Beauvericin (BEA). In einem Fütterungsversuch der Universität für Bodenkultur Wien wurde der Einfluß dieser beiden Toxine auf die Mast- und Schlachtleistung von Mastputen untersucht. Das hier vorgestellte Poster berichtet über histologisch festgestellte Veränderungen der Putenherzen.

100 Eintagskücken wurden in 16 Boxen zu je 6-7 Tieren aufgestallt und in eine Kontrollgruppe und 3 Futtergruppen mit unterschiedlich hoher Mykotoxinbelastung unterteilt. Nach 12 Wochen Mast wurden die Tiere geschlachtet und bei der Hälfte der Tiere Gewebsproben aus der Herzspitze für histologische Untersuchungen fixiert, in Paraffin eingebettet und die 5 µm dicken Schnitte mit Hämalaun und Eosin gefärbt.

Obwohl die Tiere klinisch unauffällig waren und pathologisch-anatomisch keine Organveränderungen sichtbar waren, konnten in der Routinehistologie Gewebsveränderungen gesehen werden. Im einzelnen konnten herdförmige und streifenförmige Zellinfiltrationen (hauptsächlich mit Rundzellen und Makrophagen), sowie ein Verlust der Eosinophile des Herzgewebes, ein Untergang von Muskelzellen und veränderte Zellkerne im Reizleitungssystem festgestellt werden. Die Häufigkeit des Vorkommens der Veränderungen war dosisabhängig, sodass in der Futtergruppe mit der höchsten Toxinbelastung mit 71% auch der höchste Anteil an veränderten Herzen gefunden werden konnte.

Diese Herzveränderungen sind unter Berücksichtigung der Literatur dem Moniliformin zuzuordnen. Ob und wie weit Beauvericin ein Gewebsveränderungen fördernder Faktor war, kann nicht beantwortet werden.

Researches Regarding the Immunotoxic Effect of T_2-Toxin on Cellular and Humoral Effectors

Radu Trif, Alexandra Trif, Constanța Panțiru, Florin Muselin
Faculty of Veterinary Medicine, Calea Aradului 119, 1900 Timisoara, Romania

The aim of this research was to evaluate the immunosuppressive effect of T_2-toxin.

Material and methods: The study was carried out on 30 white mice, 20-22 g weight, divided in three groups as follows: group A - control, group B - experimental, which received as immunogen *Mycoplasma agallactiae* 0.5 ml/ individuals, twice, at 8 days period and group C - experimental, which received i.p. 1.5 μg T_2-toxin (Sigma) in 0.2 ml volume and *Mycoplasma agallactiae* 0.5 ml/individuals, twice, at 8 days period. The animals were sacrificed at 14 days after first administration of Mycoplasma and T_2-toxin (single or associated) and the spleens were taken off in aseptic condition. The spleens were transferred in saline phosphate buffer treated with antibiotics for obtaining cells culture. "In vitro" for each group were used as immunomodulators phytoaglutinine (PHA) 1 μg/ml culture and *Mycoplasma agallactiae*, 50 μg/ml culture, so that in each group (A,B,C) there were 3 variants: non stimulated, stimulated by PHA and stimulated by *Mycoplasma agallactiae*. "In vitro" in nonstimulated and stimulated control A and experimental (B,C) groups there were appreciated: the multiplying factor of nonadherent mononuclear cells, synthesis of interleukine-2 (IL-2) and interferon (IFN) synthesis.

Results: T_2-toxin induced the reduction of cell multiplying capacity, the multiplying factor being around 1, neither in non, either in stimulated cells, demonstrating the inaction of cell activating capacity. T_2-toxin inhibited the IL-2 and γ IFN synthesis.

Bestimmung von Deoxynivalenol und De-epoxy-Deoxynivalenol in tierischen Geweben mit HPLC nach IAC-Clean-up

Hana Valenta, Sven Dänicke und Susanne Döll

Institut für Tierernährung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig

Deoxynivalenol (DON) ist das in Mitteleuropa am häufigsten und in höchsten Konzentrationen in Futtermitteln vorkommende Fusariumtoxin. Bisherige Untersuchungen deuten darauf hin, dass bei den natürlicherweise im Futter vorkommenden Gehalten mit nur sehr geringen Rückständen in tierischen Geweben von landwirtschaftlichen Nutztieren zu rechnen ist. Als einziger Metabolit wurde bisher De-epoxy-Deoxynivalenol (De-epoxy-DON) identifiziert, der weniger toxisch ist als DON.

Für Untersuchungen zur Toxikokinetik und zum Metabolismus von DON in landwirtschaftlichen Nutztieren war es notwendig, eine empfindliche Methode zur Bestimmung von DON und De-epoxy-DON in tierischen Geweben, Flüssigkeiten und Ausscheidungsprodukten zu etablieren. Bei den bisher in der Literatur beschriebenen Methoden handelt es sich meist um instrumentell aufwendige GC-MS (Gaschromatographie-Massenspektrometrie) - Methoden. Zur Reinigung der Probenextrakte wurden meist verschiedene Festphasenextraktionssäulen eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wird eine HPLC (Hochleistungsflüssigchromatographie) - Methode beschrieben, bei der die Reinigung der Probenextrakte über Immunoaffinitätssäulen (IAC) erfolgt.

Blutserum, Harn und Galle (Harn und Galle nach Inkubation mit ß-Glucuronidase) wurden auf ChemElut-Säulen (Varian) mit Ethylacetat extrahiert. Gefriergetrockneter Kot bzw. Darminhalte wurden mit Acetonitril/Wasser extrahiert. Galle- und Kot-Extrakte wurden mit Petrolether und einer Mischung aus Aktivkohle, Aluminiumoxid und Celite vorgereinigt. Alle Proben-Extrakte wurden über eine DON-IAC-Säule (Vicam) gereinigt. Die Vorreinigung und IAC-Clean-up entsprachen einer leicht modifizierten VDLUFA-Methode für Futtermittel. DON und De-epoxy-DON wurden anschließend mit HPLC-DAD (Diodenarraydetektor) bestimmt.

Es hat sich gezeigt, dass die DON-IAC-Säulen auch zur Bestimmung des Metaboliten De-epoxy-DON geeignet sind; die Wiederfindungsraten lagen für beide Verbindungen in der gleichen Größenordnung. Sie betrugen für DON 89% in Blutserum, 82% in Harn, 83% in Kot/Digesta sowie 75% in Galle. Im Falle des Metaboliten lagen sie bei 85%, 81%, 64% sowie 70%. Durch die IAC-Reinigung wurden sehr saubere Extrakte erhalten, so dass niedrige Nachweisgrenzen zwischen 4 ng/ml (Blutserum) und 20 ng/g (gefriergetrockneter Kot) für DON und De-epoxy-DON erzielt wurden.

Die Autoren danken Dr. Meyer von der TU München-Weihenstephan für die freundliche Überlassung des De-epoxy-DON-Standards.

Rückstandsbildung von Fumonisin B1 in porcinen Geweben

K. Meyer[1], Katrin Mohr[1], J. Bauer[1], P. Horn[2], Melinda Kovács[2]

[1] Technische Universität München, Lehrstuhl für Tierhygiene, 85354 Freising-Weihenstephan

[2] University of Kaposvár, Faculty of Animal Science, Kaposvár, Hungary

Die Belastung des Menschen mit Fumonisinen wird vor allem aus dem Vorkommen von Fumonisin B1 (FB1), dem am häufigsten vorkommenden Derivat, welches zugleich die höchste Toxizität aufweist, in Mais und Maisprodukten abgeleitet, während Fumonisinrückstände in tierischen Lebensmitteln aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit (3-6%) und schnellen Ausscheidung von Fumonisin B1 im allgemeinen als unbedeutend angesehen werden. Da aber andererseits für verschiedene porcine Gewebe, einschließlich Muskelfleisch, keine exakten Daten bezüglich der Rückstandsbildung nach oraler Aufnahme von Fumonisin B1 vorliegen, wurde die vorliegende Studie zur Einschätzung der hieraus resultierenden Gesundheitsgefährdung des Verbrauchers durchgeführt. Hierbei wurde den Versuchstieren 100 mg FB1/Tier/Tag über einen Versuchszeitraum von 5-11 Tagen alimentär verabreicht und Serum (ante mortem) sowie Proben von Galle, Lunge, Leber, Niere, Augen, Hirn, Milz, Pankreas, Herz, Skelettmuskel und Fett (unmittelbar post mortem) entnommen und mittels LC-MS analysiert. Die höchsten Werte konnten dabei in der Niere (833 ± 1330 µg/kg, ± s), Leber (231 ± 163 µg/kg), Lunge (170 ± 311 µg/kg) sowie in der Milz (854 ± 2210 µg/kg) bestimmt werden. Muskelfleisch enthielt 26 ± 41 µg/kg, während in Fett lediglich 2 ± 3 µg/kg nachgewiesen werden konnten. Trotz großer Schwankungen in der Rückstandsbildung und einer möglichen Anreicherung infolge einer längeren Verabreichungsdauer wird aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ein carry-over von Fumonisin B1 in eßbare porcine Gewebe zum derzeitigen Zeitpunkt nicht als toxikologisch relevant angesehen.

Determination of Fumonisins and Hydrolyzed Fumonisin B1 in Microbial Culture Media by LC/ESIMS

E. Vekiru[1], E. Fuchs[4], G. Schatzmayr[3], M. Täubel[2], E.M. Binder[4] und R. Krska[1]

[1]Instutute for Agrobiology Tulln , Center for Analytical Chemistry, Konrad Lorenz Str. 20, A-3430 Tulln;
[2]Instutute for Agrobiology Tulln , Department of Environmental Biotechnology, Konrad Lorenz Str. 20, A-3430 Tulln; http://www.ifa-tulln.ac.at
[3]Biomin IAN GmbH, Industriestrasse 21, A-3130 Herzogenburg; www.biomin.net
[4]Erber AG, Industriestrasse 21, A-3130 Herzogenburg

Fumonisin B_1 (FB1), first reported in South Africa (1988), is the predominant fumonisin which are a group of structurally related compounds. This mycotoxin is produced by *Fusarium* strains *(mainly F. moniliforme* and *F. proliferatum*) on maize. It occurs in maize and maize-based products and on an even wider range of food commodities like cereals, beer and spices in many countries of the world.

Fumonisin B_1 ingestion has been shown to cause leukoencephalomalacia in horses, pulmonary oedema syndrome in pigs and liver cancer in rats. In addition, esophageal cancer in humans has been associated with the toxin in distinct areas of the world, when contaminated corn was consumed. Fumonisins bear a structural similarity to sphingosine and have been found to inhibit ceramide synthase which counts as the reason of inhibition of sphingolipid biosythesis. Therefore there is a considerable interest in the detoxification of FB1.

It the course of a recent project it is necessary to evaluate the FB1 concentration in liquid culture media after detoxification by certain microorganisms. For this experiments a crude extract of Fumonisin B1, also containing Fumonisin B2 (FB2) and Fumonisin B3 (FB3), was used. Because one of the detoxification steps includes the formation of hydrolyzed FB1 (HFB1), the developed LC-ESIMS method involves the quantitative determination of FB1, FB2 and also HFB1.

The analysed liquid cultivation media comprised simple salt solutions and complex multi-compound media. Therefore, after centrifugation an aliquot of the supernatant was dried and reconstituted in solvent containing the internal standard.

The chromatographic separation was performed on a Agilent Eclipse® XDB-C8 column using a binary gradient based on a 5mM ammoniumformiat in water (pH3) and acetonitrile.

To develop the MS method, the analytes were first analyzed in positive scan mode at high concentration to determine the molecular ion and confirming fragments. After optimization of the fragmentor voltage of the choosen signals, mass fragments were measured in the selected ion monitoring (SIM) mode.

The application of T2d3 toxin and Phytosphingosinhydrochloride (PSH) has been compared for use as an internal Standard.

Mass calibration was performed using a solution of mixtures of FB1, HFB1 and FB2 with both internal standards in a range of nominally 50 to 2000 ng/ml.

With PSH as internal standard a linear response for all analytes was observed with a correlation coefficient of $r>0.994$. The limit of detection was about 20 ng/ml for all analytes.

Thus the developed LC-ESIMS method can sensitively determine FB1, FB2 and HFB1 in cultivation media with minimal sample preparation.

Fumonisin B1 - Isolation and Analytical Characterisation for the Application as Reference Material

[1]M. Freudenschuss, [1]G. Jaunecker, [2]R. Krska

[1]biopure Referenzsubstanzen GmbH, Konrad Lorenzstr. 20, A-3430 Tulln
[2]IFA-Tulln, Center for Analytical Chemistry, Konrad Lorenzstr. 20, A-3430 Tulln

Fumonisins are a group of recently characterised mycotoxins produced by *Fusarium* species belonging to the *Liseola* section. There are at least three naturally occurring fumonisins known as B1, B2 and B3. Fumonisin B1 (FB1) is the most abundant toxin representing ca. 70 % of the total Fumonisin concentration [1]. FB1 causes a wide range of toxic effects, including leukoencephalomalacia in horses, pulmonary edema in pigs and nephrotoxicity and liver cancer in rats. In order to be able to monitor suspected commodities in the µg/kg range, laboratories all over the world have established analytical methodologies for FB1 [2].

The basis of a good analytical method is the availability of appropriate reference standards of defined purity and concentration. Mycotoxin standards can be purchased from several commercial sources and are often obtained as crystalline solids in vials at quantities ≤ 5 mg. If given at all, the purity of the toxins are often claimed to be > 97%. The results of a recent study showed that there is a variation in purity between mycotoxin standards from different sources and even from different batches [3]. However, the purity of Fumonisin standards is often uncertain and the impurities may constitute 10% or more of the total amount.

Therefore, a strategy for isolation and purification of solid FB1 with a purity of more than 97% was developed. FB1 was produced on maize with a *Fusarium verticillioides* strain with an average yield of 4 g FB1/kg substrate. The toxin was extracted from the culture material and afterwards separated from matrix components employing purification techniques as ion exchange and reversed phase chromatography. After purification of FB1 the lyophilised substance was subjected to an extensive analytical examination. With the assistance of sophisticated analytical procedures such as GC-MS and NMR-spectroscopy the structure identity of FB1 was confirmed. The purity of the isolated toxin was compared with a commercially available reference standard by LC-techniques.

All analytical data of the structural characterisation and determination of purity of two FB1 standards will be presented on the poster [4].

[1] A. Pittet, Revue Méd. Vét., **149**, 479-492, (1998)
[2] G.S. Shepard, J. Chrom. A, **815**, 31-39, (1998)
[3] J. Widestrand, W. Langseth, H. Pettersson, Food Add. Cont., (2002), *in press*
[4] M. Freudenschuss, Ph.D. thesis TU-Vienna, (2002)

Occurrence of *Penicillium expansum* and patulin in apples as raw materials for processing of foods – case study

V. Ostry, J. Skarkova, J. Ruprich

National Institute of Public Health Prague, Centre for the Hygiene of Food Chains in Brno, National Reference Centre for Microscopic Fungi and Mycotoxins in Food Chains, The Czech Republic

The contamination of apples (cca 15 ton) Gloster variety with *Penicillium expansum* and mycotoxin patulin was investigated in the case study. The apples should serve as a raw material for a processing of baby foodstuffs and other apple products.

The surface tissue of store apples has not been damaged. The core of 3 - 5 % apple samples has been contaminated with spores and mycelium of *Penicillium expansum.*

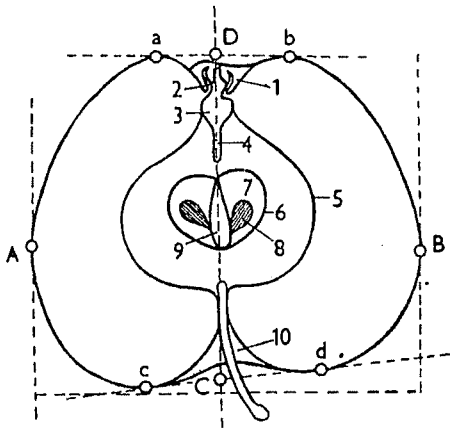
Penicillium expansum have been isolated frequently from naturally infected apples with mould. The frequent occurrence of *Penicillium expansum* on apples is probably due to growth of the mould on rotten matter in orchards, from where it could infect trees and apples. Indeed, with soil as its host substrate, *Penicillium expansum* is often isolated from surface of healthy fruit tissue.

Penicillium expansum is a psychrophile. The minimum temperature that have been reported for this species is -3 °C. The optimum temperature is near 25 °C and the maximum near 35 °C. The minimum water aktivity (a_W) for germination is 0.82-0.83.

Penicillium expansum is able to produce patulin and citrinin. The optimum water activity a_W is 0.95 by the temperature 25 °C for the production of patulin. A modified atmosphere of 3% CO_2 and 2% O_2 completely inhibited patulin production at 25 °C. Patulin is a heat-resistant mycotoxin, and pasterization at 90 °C for 10 seconds caused less than 20% reduction. Patulin is gradually destroyed during storage in the presence of sulfites, sulfhydryl groups, and ascorbic acid. Patulin is completely degraded in 15 s in aqueous solution by 10-weight % ozone. Fermentation of apple juice to produce alcoholic beverages results in a complete destruction of patulin.

Apples with this decay should not be used for processing. Poor quality control, i.e. the use of rotting fruit in juice or cider manufacture can result in high concentrations of patulin in juice. Apple juice prepared from apples contaminated with Penicillium expansum could be a possible source of patulin in the human diet. Patulin has been found to occur at high levels (hundreds of µg/kg) in some apple juice products.

The World Health Organization (WHO) has recommended a maximum patulin level of 50 µg/kg in apple products. At least twelve countries regulate patulin at 30-50 µg/kg. Patulin is limited by hygienic regulations in the Czech Republic in the Decree No. 53/2002 Coll. (apples 50 µg/kg, in baby food 30 µg/kg and in infant food 20 µg/kg) issued according to the Act No. 110/97 Coll. on "foodstuffs and tobacco products". JECFA/WHO established a provisional maximum tolerable daily intake (PMTDI) for patulin of 0.4 µg/kg body wt./day. Patulin is not classifiable as to its carcinogenity to humans (IARC/WHO).



The apple core was contaminated with the spores of *Penicillium expansum* through calyx fossa /3/ and open calyx tube /4/. Patulin was primarily associated with core and areas of decomposing tissue and can penetrate up to approx. 1 cm into the surrounding healthy tissue. Patulin has been found at levels (tens to hundreds of µg/kg) in apple samples. The removal of minor rotten core and surrounding tissue from apples before processing has been reported to significantly reduce patulin levels in apple products. This demonstrates that an efficient control of patulin contamination primarily depends on careful fruit grading and handling practices prior to further processing.

The experimental contamination of foodstuffs with the spores of toxigenic micromycetes and the production of mycotoxins

V. Ostry, J. Skarkova, J. Ruprich

National Institute of Public Health Prague, Centre for the Hygiene of Food Chains in Brno, National Reference Centre for Microscopic Fungi and Mycotoxins in Food Chains, The Czech Republic

Toxigenic micromycetes are important factors with a potentially negative effect on human health, especially in terms of the so-called late toxic effects (e.g. carcinogenic, developmental toxicity). There are approximately 65 species of „storage" toxigenic micromycetes in foodstuffs. Therefore the foodstuffs contaminated with the toxigenic micromycetes present a serious hazard of the "hidden mycotoxins". Occurrence of aflatoxigenic and ochratoxigenic micromycetes in foodstuffs is of the great consequence, because the foodstuffs are suitable substrates for contamination, growth and reproduction of the toxigenic micromycetes and for the production of aflatoxins (thereinafter AFs) and ochratoxin A (thereinafter OTA).

The main focus of our research activities is protection and promotion of public health against the toxigenic micromycetes and the mycotoxins. Basing on these facts a study of experimental contamination of foods (bread, apricot jam, Edam cheese etc.) with spores of the toxigenic micromycetes was prepared.

The production of AFs after the experimental contamination of bread was estimated after 72 hours of storage. The found values were 34.3 µg/kg of AFB_1, 34.2 µg/kg of AFG_1 and <0.35 µg/kg of AFB_2,G_2. The production of AFs after the experimental contamination of bread (after 7 days, in plastig bag) is presented in table 1.

Table 1: The results of production of AFs after the experimental contamination of bread

Layer (mm)	8 °C/ 7 days		22 °C/ 7 days	
	Aflatoxin B_1 (µg/kg)	Aflatoxin G_1 (µg/kg)	Aflatoxin B_1 (µg/kg	Aflatoxin G_1 (µg/kg)
0-8	51	277	254	731
8-16	<1	<1	1.9	4.5
16-24	<1	<1	<1	<1

The conditions of the contamination: spores of *Aspergillus flavus* CCM F-108, fall-out metod. The conditions of the storage: 21 °C, dark, plastic (PE) bag.

The production of ochratoxin A after the experimental contamination of bread with spores of *Penicillium verrucosum* was estimated after 48 hours of storage (2.1 µg/kg of OTA).

The production of AFs after the experimental contamination of apricot jam is presented in table 2.

Table 2: The results of production of AFs after the experimental contamination of apricot jam

Layer (mm)	6 °C/ 7 days		19 °C/ 7 days	
	Aflatoxin B_1 (µg/kg)	Aflatoxin G_1 (µg/kg)	Aflatoxin B_1 (µg/kg)	Aflatoxin G_1 (µg/kg)
0-8	4	14.8	7.6	26.6
8-16	<1	<1	<1	<1
16-24	<1	<1	<1	<1

The conditions of the contamination: spores of *Aspergillus flavus* CCM F-108, fall-out method. The conditions of the storage: 6 °C and 19 °C, 7 days, dark, consumer package (glass).

AFs were determinated in Edam cheese (45 % fat in dry matter) and dried milk after the experimental contamination with spores of *Aspergillus flavus* too.

The conditions of the contamination: spores of *Aspergillus flavus* CCM F-836, fall-out metod. The conditions of the storage: 21 °C, 14 days, dark, consumer package.

Determination of Moniliformin (MON) Using SAX Column Clean up and HPLC/DAD-Detection

A. Parich, L. Schuch Boeira, S. Perez Castro, R. Krska

Institute for Agrobiotechnology Tulln, Center for Analytical Chemistry,
Konrad Lorenz Strasse 20, A-3430 Tulln

Although MON is a highly toxic metabolite and reported to occur worldwide in cereals no regulatory limits and trade specifications have been established so far for this mycotoxin. For example, Gutema et al [1] reported that 50 % of food-grade corn and 60 % of corn-based food products of the USA contained MON concentrations ranging from 26 to 774 µg/Kg and 31 to 858 µg/Kg, respectively. Most of the research has been concerned with the production of MON by *Fusarium* species and much work remains to be conducted to assess the real occurrence of MON in cereals on a global scale. In this regard, the availability of rapid, reliable, low-cost and sensitive methods of analysis is important.

This work describes a method for the determination of the *Fusarium* mycotoxin moniliformin in cereals. Based on the studies of Sharman et al [2] the method has been optimized and validated for maize and wheat using a calibration range from 57 to 2300 µg/Kg. The method yields recoveries of 76 % ± 9% (maize) and 87 % ± 5% (wheat) and a detection limit of 39 µg/Kg and 30 µg/Kg, respectively.

Before starting the validation the most efficient extraction mode had to be found. Finally, acetonitrile/water (84+16) as extraction solvent and a sample size of 10 g was chosen. Hence, 100 ml of the extraction solvent was added to 10 g of the cereal and was shaken for 30 min at 170 RPM. The sample was filtered over a folded paper filter. An aliquot of 20 ml was taken out of the filtrate and the solvent was removed by rotary evaporation (50 °C, 300 – 60 mbar). In the meantime, a strong anion exchange (SAX) column had to be conditioned with sequential addition of methanol, water and 0.1 M phosphoric acid (2 ml each). The residue of the extract was redissolved in 2 ml methanol (vortexing for 1 min) and transferred to the top of the column. This procedure had to be repeated to minimize the loss of toxin. When the sample solution passed the column the SAX column was finally washed with 2 ml 0.1 M phosphoric acid and water. Then the clean up column was dried under vacuum for 15 min. Moniliformin was eluted into a 4 ml vial using 2 ml of a mixture of 20 % aqueous tetrabutyl-ammoniumhydroxide and 1.1 M potassium dihydrogen ortophosphate (1+2; pH= 7). After vortexing, the eluate was filtered through a 0.22 µm PVDF filter into a HPLC vial. The final separation was carried out by ion-pair-reversed phase HPLC using a BDS-Hypersil column (150 x 2.1 mm, 5 µm) and UV-detection (228 nm). The peak height was used for the quantification of MON.

Although small peak shifts have been observed with increasing sequence duration, the suitability of the developed ion-pair-chromatography method for the determination of MON with good repeatability and reasonable recoveries has clearly been demonstrated.

References:

[1] T. Gutema, C. Munimbazi, L. B. Bullerman (2000). Occurrence of fumonisins and moniliformin in corn and corn-based food products of US origin. Journal of Food Protection, 63 (12), 1732-1737.

[2] M.Sharman, J. Gilbert and J. Chelkowski (1991). A survey of the occurrence of the mycotoxin moniliformin in cereal samples from sources worldwide. Food Additives and Contaminants, 8 (4), 459- 466

Ochratoxin A - Isolation and Analytical Characterisation for the Application as Reference Material

[1]G. Häubl, [1]M. Freudenschuss, [1]G. Jaunecker, [2]R. Krska

[1]biopure Referenzsubstanzen GmbH, Konrad Lorenzstr. 20, A-3430 Tulln
[2]IFA-Tulln, Center for Analytical Chemistry, Konrad Lorenzstr. 20, A-3430 Tulln

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin with nephrotoxic, carcinogenic, teratogenic and immunosuppressive properties, produced by several *Aspergillus* and *Penicillium* strains. OTA is mainly produced during storage of grains and often under moist and warm conditions like in tropical regions. OTA exposure can be related to kidney diseases like Balkan Endemic Nephropathy (BEN) in Croatia [1, 2]. An equivalent disease, known to occur in animals, is Mycotoxin Porcine Nephropathy.

In order to be able to monitor suspected commodities in the µg/kg range, laboratories all over the world have established analytical methodologies for OTA [3].

To determine the content of a mycotoxin in a food or feed sample, a reference with high purity content is needed. Several companies offer solid mycotoxin standards, but most of the available substances are not suited for the usage as reference materials in mycotoxin analysis, because of poor quality. Studies showed that there is a large variation in purity between mycotoxin standards from different sources and even from different batches [4].

To overcome this dilemma a strategy for isolation and purification of crystalline OTA with a purity >98% was developed. With appropriate *Aspergillus* strains and under optimised conditions, OTA was produced on wheat with an average yield of 3000 mg/kg substrate. After extraction of the culture material and several washing-steps, the remaining interfering matrix compounds were removed by solid phase extraction and preparative liquid chromatography. The final purification steps were achieved by repeated crystallisation from Xylene. At last the white crystalline OTA was dried gently in high vacuum.

To confirm the chemical structure of the isolated toxin, NMR, MS and IR-experiments were performed. Furthermore the purity content of OTA was determined by LC-techniques in comparison with another commercially available reference standard.

All analytical data of the structural characterisation and determination of purity of the OTA standards will be presented on the poster.

[1] B. Radic, R. Fuchs, M. Peraica, A. Lucic; Tox.Lett. **91**, 105-109 (1997)
[2] T. Vrabcheva, E. Usleber, R. Dietrich, E. Märtlbauer; J.Agric.Food Chem.**48**, 2483-2488 (2000)
[3] H. Valenta; J.Chromatography A, **815**, 75-92 (1998)
[4] J. Widestrand, W. Langseth, H. Pettersson, Food Add. Cont., (2002), *in press*

Die tägliche Aufnahme von Ochratoxin A (OTA) über die Gesamtnahrung - Ergebnisse einer Duplikatstudie bei bayerischen Schulkindern

G. Engelhardt[1], R. Kibler[2], R. Arnold[1], S. Verwied-Jorky[3], B. Koletzko[3]
[1]Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Außenstelle München, Menzinger Str. 54, 80638 München, [2]Bayerisches Staatsministerium für Gesundheit, Ernährung und Verbraucherschutz, Schellingstr. 155, 80797 München, [3] Dr. von Haunersches Kinderspital-LMU München, Abt. Stoffwechselkrankheiten und Ernährungsmedizin, Lindwurmstr. 4, 80337 München

Die bisher bundesweit (Cholmakov-Bodechtel et. al., 2000) und auf EU-Ebene (SCOOP 2002) durchgeführten Studien zur Abschätzung der täglichen OTA-Aufnahme des Verbrauchers erfolgten einerseits über die Bestimmung der analytisch in Lebensmitteln erfassten Gehalte auf der Basis von Verzehrsdaten, andererseits über die Gehalte in den Blutseren von Verbrauchern. Übereinstimmend ergab sich in beiden Studien eine deutlich höhere tägliche OTA-Aufnahme pro kg Körpergewicht bei Kindern im Vergleich zu Erwachsenen. Um Unsicherheiten auf Grund verschiedener Einflussfaktoren zu beheben, wurde die Erhebung von Daten zur OTA- Aufnahme basierend auf Gesamtverzehrsstudien oder Duplikat- Studien empfohlen (SCOOP 2002).

In der vorliegenden Studie wurden die OTA- Gehalte von Duplikaten der Gesamtnahrung von sieben- und achtjährigen Schulkindern bestimmt. Die Kinder nahmen an einer Studie zum Ernährungs- und Gesundheitszustand von Kindern im Rahmen des Family-Intervention-Trial-Erlangen teil. Die Sammlung der Nahrungsduplikate des gesamten Tagesverzehrs (24 h, Mahlzeiten und Getränke) erfolgte an drei aufeinanderfolgenden Tagen bei 28 Kindern aus einem Kollektiv von 168 Grundschülern aus allen Erlanger Grundschulen und sozialen Schichten. Es ergab sich ein Gesamtanteil an positiven Proben von 51%, die über der Nachweisgrenze von 20 ng/kg lagen. Aus den gesammelten Duplikatproben wurde für alle 28 Kinder eine mittlere tägliche Gesamtaufnahme von 1,52 ng OTA /kg Körpergewicht (Medianwert) ermittelt. Bei nach Geschlecht getrennter Datenauswertung lag die tägliche OTA-Belastung der Jungen mit 1,21 ng/kg Körpergewicht unter den Werten für alle Kinder. Umgekehrt war die durchschnittliche tägliche OTA- Belastung der Mädchen mit 1,83 ng/kg Körpergewicht deutlich über dem Medianwert für alle Kinder (ns,U-Test).
Im Vergleich liegen die Ergebnisse der Duplikatstudie mit Medianwerten von 1,21 bis 1,85 ng/kg Körpergewicht/Tag etwas über denen der mean-case Variante in der bundesweiten Studie (Medianwerte 0,7 bis 1,2 ng/kg Körpergewicht/Tag, sieben- bis neunjährige Jungen bzw. Mädchen). Dasselbe ergibt sich aus dem Vergleich der 90. Perzentilen in der Duplikatstudie mit der sog. bad-case Variante der bundesweiten Studie. Die beschriebene höhere OTA- Belastung der Mädchen wurde bestätigt.

Literatur:

Cholmakov-Bodechtel C., Wolff, J., Gareis, M., Bresch, H., Engel, G., Majerus, P., Rosner, H., Schneider R. (2000). Ochratoxin A: Representative food consumption survey and epidemiological analysis. Archiv für Lebensmittelhygiene 51, 81-128.
SCOOP. SCOOP-Report on tasks for scientific cooperation (2002). Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States, http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf

METABOLISM AND TOXICOKINETICS OF THE MYCOTOXIN OCHRATOXIN A IN F344-RATS

Herbert Zepnik, Wolfgang Völkel, Wolfgang Dekant

Ochratoxin A (OTA) is a potent nephrotoxin and renal carcinogen in rodents. This study was performed to investigate the metabolism and toxicokinetics of this important food contaminant. Male and female F344 rats were treated with a single dose of OTA (0.5 mg/kg b.w.) in corn oil by gavage. Animals (n=3) were sacrificed 24; 48; 72; 96; 672 and 1344 hours after OTA-administration and concentrations of OTA and OTA-metabolites in urine, faeces, blood, liver and kidney were determined by HPLC with fluorescence detection and by LC-MS-MS. Recovery of unchanged OTA in urine amounted to 2.1% of given dose in males and 5.2% in females within 96 hours. In faeces, only 5.5% resp. 1.5% of dose were recovered. The major metabolite detected was ochratoxin alpha (OT alpha) and 4.2% / 3.5% of the dose was recovered as OT alpha in urine and 2.9% / 2.2% in faeces within 96 hours after OTA-administration. The maximal blood levels of OTA were observed between 24 h and 48 h after administration and were app. 4600 pmol/ml in males and 6000 pmol/ml in females. Elimination of OTA from blood followed first-order kinetics with a half-life of 224 h / 231 h. In liver of both male and female rats OTA-concentrations were less than 12 pmol/g tissue, with a maximum after 24 h. In contrast, OTA accumulated in the kidneys, reaching maximum concentrations of 480 pmol/g tissue in males 24 h after OTA-administration. In general, tissue concentrations in males were higher than in females. The high concentrations of OTA in kidneys of male rats may in part explain the organ- and gender-specific toxicity of OTA. The metabolite OT alpha was not detected in liver and kidney tissue of rats administered OTA. OT alpha concentrations in blood were only app. 15 pmol/ml (males) and 10 pmol/ml (females) at 24 h after OTA-administration. In urine of treated animals two novel *in-vivo* metabolites were detected and identified as OTA-hexose and OTA-pentose conjugates. Other postulated metabolites (4- and 10-hydroxy-ochratoxin; ochratoxin hydroquinone; ochratoxin glutathione conjugates) were not detected by the sensitive LC-MS-MS method.

Dept. of Toxicology, Julius-Maximilians-University, Würzburg, Germany

Effects of dietary Ochratoxin A on broiler chicken

Sabine Nitsch[1], Elisabeth Fuchs[2], Gerd Schatzmayr[1], Eva-Maria Binder[2]

[1]Biomin IAN GmbH, Industriestrasse 21, A-3130 Herzogenburg; e-mail: sabine.nitsch@biomin.net
[2]Erber AG, Industriestrasse 21, A-3130 Herzogenburg

Ochratoxins are a group of structurally similar metabolites produced by *Aspergillus* and *Penicillium* species. The most harmful mycotoxin in this group is Ochratoxin A (OTA) with nephrotoxic-, hepatotoxic-, carcinogenic- and immunosuppressive-properties. OTA occurs as contaminant of cereal grains and beans. In animal production regular consumption of a diet containing OTA causes economic losses mainly through a reduced growth rate, poor feed conversion and reduced immunity to infections by bacteria and viruses. Animal studies indicate that OTA is absorbed in the GI tract and in the proximal and distal tubules. It enters the enterohepatic circulation and can be excreted and reabsorbed. It can bind to the albumin fraction in the blood and thus can persist in animal tissues, even in meat, for extended periods of time [1]. Thus strategies have to be developed to counteract this toxin and minimize the impact on animals and further on humans.
Deactivation of OTA can be achieved by hydrolisation resulting in non-toxic products. This reaction is well known and can be done enzymatically or by microbial degradation. Anaerobic and aerobic bacteria as well as yeasts isolated from different habitats like rumen fluid, soil and intestinal contents were screened for their ability to degrade and therefore detoxify OTA.
Various numbers of isolates capable of degrading OTA were scientifically investigated for their use in a feed additive and were tested in feeding trials. A new yeast strain belonging to the genus *Trichosporon* came out on top of a comprehensive screening process. This strain was used in the feed of broiler chicken to alleviate the negative effects on the birds. Therefore 150 one day-old broiler chicken were divided into 3 groups: negative control, positive control (1 mg/kg OTA) and trial group (1 mg/kg OTA + *Trichosporon sp. nov.*). Performance parameters such as live weight, daily weight gain, feed intake, feed conversion and mortality were measured weekly. Additionally blood samples were collected weekly using Heparin tubes. Samples from one group and one sex were pooled. After centrifugation 2ml plasma were specially treated and prepared for analysing the concentration of OTA by HPLC-FLD.
The negative effect of OTA on performance parameters could be compensated by the addition of *Trichosporon sp. nov.* Results of the analysis showed a reduction of the OTA-concentration in plasma in the *Trichosporon*-group compared to the positive control. For the interpretation of these results it has to be considered that half life of OTA in chicken plasma and tissues is rather short [2, 3].

1 R. R. Marquardt and A. A. Frolich; J Anim Sci 70: 3968-3988; 1992
2 J. Bauer and M. Gareis; J Vet Med B, 34: 613-627; 1987
3 E. Pohland, S. Nesheim, L. Friedman; Pure&Applied Chemistry, 64: 1029-1046; 1992

Toxicity of Ochratoxin A in a *Brevibacillus brevis* – Growth Inhibition Assay

Henikl, S.[1], Täubel, M.[1], Vekiru, E.[2], Fuchs, E.[3], Loibner, A.P.[1], Braun, R.[1], Binder, E.M.[3] Schatzmayr, G.[4]

[1] IFA-Tulln, Department of Environmental Biotechnology, Konrad Lorenzstr. 20, A-3430 Tulln, Austria
[2] IFA-Tulln, Center for Analytical Chemistry, Konrad Lorenzstr. 20, A-3430 Tulln, Austria
[3] Erber AG, Industriestr. 21, A-3130 Herzogenburg, Austria
[4] Biomin IAN GmbH, Industriestr. 21, A-3130 Herzogenburg, Austria

Ochratoxin A (OTA) can be metabolised by various microorganisms - e. g. different yeast strains - to Ochratoxin α (OTα), a compound which is known to be less or even non-toxic [1], [2]. From literature it is known that *Brevibacillus brevis* is an organism which is sensitive to OTA [3]. Within this study the 50% and 100% effect concentration values (EC_{50} and EC_{100}) were determined for OTA in a *B. brevis* growth - inhibition assay. The aim of the presented investigations was to compare the toxicity of OTA and its degradation product OTα concerning inhibitory effects on *B. brevis*.
The sensitivity of *B. brevis* to OTA depends on the pH of the incubation medium: a decrease of the pH results in increased sensitivity of the organism towards the toxin. Therefore the *B. brevis* strain used in this study was adapted to growth at pH 5. The assay was performed in microtiterplates. Growth inhibition was determined by comparing the optical density values of *B. brevis* cultures grown in medium supplemented with OTA and OTA free medium, respectively. After 22 h of incubation 50% growth inhibition was recorded for 0.3 mg/L ± 0.04 mg/L of OTA; the EC_{100} was determined to be 0.5 mg/L ± 0.03 mg/L (*Figure 1*).
In comparison to this it could be shown that OTα had only little to no influence on the growth of the *B. brevis* strain (see *Figure 2*). OTα supplemented to the medium to a final concentration of 5.13 mg/L caused a growth inhibition of only 1.89% after 22 h of incubation. This value was higher after 16 h of incubation (48.66%), indicating adaptation of the bacterial cells to OTα. In general the inhibitory effects of OTα to *B. brevis* decreased during incubation, a phenomenon which was also observed for OTA, but in that case to a much lower extent.

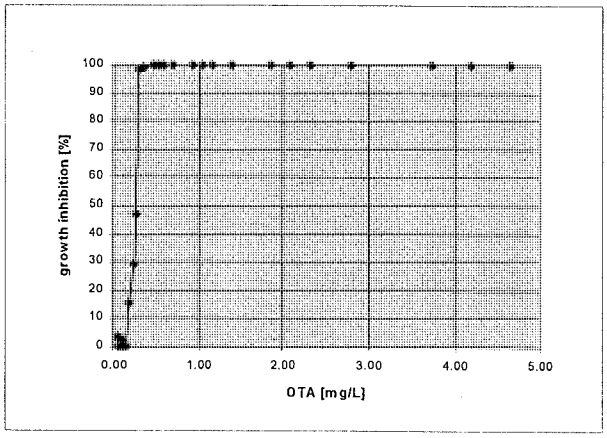


Figure 1: *Brevibacillus brevis* - Growth Inhibition Assay with OTA

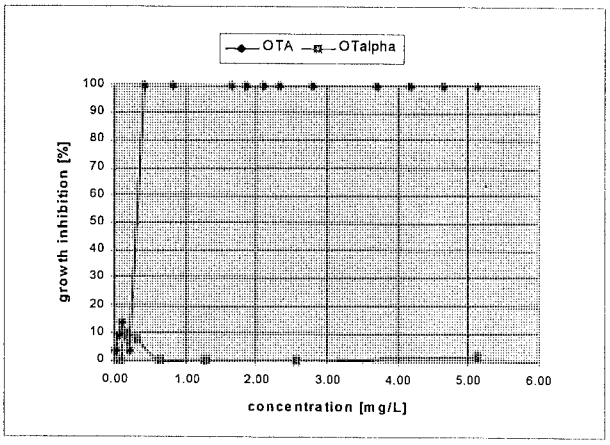


Figure 2: *B. brevis* - Growth Inhibtion Assay: Comparison of inhibitory effects of OTA and OTα

In the course of this study it could be shown that *B. brevis* is sensitive towards OTA even in very low concentrations (EC_{100} = 0.5 mg/L ± 0.03 mg/L), which is not the case for its metabolite OTα. Therefore, this bacterium may be a useful tool as an indicator organism in a growth inhibition assay, comparing the toxicity of OTA before and after microbial degradation processes.

[1] Fun Sun Chu, Icksam Noh, Chi C. Chang (1972). Structural Requirements for Ochratoxin Intoxication. Life Science 11 (10), 503-508.
[2] Xiao, H., Madhyastha, S., Marquardt, R.R., Li, S., Vodella, J.K., Frohlich, A.A. and Kemppainen, B.W. (1996). Toxicity of ochratoxin A, its openend lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. Toxicol. Appl. Pharmacol. 137, 182-192
[3] Madhyastha, M.S., Marquardt, R.R., Masi, A., Borsa, J., Frohlich, A.A. (1994). Comparison of Toxicity of Different Mycotoxins to Several Species of Bacteria and Yeasts: Use of *Bacillus brevis* in a Disc Diffusion Assay. Journal of Food Protection, Vol. 57, No. 1, 48-53.

Synthesis of Deoxynivalenol-Glucosides and their Characterization using a QTrap LC/MS/MS

F. Berthiller[1], R. Schuhmacher[1], M. Freudenschuss[2], G. Adam[3], R. Krska[1]

[1]IFA-Tulln, Analytikzentrum, Konrad Lorenz Str. 20, A-3430 Tulln
[2]Biopure Referenzsubstanzen GmbH, Konrad Lorenz Str. 20, A-3430 Tulln
[3]Zentrum für Angewandte Genetik, Universität für Bodenkultur, Muthgasse 18, A-1190 Wien

4-Deoxynivalenol (DON) is one of the most important mycotoxins produced by *Fusarium* species. Along with other B-trichothecenes, like nivalenol, fusarenon-X or 3-Acetyl-DON and 15-Acetyl-DON, its presence in cereals can be routinely detected by a variety of analytical methods [1].

First evidence for metabolic transformation of a mycotoxin in plants was obtained from studies on the formation of DON in field corn infected with *Fusarium graminearum*. Mycotoxin concentrations in the corn reached a maximum and then declined during the growing season [2]. The basis for these declines appeared to be the modification of DON by plant enzymes [2,3]. These metabolites are usually not searched after in standard mycotoxin analysis. Nonetheless, metabolites and especially conjugates of DON could be transformed back to the free mycotoxin under certain conditions, like in the digestive tract of mammals. One main metabolite of DON, isolated from *Zea mays* suspension cultures, was identified as 3-β-D-Glucopyranosyl-4-deoxynivalenol (DON-3-glucoside) using 2-D-NMR and ESI-MS techniques [4].

In order to obtain reference materials for analytical procedures we have set out to synthesize DON-3-glucoside and DON-15-glucoside, which involved a 2-step reaction. In the first step, 15-Acetyl-DON or 3-Acetyl-DON were modified with 1β-Bromo-1-deoxy-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-glucopyranose (acetobromoglucose) in toluene with $CdCO_3$ as catalyst to yield the DON-glucoside-acetates [5]. The reaction was monitored with thin layer chromatography (TLC) in toluene/ethyl acetate. The intermediate product was cleaned up using flash chromatography over silica gel with toluene/ethyl acetate (1:1; v/v) as mobile phase.

Gentle hydrolysis of the acetates was performed in the second step using a strong basic anion exchanger. After checking the progress of the reaction with TLC, the DON-glucosides were then cleaned up using flash chromatography over silica gel with butanol/propanol/ethanol/water (2:3:3:1; v/v).

The purified DON-derivatives were characterized thereafter in both the ESI positive and negative modes using a QTrap/LC/MS/MS instrument (Applied Biosystems). Full scan MS experiments confirmed the mass of the DON-glucosides (458.3 amu). MS^2 revealed cleavage of the glucoside residue, while MS^3 experiments showed almost identical fragmentation patterns as of DON, confirming the identity of the reaction products.

[1] R. Krska, S. Baumgartner, R. Josephs, Fresenius J. Anal. Chem., 371, 285-299 (2001)
[2] J. Miller, J. Young, Can. J. Plant Pathol., 7, 132-134 (1985)
[3] G. Engelhardt, M. Ruhland, P. Wallnöfer, Adv. Food Sci., 21, 71-78 (1999)
[4] N. Sewald et al., Tetrahedron: Asymetry, 3, 953-960 (1992)
[5] M. Savard, J. Agr. Food Chem., 39, 570-574 (1991)

An HPTLC method for the determination of mycotoxin zearalenone in cereal products

V. Ostry, J. Skarkova

National Institute of Public Health Prague, Centre for the Hygiene of Food Chains in Brno, National Reference Centre for Microscopic Fungi and Mycotoxins in Food Chains, The Czech Republic

Zearalenone (ZEA) is a common contaminant of all major cereal grains worldwide, especially in temperate and warm regions. It is considered to be produced by fungi of the genus *Fusarium* (*F. graminearum, F. culmorum, F. cerealis, F. equiseti*, and *F. semitectum*), that infect cereals in the field. Toxin production mainly takes place before harvesting, but may also occur post harvest if the crop is not handled and dried properly. The occurrence of zearalenone has been reported in many countries. The toxin occurs in maize and small grains like barley, wheat, oats, sorghum, millet and rice, but has also been found in soybeans. In addition, the toxin has been detected in cereal products like flour, malt, beer, and products of soybeans.

Zearalenone was detected by chromatographic techniques (thin-layer chromatography, the most common high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, UV and electrochemical detection, liquid chromatography-mass spectrometry and gas chromatography combined with mass spectrometry). ELISA kits for the determination of ZEA are also available.
An HPTLC method for the quantification of ZEA in cereals and cereal products (wheat flour and malt) has been developed. The toxin was extracted with extraction solution 50 mL acetonitrile-purified water (9 + 1) with addition of 2 g NaCl. The extracted solutions were further cleaned up on VICAM ZearalaTest™ immunoaffinity columns, then analysed by instrumental high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) with fluorescence detection. The silica gel layers were used for separation with ethyl acetate-n-hexane (1 + 1) as the mobil phase. The chromatogram was scanned in fluorescence mode after excitation at λ = 254 nm with λ = 400 nm measuring filter: SENS and SPAN parameters were 195 and 20, respectively. The R_F of zearalenone under these conditions was 0. 43.
Validation of the method was performed according to the principles of the ICH for pharmaceutical analysis. The relationship between peak area and the amount of zearalenone applied, in a specified working range 50 - 750 ng per spot with linear response was determined. The correlation factor was 0.993.

The recovery and the repeatability of the method were tested by running experiments with spiked samples of wheat. The average relative standard deviation of repeatability (RSDr) was 7.9 %. The recovery was 95 % in the range 15 - 100 µg/kg of cereal products. The limit of quantification (LOQ) of zearalenone was 10 µg/kg. The results of repeatability and recovery experiments are presented in Table 1.

Table 1. The results of repeatability and recovery experiments with spiked samples of wheat

	Addition of ZEA (spiked samples)	
	15.6 µg/kg	62.5 µg/kg
n	6	6
x (µg/kg)	14.8	59.6
RSDr (%)	8.2	7.6
Recovery (%)	94.7	95.4

Bestimmung von Zearalenon mittels LC–ESI-MS / MS (Tandem Massenspektrometrie)

O. Kappenstein, H.St. Klaffke, I. Mehlitz, R.Tiebach, R. Weber

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) Thielallee 88-92 / 14195 Berlin

A sensitive and selective method with application of high-performance liquid chromatography in combination with electrospray ionization tandem mass spetrometry (HPLC-ESI-MS/MS) has been developed for the determination of zearalenone (ZEA) in trace levels. The extracts were purified by means of immunoaffinity columns. Quantification is based on an external standard method using positive Multiple Reaction Monitoring (MRM). The limit of detection for zearalenone was 3 µg/kg with a signal to noise ratio of S/N: 3/1.

Teilnehmerverzeichnis

Dr. Arici, Muhammet: Trakya Universität, Institut für Lebensmittelingenieurwesen, T.Ü. Tekirdag Ziraat Fakültesi Gida Mühendisligi Bölümü, TR-59030 Tekirdag, Tel. 0090-282 293, Tel. 0090- 282 2931442, Fax 0090 282 2931480, E-mail: marici@tu.tzf.edu.tr

Dr. Aulwurm, Uwe: LC Tech GmbH, Ges. F. Chromatographie Bedarf, Bahnweg 41, D-84405 Dorfen, Tel. 08081 9368 17, Fax 08081 9368 10, E-mail: aulwurm@lctech.de

Beinling, Barbara: Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Lebensmittelinstitut Braunschweig, Dresdenstr. 2 u. 6, D- 38124 Braunschweig, Tel. 0531 6804 139, Fax 0531 6804 101, E-mail: dieter.eppert@lua-bs.niedersachsen.de

Dr. Beißler, Hermann: Dionex GmbH, Am Wörtzgarten 10, D-65510 Idstein, Tel. 06126 9910, Fax 06126 991 272, E-mail: hermann.beissler@dionex.de

Dr. Bendetta, Günther: Landesagentur für Umwelt, A. Alagistr. 35, I-39100 Bozen, Tel. 0039 471 411800, Fax 0039 471 411809, E-mail: Guenther.Bendetta@provinz.bz.it

Mag. Berthiller, Franz: IFA Tulln, Analytikzentrum, Konrad-Lorenz-Str 20, A-3430 Tulln, Tel. 0043 2272 66280 453, Fax 0043 2272 66280 403, E-mail: berthiller@ifa-tulln.ac.at

Dr. Birzele, Barbara: Institut für Pflanzenkrankheiten, Abt. Landwirtschaftl. u. Lebensmittel-Mikrobiologie, Universität Bonn, Meckenheimer Allee 168, D-53115 Bonn, Tel. 0228 73 7729, Fax 0028 73 9592, E-mail: b.birzele@uni-bonn.de

Dr. Blank, Ralf: Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie, Christian-Albrecht-Universität Kiel, Hermann-Rodewald-Str. 9, D-24098 Kiel, Tel. 0431 880 2962, Fax 0431 880 1528, E-mail: blank@aninut.uni-kiel.de

Dr. Bockhorn, Inka: Sofia GmbH, Rudower Chaussee 29, D-12489 Berlin, Tel. 030 67798584, Fax 030 67798588, E-mail: ibockhorn@sofia-gmbh.de

Dr. Böhm, Josef: Inst. f. Ernährung, Vet. Med. Univ. Wien, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien, Tel. 0043 1250773215, Fax 0043 1250773290, E-mail: josef.boehm@vu-wien.ac.at

Bonk, Christina: Hochschule Anhalt, Strenzfelder Allee 28, D-06406 Bernburg, Tel. 03471 355 1113, Fax 03471 3551189, E-mail: bonk@loel.hs-anhalt.de

Bruns, Silke: Wiertz, Eggert, Jörissen, Stenzelring 14 B, D- 21107 Hamburg, Tel. 040 7527050, Fax 040 75270935, E-mail: silke.bruns@wej.de

Buttinger, Gerhard: IFA Tulln, Analytikzentrum, Konrad-Lorenz-Str. 20, A-3450 Tulln, Tel. 0043 2272 66280 409, Fax 0043 2272 66280 403, E-mail: buttinger@ifa-tulln.ac.at

Bujara, Ingrid: Natec Institut, Behringstr. 154, D-22763 Hamburg, Tel. 040 8830 9195, Fax 040 8830 9170, E-mail: ingrid_bujara@sgs.com

Dr. Christall, Birgit: Institut Fresenius, Gustav-Meyer-Allee 25, D-13355 Berlin, Tel. 030 46307 425, Fax 030 46307 420, E-mail: christall@b3.fresenius.com

Citova, Dana: State Veterinary Institute Olomouc, Jakoubka ze Stribra 1, CZ-77900 Olomouc, Tel. 00420 585557205, Fax 00420 585222394, E-mail: dcitova@svuol.cz

Dr. Clauß, Bernd: Leiter Qualitätswesen, Milupa GmbH + Co KG, Schleyerstr. 4, D-36041 Fulda, Tel. 0661 929 20, Fax 0661 929 75, E-mail: Bernd.Clauss@Milupa.de

Companys, Veronica: BASF AG, Carl-Bosch-Str. 64, E-APE/T, D-67117 Limburgerhof, Tel. 0621 60 28498, Fax 0621 60 28310, E-mail: veronica.companys@central-europe.basf.org

Dr. Curtui, Valeriu: Justus-Liebig-Universität, Professur für Milchwissenschaften, Ludwigstr. 21, D-35390 Gießen, Tel. 0641 9938 958, Fax 0641 9938 959, E-mail: Valeriu.Curtui@vetmed.uni-giessen.de

Prof. Czerwiecki, Ludwik: Institute of Agricultural and Food Biotechnology, Department of Food Analysis, Rakowiecka 36, PL-02532 Warsaw, Tel. 0048 22 6063871, Fax 0048 22 8490426, E-mail: czerwiecki@ibprs.pl

Dr. Dänicke, Sven: Institut für Tierernährung, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig, Tel. 0531 596 3136, Fax 0531 596 3199, E-mail: sven.daenicke@fal.de

Prof. Dr. Degen, Gisela H.: IfADo: Inst. für Arbeitsphysiologie an der Univ. Dortmund, Ardeystr. 67, D-44139 Dortmund, Tel. 0231 1084 351, Fax 0231 1084 403, E-mail: degen@ifado.de

Diehl, Yvonne: Transia GmbH, Dieselstr. 9A, D-61239 Ober-Mörlen, Tel. 06002 93860, Fax 06002 938691, E-mail: Transia@t-online.de

Dr. Dietrich, Richard: Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstr. 13, D-80539 München, Tel. 089 2180 2973, Fax 089 2180 3793, E-mail: R.Dietrich@mh.vetmed.uni-muenchen.de

Dr. Dohms, Juliane: Lohmann Animal Health GmbH + Co. KG, Heinz-Lohmann-Str. 4, D-27472 Cuxhaven, Tel. 04721 747 181, Fax 04721 747 184, E-mail: info@lah.de

Döll, Susanne: Institut für Tierernäherung, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig, Tel. 0531 596 3151, Fax 0531 596 3199, E-mail: Susanne.doell@fal.de

Dr. Dreiheller, Stefan: Seeberger KG, Hans-Lorenser-Str. 36, D-89079 Ulm, Tel. 0731 4093 180, Fax 0731 4093 266, E-mail: s.dreiheller@seeberger-ulm.de

Prof. Dr. Drochner, Winfried: Institut für Tierernährung, Universität Hohenheim, Emil-Wolff-Str. 10, D-70593 Stuttgart, Tel. 0711 4593520, Fax 0711 459 2421, E-mail: Drochner@uni-hohenheim.de

Dr. Dutzmann, Stefan: Bayer Cropscience, Agronomic Development, Alfred-Nobel-Str. 50, D-40789 Monheim, Tel. 02173 38 3657, Fax. 02173 38 4876, E-mail: Stefan.dutzmann@bayercropscience.com

Dr. Ellner, Frank: Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Ökotoxikologie und Ökochemie im Pflanzenschutz, Königin-Luise-Str. 19, D-14195 Berlin, Tel. 030 83042390, Fax 030 83042303, E-mail: f.ellner@bba.de

Dr. Engelhardt, Gabriele: Bayer. Landesamt für Gesundheit u. Lebensmittelsicherheit - Außenstelle München, Menzinger Str. 54, D-80638 München, Tel. 089 17800 214, Fax 089 17800 170, E-mail: gabriele.engelhardt@lfl.bayern.de

Feldmann, Thomas: Institut für Obstbau und Gemüsebau, Universität Bonn, Auf dem Hügel 6, D-53121 Bonn, Tel. 0228 735155, Fax 0228 735764, E-mail: tfeldman@uni-bonn.de

Ing. Fellinger, Alois: NOACK & Co. AG, Auhofstr. 190, A-1130 Wien, Tel . 0043 1 877 5455 0, Fax 0043 1 876 5443, E-mail: afellinger@noackgroup.com

Dipl.-Ing. Feriancova, Jana: Propeka Trading s.r.o., Topolova 18, SK-81104 Bratislava, Tel. 00421 25465 1721, Fax 00421 25465 1722, E-mail: Jferiancova@propeka-trading.sk

Dr. Finke, Berndt: Humana GmbH, Bielefelder Str. 66, D-32051 Herford, Tel. 05221 181 366, Fax 05221 181 466, E-mail: Berndt.Finke@humana.de

Dr. Föllmann, Wolfram: Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund, Ardeystr. 67, D-44139 Dortmund, Tel. 0231 1084 384, Fax 0231 1084 456, E-mail: foellmann@ifado.de

Franke, Wilfried: Kraftfutterwerk Rittleben GmbH, Dorfstr. 1, D-38486 Rittleben, Tel. 039001 248, Fax 039001 251, E-mail: amk-rittleben@t-online.de

Dr. Freudenschuss, Martin: biopure Referenzsubstanzen GmbH, Konrad-Lorenz-Str.20, A-3430 Tulln, Tel. 0043 2272 66280 455, Fax 0043 2272 66280 403, E-mail: martin.freudenschuss@biopure.at

Dr. Fuchs, Elisabeth: Erber AG, Biomin u. Romer Gruppe, Industriestr. 21, A-3130 Herzogenburg, Tel. 0043 2782 803 0, Fax 0043 2782 82330 31, E-mail: elisabeth.fuchs@biomin.net

Galler, Brigitte: IFA-Tulln, Analytikzentrum, Konrad-Lorenz-Str. 20, A-3430 Tulln, Tel. 0043 2272 66280 453, Fax 0043 2272 66280 403, E-mail: galler@ifa-tulln.ac.at

Prof. Dr. Gareis, Manfred: Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, BAFF Kulmbach, E.C. Baumannstr. 20, D-95326 Kulmbach, Tel. 09221 803 220, Fax 09221 803 331, E-mail: m-gareis@baff-kulmbach.de

Prof. Dr. med. Gekle, Michael: Physiologisches Institut der Universität Würzburg, Röntgenring 9, D-97070 Würzburg, Tel. 093131 2739, Fax 093131 2741, E-mail: michael.gekle@mail.uni-wuerzburg.de

Glauser, Walter: Swiss Federal Research Station for Animal Production, Route de la Tioleyres 4, CH-1725 Posieux, Tel. 0041 26 407 7260, Fax 0041 26 407 7300, E-mail: walter.glauser@rap.admin.ch

Glück, Bernfried: Chemisches u.Veterinäruntersuchungsamt Sigmaringen, Fidelis-Graf-Str. 1, D-72488 Sigmaringen, Tel. 07571 732696, Fax 07571 732614, E-mail: Bernfried.Glueck@cuvasig.bwl.de

Dr. Göbel, Roswitha: Institut für Veterinär-Pharmakologie und Toxikologie GmbH, Weißenseer Str. 36, D-16321 Bernau, Tel. 03338 39650, Fax 03338 396517, E-mail: ivpt-bernau@t-online.de

Dr. Grajewski, Jan: Kazimierz Wielki-Bydgoszczer Akademie, Institute für Biologie und Umweltschutz, Chodkiewicza Str. 30 PL-85064 Bydgoszcz, Tel. 0048 523608396, 0048 523419290, Fax 0048 52360 8206, E-mail: jangra@ab-byd.edu.pl

Gutzwiller, Andreas: Eidgen. Forschungsanstalt für Nutztiere, CH-1725 Posieux, Tel. 004126 407 7223, Fax 004126 407 7300, E-mail: andreas.gutzwiller@rap.admin.ch

Dr. Haas-Lauterbach, Sigrid: R-Biopharm AG, Dolivostr. 10, D-64293 Darmstadt, Tel. 06151 810225, Fax 06151 810240, E-mail: s.h.lauterbach@r-biopharm.de

Häubl, Georg: biopure Referenzsubstanzen GmbH, Konrad-Lorenz-Str. 20, A-3430 Tulln, Tel. 0043 2272 66280 455, Fax 0043 2282 66280 403, E-mail: georg.haeubl.@biopure.at

Hanschmann, Gudrun: Sächs. LA für Landwirtschaft, FB Landw. Untersuchungen, Gustav-Kühn-Str. 8, D-04159 Leipzig, Tel. 0341 9174 228, Fax 0341 9174 211, E-mail: gudrun.hanschmann@leipzig.lfl.smul.sachsen.de

Dr. Hartung, Horst: Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Naumburger Str. 98, D-07743 Jena, Tel. 03641 683 463, Fax 03641 683 414, E-mail: h.hartung@jena.tll.de

Dr. Heidler, Dian: Biomin Ian GmbH, Industriestr. 21, A-3130 Herzogenburg, Tel. 0043 2782 803 0, Fax 0043 2782 803 40, E-mail: dian.heidler@biomin.net

Dr. Heller, Martin: Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Standort Jena, Naumburger Str. 90, D-07743 Jena, Tel. 03641 804425, Fax 03641 804228, E-mail: m.heller@jena.bfav.de

Hennel, Matthias: Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit - Lebensmittelinstitut Braunschweig, Dresdenstr. 2 u. 6, D-38124 Braunschweig, Tel. 0531 6804 139, Fax 0531 6804 101, E-mail: dieter.eppert@lua-bs.niedersachsen.de

Hentschel, Andreas: Institut Kirchhoff Berlin GmbH, Albestr. 3-4, D-12159 Berlin, Tel. 030 851028 27, Fax 030 85102897, E-mail: ah@institut-kirchhoff.de

Dr. Rattenberger, Ernst: Tiergesundheitsdienst Bayern, Senator-Gerauer-Str. 23, D-85586 Poing, Tel. 089 9091 225, Fax 089 9091 202, E-mail: ernst.rattenberger@tgd.bayern.de

Dr. Razzazi, Ebrahim: Inst. für Ernährung, Vet. Med. Univ. Wien, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien, Tel. 0043 1250773216, Fax 0043 1250773290, E-mail: Ebrahim.Razzazi@vu-wien.ac.at

Reischauer, Anne: Inst. für Veterinär-Pathologie, Universität Leipzig, An den Tierkliniken 33, D-04103 Leipzig, Tel. 0341 9738270, Fax 0341 9738299, E-mail: A.Reischauer@gmx.de

Dipl.-Ing. (FM) Rehde, G.: Institut für Agrartechnik Bornim e.V., Max-Eyth-Allee 100, D-14469 Potsdam, Tel. 0331 5699114, Fax 0031 5699 849, E-mail: grehde@atb-potsdam.de

Dr. Richter, Wolfgang I.F.: Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft, Prof.-Dürrwaechter-Platz, D-85580 Poing, Tel. 089 99141430, Fax 089 99141412, E-mail: Wolfgang.Richter@LfL.bayern.de

Ritscher, Martin: LUA Sachsen, Reichenbachstr. 71/73, D-01217 Dresden, Tel. 0351 8144410, Fax 0351 8144497, E-mail: martin.ritscher@lua.sms.sachsen.de

Dr. Rosenkranz, Christine: Institut für Histologie und Embryologie, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien, Tel. 0043 125077 3405, Fax 0043 125077 3490, E-mail: chris.rosenkranz@vu-wien.ac.at

Ruttmann, Klaus: VICAM Klaus Ruttmann GmbH Sales and Marketing, Rupertistr. 54, D-22609 Hamburg, Tel. 040 8197680, Fax 040 81976820, E-mail: info@klausruttmann.de

Ruttmann, Lars: VICAM Klaus Ruttmann GmbH Sales and Marketing, Rupertistr. 54, D-22609 Hamburg, Tel. 040 8197680, Fax 040 81976820, E-mail: lars@klausruttmann.de

Dr. Saggau, Elke: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE), Ferdinand-Lasalle-Str. 1-5, D-53175 Bonn, Tel. 0228 6845 660, Fax 0228 6845 2960, E-mail: elke.saggau@ble.de

Dr. Sauvant, Christoph: Physiologisches Institut Universität Würzburg, Röntgenring 9, D-97070 Würzburg, Tel. 0931 312724, Fax 0931 312741, E-mail: christoph.sauvant@mail.uni-wuerzburg.de

Schäfer, Astrid, BioTez Berlin-Buch GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, D-13125 Berlin, Tel. 030 94892130, Fax 030 9494509, E-mail: info@biotez.de

Dr. Schatzmayr, Gerd: Biomin innovative animal Nutrition GmbH, Industriestr. 21, A-3130 Herzogenburg, Tel. 043 2272 66280 550, Fax 0043 2782 82330 500, E-mail: gerd.schatzmayr@biomin.net

Prof. Schellenberg, Ingo: Hochschule Anhalt, Strenzfelder Allee 28, D-06406 Bernburg, Tel. 03471 355 1188, Fax 03471 355 1189, E-mail: Schellenberg@hs-anhalt.de

Schildbach, Stefan: Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei (VLB) in Berlin, Seestr. 13, D-13353 Berlin, Tel. 030 45080282, Fax 030 45080 288, E-mail: Schildbach@vlb-berlin.org

Dr. Schlösser, Joachim: Chemisches Landes- und staatliches Veterinäruntersuchungsamt (CVUA), Sperlichstr. 19, D-48151 Münster, Tel. 0251 9821 234, Fax 0251 9821 250, E-mail: schloesser@cvua.nrw.de

Schmidt, Stefan: Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Sigmaringen, Hedingerstr. 2/1, D-72488 Sigmaringen, Tel. 07571 732 693, Fax 07571 732 614, E-mail: Stefan.Schmidt@cvuasig.bwl.de

Prof. Dr. Schneider, Dieter: Institut für Tierernährung, Fachbereich Veterinärmedizin, FuB, Brümmerstr. 34, D-14195 Berlin, Tel. 030 8385 2256, Fax 030 8385 5938

Dr. Schneider, Elisabeth: Justus-Liebig-Universität, Professur für Milchwissenschaften, Ludwigstr. 21, D-35390 Gießen, Tel. 0641 9938 951, Fax 0641 9938 959, E-mail: Elisabeth.Schneider@vetmed.uni-giessen.de

Schneider, Renate: CENAS AG, E.-C-Baumann-Str. 20, D-95326 Kulmbach, Tel. 09221 827 6130, Fax 09221 827 6133, E-mail: schneider@cenas.de

Dr. Schollenberger, Margit: Institut für Tierernährung, Universität Hohenheim, Emil-Wolff-Str. 10, D-70593 Stuttgart, Tel. 0711 459 2407, Fax 0711 459 2421, E-mail: schollen@uni-hohenheim.de

Dr. Schwind, Bianca: Phytolab GmbH & Co. KG, Dutendorfer Str. 5 - 7, D-91487 Vestenbergsgreuth, Tel. 09163 88 445, Fax 09163 88 349, E-mail: bianca.schwind@phytolab.de

Sefer, Dragan: Faculty of Veterinary Medicine, Boulevard JNA 18, Yu-11000 Belgrad, Tel. 00381 11 685 951, Fax 00381 113471240, E-mail: seferdmd@PTT.yu

Seidler, Caroline: Justus-Liebig-Universität, Professur für Milchwissenschaften, Ludwigstr. 21, D-35390 Gießen, Tel. 0641 9938 958, Fax 0641 9938 959, E-mail: Caroline.Seidler@vetmed.uni-giessen.de

Simmler-Hübenthal, Hubert: Süd-Chemie AG, Ostenriederstr. 15, D-85368 Moosburg, Tel. 08761 82388, Fax 08761 82339, E-mail: hubert.simmler-huebenthal@sud-chemie.com

Spandern, Michael Bruno: Alltech (Deutschland) GmbH, Esmarchstr. 6, D-23795 Bad Segeberg, Tel. 04551 88700, Fax 04551 887099, E-mail: mspandern@alltech.com

Prof. Dr. Speer, Karl: Institut für Lebensmittelchemie TU Dresden, Bergstr. 66, D-01062 Dresden, Tel. 0351 463 33132, E-mail: Karl.Speer@chemie.tu-dresden.de

Spindelböck, Bernd Ulrich: Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstr. 13, D-80539 München, Tel. 089 2180 2256, Fax 089 2180 3793, E-mail: R.Dietrich@mh.vetmed.uni-muenchen.de

Dr. Staatz, Antonia: BioTez Berlin-Buch GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, D-13125 Berlin, Tel. 030 94892130, Fax 030 9494509, E-mail: info@biotez.de

Dr. Stroka, Joerg: Europäische Kommission, Institut für Referenzmaterialien u. Messungen, Retieseweg, B-2440 Geel, Tel. 0032 1457 229, E-mail: joerg.stroka@irmm.jrc.de

Seidler, Caroline: Justus-Liebig-Universität, Professur für Milchwissenschaften, Ludwigstr. 21, D-35390 Gießen, Tel. 0641 9938 951, Fax 0641 9938 959, E-mail: Caroline.Seidler@vetmed.uni-giessen.de

Suty-Heinze, Anne: Bayer Cropscience BCS-R-GBF, Geb. 6230, Alfred-Nobel-Str. 50, D-40789 Monheim, Tel. 02173 384113, Fax 02173 384017, E-mail: anne.suty-heinze.@bayercropscience.com

Täubel, Martin: Interuniversitäres Forschungsinstitut für Agrarbiotechnologie, Abt. Umweltbiotechnologie, Konrad-Lorenz-Str. 20, A-3430 Tulln, Tel. 0043 2272 66280 505, Fax 0043 2272 66280 503, E-mail: taeubel@ifa-tulln.ac.at

Dr. Taschan, Hassan: Staatliches Untersuchungsamt Hessen, Druseltalstr. 67, D-34131 Kassel, Tel. 0561 3101 137 oder 0561 31010, E-mail: h.taschan@suah-ks.hessen.de

Dr. Thielert, Gerhard: Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Sigmaringen, Hedingerstr. 2/1, 72488 Sigmaringen, Tel. 07571 732 697, Fax 07571 732 614, E-mail: Gerhard.thielert@cvuasig.bwl.de

Tiebach, Reinhard: Bundesinstitut für Risikobewertung, Thielallee 88 - 92, D-14195 Berlin, Tel. 030 8412 3298, Fax 0188 8412 3685, E-mail: r.tiebach@bfr.bund.de

Prof. Dr. Trif, Radu: Faculatetea de Medicina Veterinara, Calea Aradului Nr. 119, RO-1900 Timisoara, Tel. 0040256 141424-int. 140, Fax 0040256 123762, E-mail: al_trif@yahoo.com

Prof. Dr. Trif, Alexandra: Faculatetea de Medicina Veterinara, Calea Aradului Nr. 119, RO-1900 Timisoara, Tel. 0040256 141424-int. 140, Fax 0040256 123762, E-mail: al_trif@yahoo.com

Teilnehmer der Firmenausstellung:

BAG BiologischeAnalysensystemGmbH
Coring System Diagnostix GmbH
Dionex GmbH
R-Biopharm AG
Sarstedt AG & Co.
Transia GmbH
VICAM Klaus Ruttmann GmbH

Für die Unterstützung danken wir folgenden Sponsoren:

Alltech GmbH
BAG BiologischeAnalysensystemGmbH
BD Biosciences
Biorad Laboratories GmbH
Coring System Diagnostix GmbH
Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH
Gartenamt der Universitätsstadt Gießen
Messer Griesheim GmbH
Nunc GmbH & CoKG
Oxoid GmbH
R-Biopharm AG
Red Rabbit
Roth GmbH & CoKG
Sarstedt AG & Co.
Seeberger KG, Ulm, Trockenfrucht- und
Nusskern-Spezialitäten; Qualitätskaffee
Starmilch eG
Transia GmbH
VICAM Klaus Ruttmann GmbH
VWR International GmbH
Dr. Wiertz, Dipl.-Chem. Eggert, Dr. Jörissen GmbH

25. Mykotoxin-Workshop 2003

Träger: Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V., München
Vorstand (Amtszeit 2001-2003):

Prof. Dr. Ewald Usleber, Giessen
Dr. Wolfgang Richter, Poing
Dr. Gabriele Engelhardt, München
Klaus Lobeck, Gernsheim/Rhein

Aktuelle Informationen über die Gesellschaft unter:
www.mykotoxin.de
Webmaster: Dr. Uwe Lauber, Fellbach

Organisation des Workshops:
Professur für Milchwissenschaften, Justus-Liebig-Universität Giessen
Ludwigstr. 21, D-35390 Gießen
Cornelia Eichmann
Christa Zeidler
Dr. Elisabeth Schneider
Prof. Dr. Ewald Usleber