28.-30.Mai 2001

23. Mykotoxin Workshop

Programm
Abstracts
TeilnehmerInnen

Veterinärmedizinische Universität Wien
Institut für Ernährung
Veterinärplatz 1, A-1210 Wien, Austria,

Veranstalter

Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V.

Prof. Dr. Dr. Manfred Gareis
Prof. Dr. Ewald Usleber
Dr. Gabriele Engelhardt
Dipl. Chem. Klaus Lobeck

Organisation

Institut für Ernährung
Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1

Ing. Dr. Josef Böhm
Dr. Ebrahim Razzazi
Ing. Michael R. Haider

Programm

Montag, 28. Mai 2001

08:00 – 09:30	Registrierung der TeilnehmerInnen	
09:30 – 10:00	Begrüßung	
	Prof. Dr. C. Franz	Vizerektor der Veterinärmed. Universität
	Prof. Dr. M. Gareis	Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V.
	Prof. Dr. J. Leibetseder	Institut für Ernährung

Fusarien

10:00 – 10:10	Sven Dänicke (Braunschweig, D) Zum Einfluss von Fusarien kontaminiertem Mais in der Legehennenfütterung
10:15 – 10:25	Anja Meier (Bonn, D) Bedeutung verschiedener Inokulumquellen für den Befall von Weizen mit Fusarium - Arten.
10:30 – 10:40	Kerstin Lienemann (Bonn, D) Zur Variabilität des Artenspektrums von Fusarium spp. an Winterweizen
10:45 – 11:10	**Kaffeepause**
11:15 – 11:25	Elisabeth Oldenburg (Braunschweig, D) Einfluss von strobilurinhaltigen Fungiziden auf den Fusarientoxin-Gehalt in Weizen
11:30 – 11:40	Hans Lew (Linz, A) Shifting von Fusarienarten und ihren Toxinen in österreichischem Getreide

Trichothecene

11:45 – 11:55	Gerhard Adam (Wien, A) Molekulare Mechanismen der Deoxynivalenol-Resistenz in Hefe
12:00 – 12:10	Uwe Lauber (Stuttgart, D) Erklärungsversuche für die unterschiedliche Wirkung von Fusarientoxinen (Deoxynivalenol) beim Schwein

12:15 – 13:15 **Mittagspause**

Zearalenon und Fumonisine

13:15 – 13:25 Isabell Schneweis (München, D)
Vorkommen von Zearalenon–4-ß-D-Glucopyranosid in Weizenproben

13:30 – 13:40 Werner Hochsteiner (Wien, A)
Einfluss von Zearalenon und Zearanol bei Kalbinnen

13:45 – 13:55 Christine Rosenkranz (Wien, A)
Gewebsspezifische Veränderungen bei geschlechtsreifen Sauen nach Aufnahme von Zearalenon-hältigem Futter

14:00 – 14:10 Walburga Seefelder (Würzburg, D)
Induktion von Apoptose in humanen proximalen Tubuluszellen durch Fumonisine und Fumosinmetaboliten

14:15 – 16:15 **Posterpräsentation und Firmenaustellung (mit Kaffee)**

Ochratoxin

16:15 – 16:25 Gerald Schwerdt (Würzburg, D)
Vorläufige Ergebnisse zur Ochratoxin-A Belastung nierenkranker Patienten in Deutschland

16:30 – 16:40 Frantisek Malir (Hradec Kralove, Cz)
A study of the Accumulation of Ochratoxin A (OTA) in Patients with Chronical Renal Insufficiency (CHRI) in the Czech Republic

16:45 – 16:55 Heike Köhler (Jena, D)
In-vitro Untersuchungen zur immunmodulatorischen Wirkung von Ochratoxin A und weiteren sekundären Metaboliten
OTA – bildender Pilze

17:00 – 17:10 Stefan Lebrun (Dortmund, D)
Effects of Ochratoxin A on DNA in vitro evaluated with the single cell gel electrophoresis (comet) assay

17:15 – 17:25 Wolfgang Richter (Poing, D)
Bildung von OTA bei der Lagerung von Triticale, beimpft mit Penicillium verrucosum, bei unterschiedlichen Feuchtegehalten.

19:00 **Bürgermeisterempfang im Festsaal des Wiener Rathauses**

Dienstag 29.05.2001

Analytik

09:30 – 09:40	Valeriu Gheorghe Curtui (Gießen, D) A rapid extraction method for Ochratoxin A and B from blood serum of swine
09:45 – 09:55	Roswitha Göbel (Bernau, D) Einsatz einer kombinierten Immunoaffinitätssäule zum Nachweis von Aflatoxinen (B1, G1, B2, G2), Ochratoxin und Zearalenon
10:00 – 10:10	Jörg Stroka (Ispra, I) Alternative and simple approaches for quantification of aflatoxins separated by thin-layer chromatography
10:15 – 10:25	Andri Papadopoulou-Bouraoui (Ispra, I) Investigation of a detection system for simultaneous determination of various mycotoxins
10:30 – 10:45	**Kaffeepause**
10:45 – 10:55	Rudolf Krska (Tulln, A) Der lange Weg zur Herstellung von zertifiziertem Referenzmaterial für die Zearalenon – Analytik
11:00 – 11:10	Ralf Josephs (Geel, B) Ergebnisse einer Zertifizierungsstudie zur Bestimmung von Zearalenon in Mais
11:15 – 11:25	Peter Zöllner (Wien, A) Metabolisierung von Zearalenon im Schwein: Bestimmung von Zearalenon im Urin und Fleisch des Schweines
11:30 – 11:40	Gregor Kos (Tulln, A) Entwicklung einer neuen Detektionsmethode zur Bestimmung von Fusarien Pilzen auf Mais mittels FT-IR/ATR Spektroskopie
11:45 – 13:00	**Mittagspause**

Richtlinien

13:00 – 13:10	Hanna Wolf (Neubrandenburg, D) Zur Bewertung von Mykotoxinbefunden in der Praxis
13:15 – 13:25	Maximilian Schuh (Wien, A) Richtwerte für Mykotoxine in Futtermitteln von Nutztieren
13:30 – 13:40	Bruno Doko (Wien, A) Mycotoxin Control For Food Safety and Trade
13:45 – 14:45	**Posterpräsentation und Firmenausstellung (mit Kaffee)**

Biodegradation und Adsorption

14:45 – 14:55	Eduard Mazelle (Truttikon, CH) Funktion der Zeolithe bei der Mykotoxinbindung sowie die Kombination mit Nukleotiden
15:00 – 15:10	Nina Thimm (Herzogenburg, A) Adsorption von Mykotoxinen

Innenraumbelastung mit Mykotoxinen

15:15 – 15:25	Klaus Senkpiel (Lübeck, D) Zytotoxizität der Extrakte von Schimmelpilzen aus feuchtebelasteten Gebäuden
15:30 – 15:40	Ewald Usleber (Gießen, D) Stachybotrys-Toxine in einer Münchner Wohnung mit Wasserschaden
15:45 – 18:00	**Mitgliederversammlung der Gesellschaft für Mykotoxinforschung**
19:00	**Abendessen in einem traditionellen Wiener Heurigen mit Musik**

Mittwoch 30.05.2001

Vorkommen

09:00 – 09:10	Günther Bauer (Freising, D) Ergebnisse aus 11 Jahren Fusarium-Monitoring in Bayern
09:15 – 09:25	Frank Ellner (Berlin, D) Fusarium-Toxine in Getreide - Ergebnisse des Jahres 2000 aus 8 Bundesländern Deutschlands
09:30 – 09:40	Ludwik Czerwiecki (Warschau, Pl) Ochratoxin A and other mycotoxins in Polish cereals and foods
09:45 – 09:55	Vladimir Ostry (Brno, Cz) Occurence of the Toxigenic Fungi (Producers of Aflatoxins and Ochratoxin A) in Foodstuffs in the Czech Republic in Years 1999 and 2000
10:00 – 10:10	Hassan Taschan (Gießen, D) Deoxynivalenol in Getreide, Malz, Treber und Bier
10:15 - 10:45	**Kaffeepause**
10:45 – 10:55	Arpad Bata (Budapest, H) Occurence of Mycotoxins in Hungarian feed in 1994 - 1999
11:00 – 11:10	Karsten Meyer (Freising, D) Nachweis und Vorkommen von Mykophenolsäure und Citrinin in Rotwein
11:15 – 11:25	George M. Siboe (Nairobi, K) Mycotoxins: The Situation in Kenya
11:30 – 12:00	**Schlussdiskussion und Verabschiedung der TeilnehmerInnen**

VORTRÄGE

On the effects of fusarium contaminated maize in laying hen feeding

S. Dänicke[1], K.-H. Ueberschär[1], I. Halle[1], S. Matthes[2], H. Valenta[1] and G. Flachowsky[1]
[1] Institute of Animal Nutrition, Federal Agricultural Research Centre, Braunschweig (FAL), Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig, Germany
[2] Institute for Animal Science and Animal Husbandry, Federal Agricultural Research Centre, Braunschweig (FAL), Location Celle, Dörnbergstrasse 25-27, D-29223 Celle, Germany

A 16-week lasting experiment with laying hens was carried out to examine the effects of feeding of mycotoxin contaminated maize (CM) (17630 µg deoxynivalenol and 1580 µg zearalenone, ZON, per kg) based diets (70 % dietary inclusion) on performance, nutrient digestibility, organ weights, serum chemical parameters, antibody titers to Newcastle disease virus (NDV) in serum and to fimbrien antigen K88 in egg yolk, and on ZON residues in eggs and tissues. Moreover, Mycofix®Plus (MP), a so-called detoxifying agent, was added both to the not-contaminated control (M) and to the CM-diet. Each of the four resulting diets (M, M-MP, CM, CM-MP) was tested on 25 laying hybrids (Lohmann Brown).

Feeding of the CM-diets depressed significantly feed intake compared to the control groups by approximately 5 % which was mainly due to the effects observed at the begin of the experiment. Daily egg mass production per hen was 56.6 g, 58.4 g, 53.9 g and 55.2 g in group M, M-MP, CM and CM-MP, respectively. Main effects (maize contamination, MP-addition) were significant whereas interactions were insignificant which suggested a mycotoxin-independent effect of MP.
Nutrient digestibility and metabolizability of gross energy were slightly depressed by feeding the CM-diets and improved by MP-addition.

Feeding of the CM-diets resulted in a significant decrease in serum titers to NDV and to an increase in yolk titers to antigen K88.

No residues of ZON or of its metabolites were found in yolk, albumen, abdominal fat, breast meat, follicles greater than 1 cm in diameter, ovar including follicles smaller than 1 cm in diameter, magnum and serum.

ZON and α-zearalenol (α-ZOL) were detected in livers of hens fed the CM-diets at mean concentrations of 2.1 µg/kg and 3.7 µg/kg, respectively. Both substances were found either in a free form or conjugated with glucuronic acid or sulphate at variable proportions. Concentrations of ZON and α-ZOL in bile were approximately 500-fold and 55-fold than that of livers, respectively. Moreover, β-zearalenol was detected in this specimen.

It was concluded that feeding of maize, which was highly contaminated with fusarium mycotoxins, adversely influenced performance of hens and modulated immune response. At the given level of zearalenone and at the detection limits (0.5 - 2 µg/kg), no residues of ZON and its metabolites were found in eggs. The effects of the tested detoxifying agent were rather mycotoxin independent.

Bedeutung verschiedener Inokulumquellen für den Befall von Weizen mit *Fusarium*-Arten

Anja Meier[1], Barbara Birzele[2], Ulrike Steiner[1], Erich-C. Oerke[1], Johannes Krämer[2], Heinz-W. Dehne[1]
[1] Institut für Pflanzenkrankheiten, Abt. Pflanzenkrankheiten, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Nußallee 9, D-53115 Bonn
[2] Abt. Landwirtschaftliche und Lebensmittel Mikrobiologie, Institut für Pflanzenkrankheiten, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Meckenheimer Allee 168, D-53115 Bonn

Die Beseitigung der Inokulumquellen stellt eine wichtige Maßnahme zur Reduktion des Befallsrisikos mit *Fusarium* spp. dar. Hierzu zählt die Primär-Bodenbearbeitung, bei der infizierte Stoppeln durch Pflügen von der Bobenoberfläche entfernt werden und im Boden schneller abgebaut werden. Beschränkt sich die Bodenbearbeitung auf Grubbern, ist die Vorfrucht von noch größerer Bedeutung, da die Ernterückstände auf der Oberfläche dann ein hohes Infektionspotential bilden. Allgemein gilt, daß das Infektionsrisiko mit dem Anteil von Getreide, vor allem Mais, in der Fruchtfolge abnimmt [1]. Neben dem Boden stellt infiziertes Saatgut eine mögliche Inokulumquelle für einen Ährenbefall dar. Daneben kann der Befall auch von der pflanzlichen Begleitflora ausgehen.

Im Zeitraum 1997 bis 1999 wurde das Auftreten von *Fusarium*-Arten sowie die Trichothecenbelastung von Weizen am Standort Hennef (Rheinland) erfaßt. Die Trichothecengehalte wurden mittels ELISA und LC-MSMS quantifiziert. Bei allen Proben wurde Deoxynivalenol (DON) einschließlich der Derivate als Summenparameter mit dem ELISA erfaßt. An ausgewählten Proben wurde mittels LC-MSMS zusätzlich das Trichothecenspektrum (DON, 3-Acetyl-DON, 15-O-Acetyl-4-DON, HT-2 Toxin, T-2-Toxin, Nivalenol) untersucht. Die *Fusarium*-Arten und *Microdochium nivale* wurden von den Weizenkörnern und den Samen der Begleitflora sowie aus dem Boden mittels Selektivmedien isoliert und mikroskopisch differenziert.

Die mittleren, mit dem ELISA bestimmten DON-Gehalte variierten zwischen 45 und 310 µg/kg. Die Auftrennung der Trichothecene zeigte, daß DON den größten Anteil der Trichothecene ausmachte. Die DON-Gehalte waren mit der Befallshäufigkeit durch *Fusarium* spp. positiv korreliert. An den Körnern war das Spektrum der *Fusarium*-Arten im Untersuchungszeitraum mit *F. avenaceum, F. culmorum, F. poae, F. graminearum, F. tricinctum* (Reihenfolge mit abnehmender Häufigkeit) sehr ähnlich, jedoch unterschieden sich die Anteile der am Befall beteiligten *Fusarium*-Arten deutlich. Die Zusammensetzung der *Fusarium*-Arten am Saatguts war nur schwach mit der des Ernteguts korreliert (r^2=0,23). Demgegenüber bestand eine enge Korrelation zwischen den *Fusarium*-Arten an der organischen Substanz im Bodens und denen an den Körnern der nachfolgenden Ernte (r^2: 0,70 - 0,98).
Die Samen der Begleitflora wiesen zum Teil eine erheblich höhere Befallshäufigkeit mit *Fusarium*-Arten auf als die Weizenkörner. So waren durchschnittlich 46 % der Klettensamen mit *Fusarium*-Arten befallen, an einem Standort erreichte der Befall 80 %. Dabei entsprach das Spektrum der *Fusarium*-Arten dem der Weizenkörner. Bei Experimenten zur Lagerung von ungereinigtem Weizen unter suboptimalen Bedingungen (20% Kornfeuchte, 20°C) [2] variierte die Zunahme des DON-Gehalts nach zweiwöchiger Lagerung um das Drei- bis Fünfzehnfache in Bezug zu den DON-Gehalten des Ausgangsmaterials. Diese verschieden ausgeprägten DON-Zunahmen während der Lagerung könnten auf Unterschieden in der Zusammensetzung bzw. Dichte der Begleitflora beruhen.

Literatur:

[1] Bayr. Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau (ed.) (2000) Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum*, Druckhaus Kastner, Wolnzach
[2] Birzele, B., Prange, A., Krämer, J. (2000) *Food Add. Contam.* 17: 1027-1035

Shifting von Fusarienarten und ihren Toxinen in österreichischem Getreide

H.Lew[1], A.Adler[1], W.Edinger[1], W.Brodacz[1], E.Kiendler[1], J.Hinterholzer[2] und M.Oberforster[2]
[1] Bundesamt für Agrarbiologie, A-4020 Linz, Wieningerstr.8
[2] Bundesamt und Forschungszentrum für Landwirtschaft, A-1226 Wien, Spargelfeldstr.191

Basierend auf repräsentativen Untersuchungen bei österreichischem Getreide wurde seit Mitte der 80er Jahre eine auffällige Verschiebung im auftretenden Spektrum der Fusarientoxine und Fusarienarten konstatiert.

Zwar erwies sich bei Mais *F. subglutinans* neben *F. graminearum* – durchgehend durch sämtliche Untersuchungsreihen – als konstant häufigster Kontaminant, dennoch konnte eine Verschiebung im Artenspektrum beobachtet werden, die sich nicht nur einfach auf jahrgangsbedingte klimatische Schwankungen oder ein unterschiedlich starkes Auftreten des Maiszünslers, der in Österreich als Hauptvektor für Infektionen mit Fusarien der Sektion *Liseola* gilt, zurückführen ließ. Verglichen mit den Beobachtungsergebnissen aus den früheren Vegetationsperioden konnte in den 90er Jahren eine signifikante Zunahme der Infektionen mit *F. proliferatum* festgestellt werden. So stieg der Anteil der *F. proliferatum*-Infektionen an der Gesamtzahl der Infektionen von unter 1 % in den 80er Jahren auf 2–11 % gegen Ende der 90er Jahre. Gleichzeitig konnte auch der entsprechende Anstieg fumonisinkontaminierter Maisproben nachgewiesen werden.

Diese Verschiebung im Artenspektrum ist in Österreich höchstwahrscheinlich auf geänderte klimatische Bedingungen – mildere, feuchtere Winter und trockenere, heißere Sommer – zurückzuführen, die das Auftreten der wärmeliebenderen Fusarienart gefördert haben. Das Vorkommen von *F. verticillioides*, der in Österreich auf Mais nur eine untergeordnete Rolle spielt, bleibt allerdings von dieser Klimaänderung vorläufig unbeeinflusst.

Der wichtigste Toxinbildner auf Getreide in Österreich ist *F. graminearum*, wobei auf Mais den gesamten Beobachtungszeitraum hindurch ausschließlich Populationen anzutreffen waren, die 15-ADON als Vorstufe des DON (Deoxynivalenol) produzieren. Während in den 80er Jahren bei *F. graminearum*-Isolaten von Weizen sowohl 15-ADON- als auch 3-ADON-Typen gefunden wurden, konnten in den letzten Jahren nur mehr 15-ADON-Populationen nachgewiesen werden. Eine Erklärung für diese Veränderung könnte in der kontinuierlichen Intensivierung von Mais-Weizen-Fruchtfolgen liegen, da die Infektion der Folgefrucht Weizen mit *F. graminearum* in einem entscheiden Ausmaß von Ernterückständen der Vorfrucht Mais auf der Bodenoberfläche ausgeht.

Obwohl in Regionen ohne Maisanbau, wie z.B. in Skandinavien, noch immer durchwegs 3-ADON-Typen auf Getreide vorkommen, ist die vielfach zitierte Behauptung, dass europäische *F. graminearum*–Isolate vorwiegend 3-ADON bzw. amerikanische Stämme hauptsächlich 15- ADON produzieren, im Lichte unserer Untersuchungen zu relativieren.

Von Hafer können auch in Österreich allerdings nach wie vor ausschließlich 3-ADON-Produzenten isoliert werden. Wenngleich Hafer in der Fruchtfolge normalerweise nicht unmittelbar nach Mais steht, sollten für den unterschiedlichen Befall im Vergleich zu Weizen doch auch noch andere (noch nicht bekannte) Ursachen in Frage kommen.

Molekulare Mechanismen der Deoxynivalenol-Resistenz in Hefe

Gerhard Adam (adam@edv2.boku.ac.at)
Zentrum für Angewandte Genetik, Universität für Bodenkultur Wien, Muthgasse 18, A-1190 Wien

Einleitung:
Die Bildung von Deoxynivalenol (DON) und anderen Toxinen der Klasse der Trichothecene ist der bisher einzige nachgewiesene Virulenzfaktor von *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*): Stämme mit einer Disruption des Trichodiensynthase-Gens *Tri5* sind nur noch schwache Pathogene und können sich in der infizierten Pflanze kaum mehr ausbreiten. Umgekehrt deutet vieles darauf hin, daß Toxinresistenz eine wesentliche Komponente der *Fusarium*-Resistenz von Weizen ist. Das Ziel unserer Arbeiten ist es herauszufinden, welche molekularen Mechanismen zur Toxinresistenz beitragen und welche Kandidatengene somit für Unterschiede in der Toxinresistenz verantwortlich sein könnten. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wird als Modellsystem vorwiegend die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* herangezogen. Das gesamte Genom dieses Organismus ist sequenziert. Einzelne Gene können sehr leicht überexprimiert oder zerstört werden und die phänotypischen Auswirkungen beobachtet werden.

Ergebnisse:
Hefe ist extrem resistent gegen DON, das Toxin wird normalerweise nicht metabolisiert. Wie wir zeigen konnten ist für die basale Resistenz hauptsächlich das Gen *PDR5* (pleiotropic drug resistance) verantwortlich. Dieses Gen kodiert für ein ABC Transporter Protein, das in der Plasmamembran lokalisiert ist und eingedrungenes Toxin unter ATP-Verbrauch wieder aus der Zelle entfernt („efflux pump"). Obwohl das Hefegenom noch weitere 7 Gene für ähnliche Proteine enthält, scheint nur *Pdr5p* Substratspezifität für Trichothecene aufzuweisen. Mutanten (Δ*pdr5*) sind hypersensitiv gegen DON. Sequenzierprojekte deuten darauf hin, daß in Pflanzengenomen *PDR5*-ähnliche Gene als große Genfamilien vorliegen, die wie in Hefe eine wichtige Rolle in der Toxinresistenz spielen könnten.
Interessanterweise enthält Hefe auch ein Detoxifikationsgen mit starker Sequenzähnlichkeit zu *Tri101/TriR* von *Fusarium*, das DON in das weniger toxische 3-ADON überführt, und den Pilz vor dem eigenen Toxin schützt. Die Überexpression des Hefe *AYT1* Gens (Acetyltransferase) supprimiert die DON-Sensitiviät einer Δ*pdr5*-Mutante, die Doppelmutante Δ*pdr5* Δ*ayt1* ist noch wesentlich sensitiver als die Einfachmutante und wurde für die Entwicklung eines sensitiven Bioassays herangezogen. Mit dessen Hilfe wurden Mikroorganismen gesucht, die DON inaktivieren können. Gefunden wurde überraschenderweise ein Bakterienstamm, der eine Substanz bildet, die Hefe vor der Toxizität von DON schützt. Die gegenwärteige Hypothese ist, daß dieser „safener" weitere, noch uncharakterisierte Detoxifikationsenzyme induziert.
Die Verfügbarkeit von DON-sensitiven Δ*pdr5*-Stämmen erlaubte auch die Isolation von Mutanten, die Veränderungen im Wirkungsort des Toxins aufweisen. Das Gen *RPL3*, das für das ribosomale Protein L3 kodiert, wurde mutagenisiert und die Aminosäureänderungen, die zur DON Resistenz führen, durch DNA Sequenzierung charakterisiert. Vergleichbare Änderungen in den evolutionär extem stark konservierten *RPL3* Genen könnten auch in Weizen für Unterschiede in der Toxinresistenz verantwortlich sein. In Weizen scheinen jedoch insgesamt 6 Gene zum Pool des ribosomalen Proteins L3 beizutragen.

Zusammenfassung:
Das Modellsystem Hefe ermöglicht grundlegende Einblicke in die molekularen Mechanismen der DON-Resistenz. Diese Erkenntnisse und die Identifizierung von homologen Kandidatengenen (im Zuge von Genom-Sequenzierprokjekten) sollten die Entwicklung und Erprobung spezifischer molekularer Marker für die Resistenzzüchtung von Weizen möglich machen („functional genomics").

Erklärungsversuche für die unterschiedliche Wirksamkeit von Fusarientoxinen (Deoxynivalenol) beim Schwein

U. Lauber, T. Dillenburger, W. Drochner
Institut für Tierernährung (450), Universität Hohenheim, Emil-Wolff-Strasse 10, 70599 Stuttgart

Der Einfluß von Trichothecenen (v.a. von Deoxynivalenol (DON)) auf die Tiergesundheit wurde in einer Vielzahl von Veröffentlichungen beschrieben. Im Gegensatz zu Versuchen auf zellulärer Ebene, bei denen eindeutige, vom jeweiligen "reinen" Toxin abhängige, Dosis-Wirkungs-Beziehungen ermittelt werden können, gelingt dies im Tierversuch nur bedingt.
So wurde beispielsweise bei einer Verfütterung von 8 mg DON/kg Futter keinerlei Einfluß auf die Leistung von 69 Schweinen festgestellt, während in einer anderen Untersuchung bereits ab 1-2 mg DON (jew. natürl. kontam. Getreide) teilweise deutliche Gewichtseinbußen beobachtet wurden. Das Ausmaß der Effekte scheint somit neben dem Toxin selbst und der Konzentration von weiteren Faktoren abhängig zu sein.
In Verbindung mit den mehr oder weniger unspezifischen Symptomen einer Trichothecen-Toxikose (u.a. verminderte Futteraufnahme, reduzierte Leistung und Immunsuppression) gelingt es daher sehr oft nicht den kausalen Zusammenhang zwischen einer Leistungseinbuße und dem im Futtermittel analysierten Toxingehalt herzustellen.

Mögliche Ursachen hierfür sind teilweise in den Versuchsansätzen selbst begründet.
So unterschieden sich fast alle Untersuchungen hinsichtlich Anzahl, Geschlecht und Alter der Tiere, es wurden unterschiedliche Mastabschnitte beobachtet, die Dauer der Belastung reichte von wenigen Tagen bis zu 2 Monaten, mitunter variierten die Toxinkonzentrationen, die Fütterung erfolgte teilweise restriktiv mit unterschiedlichen Futtermitteln und letztendlich fanden die Versuche unter verschiedenen Umgebungsbedingungen statt.
So zeigten beispielsweise Versuche mit restriktiver Fütterung von bis zu 5 mg Nivalenol (Toxizität etwas höher bzw. vergleichbar mit DON) keinerlei Effekte. Als Erklärung gegenüber den Ergebnissen anderer Studien wurde eine schnelle "Adaptation" der Tiere (s.u.) vermutet. Eigene Untersuchungen mit DON zeigten jedoch, daß eine Wirkung sehr stark vom Fütterungsregime (restriktiv - ad. lib.) abhängt. D.h. letztendlich ist die Toxinwirkung nicht von der absoluten Konzentration im Futtermittel alleine abhängig.

Zum anderen scheint die "Herkunft" des Toxines eine wesentliche Rolle zu spielen.
Während natürlich kontaminiertes Material mit Abstand die stärksten Leistungseinbußen verursacht, ergeben Versuche mit einer Zulage von reinem DON (zu "nicht" kontaminiertem Getreide) deutlich abgeschwächte Effekte. Wird das Toxin jedoch einer getreidefreien Diät zudosiert, werden bis zu 6 mg DON/kg überhaupt keine Leistungseinbußen beobachtet.
Eine mögliche Erklärung wäre, daß im kontaminierten Getreide ein Teil der Toxine maskiert vorliegt. Aufgrund des letztgenannten Ergebnisses müsste dieser Anteil dann jedoch regelmäßig vergleichsweise hoch sein.
Desweiteren wurde vermutet (s.o.), daß eine Zulage von reinem Toxin zu einer schnelleren Deepoxidierung und damit Entgiftung durch die Darmmikroflora führt. Auch dieses konnte in eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden.
Demgegenüber wurde der synergistische Effekt weiterer Pilzmetaboliten (z.B. Fusarinsäure) im natürlich kontaminierten Getreide bisher u. U. unterschätzt. Obwohl Fusarinsäure selbst relativ wenig toxisch ist, scheint sie insbesondere die Wirkung niedriger DON-Konzen-trationen nachweislich zu verstärken.
Um die vergleichsweise geringe, jedoch langjährig andauernde Belastung des Menschen mit Fusarientoxinen überhaupt beurteilen zu können, ist aus den o.g. Gründen die weitere Aufklärung der komplexen Wirkmechanismen im intakten Organismus unerläßlich.

Vorkommen von Zearalenon-4-β-D-Glucopyranosid in Weizenproben

Isabell Schneweis[1], Karsten Meyer[1], Gabriele Engelhardt[2] und Johann Bauer[1]
[1] Lehrstuhl für Tierhygiene, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, 85354 Freising,
[2] Bayerische Landesanstalt für Ernährung, 80638-München, Germany

Zearalenon [6-(10-Hydroxy-6-oxo-trans-1-undecenyl)-β-resorcylsäurelacton] (ZEN) gilt als eines der am häufigsten in einheimischen Futtermitteln nachweisbaren Fusarientoxine und ist vornehmlich durch seine östrogene Wirkung charakterisiert (BAUER et al.,1987).

Untersuchungen zum Metabolismus von ZEN in Mais- und Weizenzellkulturen und verschiedenen Schimmelpilz-Spezies (*Rhizopus sp.*, *Thamnidium elegans*, *Mucor bainieri*) konnten zeigen, dass ZEN nicht nur zu α- and β-Zearalenol reduziert wird, sondern auch als Zearalenon-4-β-D-Glucopyranosid (ZEN-G) vorkommen kann (KAMIMURA, 1986; EL-SHARKAWY und ABUL-HAIJ, 1987; ENGELHARDT et al., 1999). Obwohl bekannt ist, dass diese Verbindung im Gastrointestinaltrakt durch Mikroorganismen gespalten wird und somit freies ZEN bioverfügbar ist (GAREIS et al., 1990), sind gesicherte Daten über ein mögliches Vorkommen von ZEN-G in der Nahrung nicht erhältlich. Daher war das Ziel dieser Untersuchung, eine Methode zum direkten Nachweis von ZEN-G in Weizen zu entwickeln und erste Resultate zum natürlichen Vorkommen zu liefern.

Mit Hilfe von Maiszellkulturen, die mit Zearalenon kontaminiert worden waren, wurde Zearalenon-4-β-D-Glucopyranosid hergestellt (ENGELHARDT et al.,1999).
Zum Nachweis von ZEN-G wurden Weizenproben mit Acetonitril/Wasser (21/4) extrahiert, der Extrakt über eine Florisil-Säule aufgereinigt und mittels LC-MS analysiert. Eine Konzentration von 10 µg/kg ZEN-G war noch nachweisbar, die Wiederfindungsrate betrug ca. 70%. Die Untersuchungsergebnisse von Feldproben lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Tab. 1: Vorkommen von ZEN und ZEN-G in Weizenproben (n=24)

Mykotoxin	n positiv	$\bar{x}$ [µg/kg]	Bereich [µg/kg]
ZEN	22	153.5	11-860
ZEN-G	10	54.6	17-104

Die Korrelation zwischen dem Gehalt an ZEN und ZEN-G (r^2=0.86; b=0.13) gibt erste Hinweise auf den Anteil von ZEN-G am Gesamt-ZEN-Gehalt in Weizen.

Fazit: Die Untersuchungen zeigen, dass ZEN-G zweifelsfrei unter natürlichen Bedingungen in Weizen vorkommt. Daher sollten konjugierte Mykotoxine in der routinemäßigen Analytik mit berücksichtigt werden.

Literatur:
[1] BAUER et al.1987: Tierärztl. Prax. 15, 33-36.
[2] EL-SHARKAWY und ABUL-HAIJ 1987: J. of Natural Products 50, 520-521.
[3] ENGELHARDT et al. 1999: Adv. Food Sci. 21, 71-78.
[4] GAREIS et al. 1990: J. Vet. Med. B 37, 236-240.
[5] KAMIMURA 1986: Appl. Environ. Microbiol. 52, 515-519.

Einfluss von Zearalenon und Zearanol bei Kalbinnen

W. Hochsteiner[1], H. Kahlbacher[1], M. Schuh[1], C. Rosenkranz[2], Z. Bagó[3], S. Möser[1,2]
[1] II. Medizinische Universitätsklinik für Klauentiere der Veterinärmedizinischen Universität Wien
[2] Institut für Histologie und Embryologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien
[3] Institut für Pathologie und Gerichtliche Veterinärmedizin

Das östrogen wirksame Mykotoxin Zearaleneon (ZON) ist ein bekanntes Fusarientoxin, welches sehr häufig auf unseren heimischen Getreidearten vorkommt. Dieses Mykotoxin verursacht in der Schweineproduktion erhebliche Schäden. Die Situation in der Wiederkäuerernährung ist insofern eine gänzlich andere, als der Wissensstand hierbei noch geringer ist. Nur wenige wissenschaftliche Untersuchungen wurden bisher durchgeführt, die sich mit den Auswirkungen von natürlich ZON-kontaminiertem Kraftfutter und der Gabe von östrogenhältigen Leistungsförderern auf die Kalbinnenaufzucht befassen. Ziel dieser Studie war, ob, wie und in welcher Art und Weise es zu klinischen, labordiagnostischen, brunstzyklischen, sowie pathomorphologischen Veränderungen des Geschlechtstrakes bei einer Verfütterung von Zearalenon bzw. Applikation von Zearanol kommt (Tierversuchsgenehmigung: Bundesministerium für Wissenschaft und Verkehr – GZ 68.205/20-Pr/4/2000). Zu diesem Zweck wurden 3 Gruppen mit jeweils 5 Fleckviehkalbinnen verwendet. Alle Tiere hatten die Zuchtreife erreicht. Die Gruppenaufteilung erfolgte durch eine entsprechende Gewichtszusammenstellung der Tiere, damit ein einheitliches Gruppengewicht erzielt werden konnte. Die erste Gruppe wurde mit einem natürlich kontaminiertem Haferschrot (1,3 mg ZON/kg Futter) in einer Menge von 2 kg/Tier/Tag gefüttert. Die Tiere der zweiten (Kontrollgruppe) und dritten Gruppe wurden mit annähernd ZON-freien Haferschrot (0,079 mg/kg Futter) in derselben Menge gefüttert. Die dritte Gruppe bekam zusätzlich ein östrogenhältiges Implantat (2 Applikationen mit je 25 mg Zearanol im Abstand von 6 Wochen – Sonderimportgenehmigung des Bundesministerium für soziale Sicherheit und Generationen GZ: 382.026/33-IX/A/6/00). Sämtliche Tiere wurden in Anbindehaltung auf Stroh und Heufütterung ad libitum gehalten. Die Fütterungsdauer betrug 12 Wochen. Als Versuchstiere wurden nur klinisch gesunde sowie nichtträchtige Tiere verwendet. Zu Versuchsbeginn, -mitte und -ende wurde bei allen Tieren Pansensaft und Blut für weiterführende Untersuchungen entnommen sowie die Lebendmasse festgestellt. Ebenso erfolgte täglich eine abgekürzte klinische Untersuchung aller Kalbinnen. Die durchgeführte klinische Untersuchung sowie die Ergebnisse der durchgeführten laborchemischen und Pansensaftuntersuchungen waren bei allen Tieren während der gesamten Fütterungsphase in der Norm. Hingegen zeigten die Kalbinnen der Gruppe 1 und 3 deutlich höhere Tageszunahmen als jene Kalbinnen der Gruppe 2. Abnorme Zyklusverlängerungen und –intervalle wurden bei keinem Tier beobachtet. Ebenso waren im Rahmen der postmortalen Untersuchung weder pathoanatomische noch -histologische Veränderungen am Genitaltrakt der Versuchs- und Kontrolltiere feststellbar.
Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass eine anabole Wirkung auf Grund der östrogenen Wirkung von ZON und Zearanol bei beiden Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt worden ist. Klinische sowie pansensaftbezogene und blutchemische Veränderungen konnten in keiner Gruppe nachgewiesen werden. Auch kam es zu keinen Veränderungen des Brunstzykluses und Brunstverhaltens. Ebenso konnten makroskopisch und mikroskopisch keine Veränderungen, die auf Zearalenon bzw. Zearanol zurückzuführen wären, festgestellt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass ZON bzw. Zearanol bei geschlechtsreifen und in der Zuchtreife befindlichen Kalbinnen eine untergeordnete Bedeutung hat.

Gewebsspezifische Veränderungen bei geschlechtsreifen Sauen nach Aufnahme von Zearalenon-hältigem Futter.

Sonja Leitner[1], Astrid Bucher[2], J. Böhm[3] u. Christine Rosenkranz[1]
[1] Institut für Histologie und Embryologie, Veterinärmedizinische Universität Wien
[2] II. Medizinische Universitätsklinik für Klauentiere, Veterinärmedizinische Universität Wien
[3] Institut für Ernährung, Veterinärmedizinische Universität Wien

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, histologisch erfaßbare Veränderungen an den Geschlechtsorganen von 100-120 kg schweren Sauen in Abhängigkeit von der Höhe der Zearalenonaufnahme festzustellen und mittels lektinhistochemischer Techniken funktionelle Zusammenhänge zu erfassen.

Jeweils 4 Tiere erhielten mit dem Futter (Zuchtsauenalleinfutter) 1 mg, 500 µg, 100 µg oder 50 µg/kg Futter Zearalenon 10 Tage, beginnend mit dem 5. Zyklustag hindurch, und 6 Tiere dienten als Kontrolle. Die begleitenden klinischen Untersuchungen ließen keine Auffälligkeiten erkennen. Nur vereinzelt trat bei der Tiergruppe, die 1 mg Mykotoxin pro kg Futter aufnahm, eine Rötung der Vulva am letzten Tag der Fütterungsperiode auf. Makroskopisch konnten an den Organen der getöteten Tiere, abgesehen von einer Ödemisierung und Hyperämisierung des Endometriums, bevorzugt bei den Tieren, die höhere Konzentrationen von ZON mit dem Futter aufnahmen, keine Veränderungen festgestellt werden. Organproben von Ovarien, Tubae uterina, Uterus, Vagina, Vulva und Mamma wurden mit neutralem, gepufferten Formol nach Lillie fixiert und in Paraffin eingebettet. Für die histologische Beurteilung wurden 5 µm dicke Schnitte mit Hämalaun/Eosin gefärbt. 3 µm dicke Schnitte von Eileiter, Uterushorn bzw. –körper sowie Milchdrüse wurden mit einem der folgenden 5 biotinylierten Lektine (DBA, PNA, RCA-I, SBA und WGA) inkubiert und mit der Avidin-Biotin-Komplex-(ABC)-Methode dargestellt.

Mikroskopisch erkennbare Veränderungen kommen in erster Linie bei den Tieren der Gruppe mit der höchsten Zearalenonaufnahme vor. Mit sinkender Mykotoxinkonzentration im Futter nimmt sowohl die Zahl an unterschiedlichen Gewebsalterationen wie auch deren Intensität in der Ausprägung ab. Im Detail wurden folgende Befunde erhoben: In den Ovarien konnten vermehrt atretische Follikel festgestellt werden. Im gesamten Geschlechtskanal waren subepitheliale Zellinfiltrationen, teilweise mit Beteiligung von eosinophilen Granulozyten, zu beobachten. Die vereinzelt bereits makroskopisch erkennbare Ödemisierung und Hyperämisierung des Endometriums war mikroskopisch bei einer größeren Anzahl an Tieren und auch im Eileiter feststellbar. Darüber hinaus zeigten die Uterindrüsen eine Hypoplasie und -trophie mit einer vakuolären Degeneration der Epithelzellen (bei 1 mg und 500 µg). In der Mamma kam es zu Ausbildungen von Alveolen mit sekretorischer Tätigkeit.

Mittels den lektinhistochemischen Untersuchungen konnten die Veränderungen nicht nur bestätigt, sondern auch bei Tieren, die in der Routinehistologie unauffällige Befunde aufwiesen, erste Anzeichen von Auswirkungen der Zearalenonaufnahme gefunden werden. Im Detail kommt es im Uterus zu einer Verdickung der Glykokalix des Endometriums (SBA) sowie der Drüsenzellen (PNA u. RCA-I). Darüber hinaus reagiert das Zytoplasma der Epithelzellen nach Mykotoxinaufnahme positiv mit SBA. Im Eileiter kommt es zu Änderungen des Bindungsverhaltens von PNA, RCA-I, SBA und WGA in den Epithelzellen. Mittels WGA konnten im Eileiterepithel vermehrt Golgikomplexe nach Zearalenonaufnahme nachgewiesen werden. Im Milchdrüsengewebe kommt es zu einer vermehrten Bindung der Lektine PNA, SBA und WGA in der Glykokalix der Drüsenzellen.

Zusammenfassend ist hervorzuheben, daß obwohl makroskopisch nur wenige Veränderungen an den untersuchten Organen festgestellt werden konnten, die histologischen Auswertungen umfangreiche und deutliche Gewebsreaktionen auf die Zearalenonaufnahme in allen vier Versuchsgruppen zeigten. Die ersten Auswirkungen einer Zearalenonaufnahme sind lektinhistochemisch nachweisbare Veränderungen in der Sekretionsleistung.

Induktion von Apoptose in humanen proximalen Tubuluszellen durch Fumonisine und Fumonisinmetabolite

W. Seefelder[1], *H.-U. Humpf*[1], G. Schwerdt[2], R. Freudinger[2], M. Gekle[2]
[1] Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Universität Würzburg, Am Hubland, 97074 Würzburg
[2] Physiologisches Institut, Universität Würzburg, Röntgenring 9, 97070 Würzburg

Fusarium moniliforme gilt aufgrund der Produktion von Mykotoxinen, den sogenannten Fumonisinen, als einer der bedeutensten fungalen Kontaminanten von Mais. Die Aufmerksamkeit aus toxikologischer Sicht richtet sich dabei v.a. auf Fumonisin B_1 (FB_1), dem mengenmäßig wichtigsten Toxin. FB_1 ist ein erwiesener Tumorpromotor und -initiator und wird für das vermehrte Auftreten von Speiseröhrenkarzinomen in einigen Regionen von China und Afrika verantwortlich gemacht. Es beeinflusst als Hemmer der Ceramidsynthase den Sphinglipidmetabolismus und induziert nachweislich in hepatischen und nephrotischen Zellgeweben Apoptose [1]. Wenig ist jedoch bekannt, inwieweit andere Fumonisine sowie deren Hydrolyseprodukte, Apoptose induzieren können. Von Interesse sind außerdem Fumonisinmetabolite wie zum Beispiel „Pseudoceramide", die als Produkte aus der enzymatischen Umsetzung von hydrolysierten Fumonisinen und Fettsäuren hervorgehen [2]. Es wurde daher die Fähigkeit zur Apoptoseinduktion verschiedener Substrate in humanen proximalen Tubuluszellen (IHKE, immortalized human kidney epithelial cells) durch Nachweis von Caspase-3-Aktivität sowie „DNA-Leiterbildung" untersucht. Die Inkubation der Zellen mit FB_1 führte dabei bei einer Konzentration von 10µM zu einem deutlichen Anstieg der Caspase-3-Aktivität, während die verwendeten Fumonisinderivate und –metabolite im gleichen Konzentrationsbereich keine apoptotischen Effekte hervorrufen konnten. Eine Auftrennung der gebildeten DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese lieferte bei FB_1-inkubierten Zellen das für Apoptose charakteristische Bild einer „Leiter" und bestätigte o.a. Ergebnis. Da die Inhibierung der Ceramidsynthase durch Fumonisine zu einem Anstieg der Sphinganinkonzentration führt, wurde basierend auf der Kopplung von Hochleistungs-flüssigchromatographie mit der Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS), eine Methode zur Bestimmung der Sphingosin- und Sphinganinkonzentrationen in den Zellen entwickelt. Ein signifikanter Anstieg der Sphinganinkonzentration bei gleichbleibender Sphingosinkonzentration ist bei allen Substraten nachgewiesen worden, wobei die Sphinganinkonzentrationen der mit FB_1-inkubierten Zellen die höchsten Werte aufwiesen. Die Induktion von Apoptose durch FB_1 über einen Anstieg der Sphinganinkonzentration muss diskutiert werden.

Literatur

[1] Tolleson WH, Dooley KL, Sheldon WG, Thurman J, Bucci TJ, Howard PC (1996) Adv Exp Med Biol 392: 237-250.
[2] Humpf H-U, Schmelz EM, Meredith FI, Vesper H, Vales TR, Wang E, Menaldino DS, Liotta DC, Merrill AH (1998) J Biol Chem 273: 19060-19064.

Vorläufige Ergebnisse zur Ochratoxin-A Belastung nierenkranker Patienten in Deutschland

G. Schwerdt[1], C. Schuster[1], S. Silbernagl[1], M. Gareis[2], M. Gekle[1]
[1] Physiologisches Institut, Universität Würzburg, Röntgenring 9, D - 97070 Würzburg
[2] Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, Bundesanstalt für Fleischforschung, D - 95326 Kulmbach

Der Schimmelpilzmetabolit Ochratoxin A wirkt hauptsächlich nephrotoxisch. Frühere Untersuchungen in Italien und Tunesien zeigten im Serum von Dialysepatienten deutlich erhöhte Ochratoxin A-Spiegel. Aufgrund verfeinerter Analysemethoden ist eine geringfügige Belastung der Bevölkerung mit Ochratoxin A im unteren nanomolaren Konzentrationsbereich bei praktisch allen Personen nachzuweisen. Die Frage stellte sich, inwieweit im Serum nierenkranker Patienten eine erhöhte Konzentration von Ochratoxin A im Vergleich zu gesunden Personen festzustellen ist.

Wir untersuchten Blutproben von nierenkranken Patienten auf ihren Ochratoxin A Gehalt hin und verglichen ihn mit den Werten einer gesunden Kontrollgruppe. Die Patienten litten an interstitieller Nephritis, diversen glomerulären Nephritiden sowie anderen Nierenerkrankungen. Die Blutproben wurden in Kliniken aus Würzburg, Erlangen, Lübeck und München gewonnen und uns zur Untersuchung auf Ochratoxin A zur Verfügung gestellt. Als Kontrollgruppe dienten Proben von Studenten aus Würzburg, bei denen keine Nierenerkrankung bekannt war. Der Ochratoxin A Gehalt im Blutserum wurde mittels HPLC bestimmt, und einige Proben wurden zur zusätzlichen Überprüfung an das Labor von Prof. Dr. Gareis in Kulmbach geschickt. Das Detektionslimit betrug 0,25 nmol/l (0,1 ng/ml).

Dabei ergaben sich folgende Werte: Die Kontrollgruppe wies eine mittlere Ochratoxin A Konzentration im Serum von 1,197 ± 0,67 nmol/l mit einem Maximalwert von 3,267 nmol/l und einem Minimalwert von 0,2942 nmol/l auf (n = 31). Die Patienten im Alter von 24 bis 84 Jahren wurden in fünf Gruppen eingeteilt: interstitielle Nephritiden (8), glomeruläre Nephritiden (33), Verdacht auf Balkan Endemische Nephropathie (2), Morbus Wegener (9) sowie anderen Nierenerkrankungen (14). Die Gruppe der interstitiellen Nephritiden wies eine durchschnittliche Ochratoxin A Konzentration von 1,275 ± 0,426 nmol/l, die der glomerulären Nephritiden von 0,791 ± 0,717 nmol/l, BEN von 0,865 und 2,552 nmol/l, M. Wegener von 1,059 ± 1,074 nmol/l und die der anderen Nierenerkrankungen eine Serum-Konzentration von 0,748 ± 0,516 nmol/l auf. Es gab einige Patienten mit sehr hohen Ochratoxin A Konzentrationen in allen Gruppen - die höchste lag bei 3,75 nmol/l - und einige ohne nachweisbares Ochratoxin, allerdings ohne erkennbare Häufung in einer Gruppe. Eine altersabhängige Ochratoxin A Konzentration im Serum konnte nicht festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigen, daß sich bisher keine signifikanten Veränderungen des Plasma-Ochratoxin A Gehalts nierenkranker Patienten gegenüber der Kontrollgruppe feststellen lassen. Allerdings ist das untersuchte Kollektiv noch zu klein, um eine abschließende Aussage zuzulassen.

Diese Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt (DFG Ge 905/3-4).

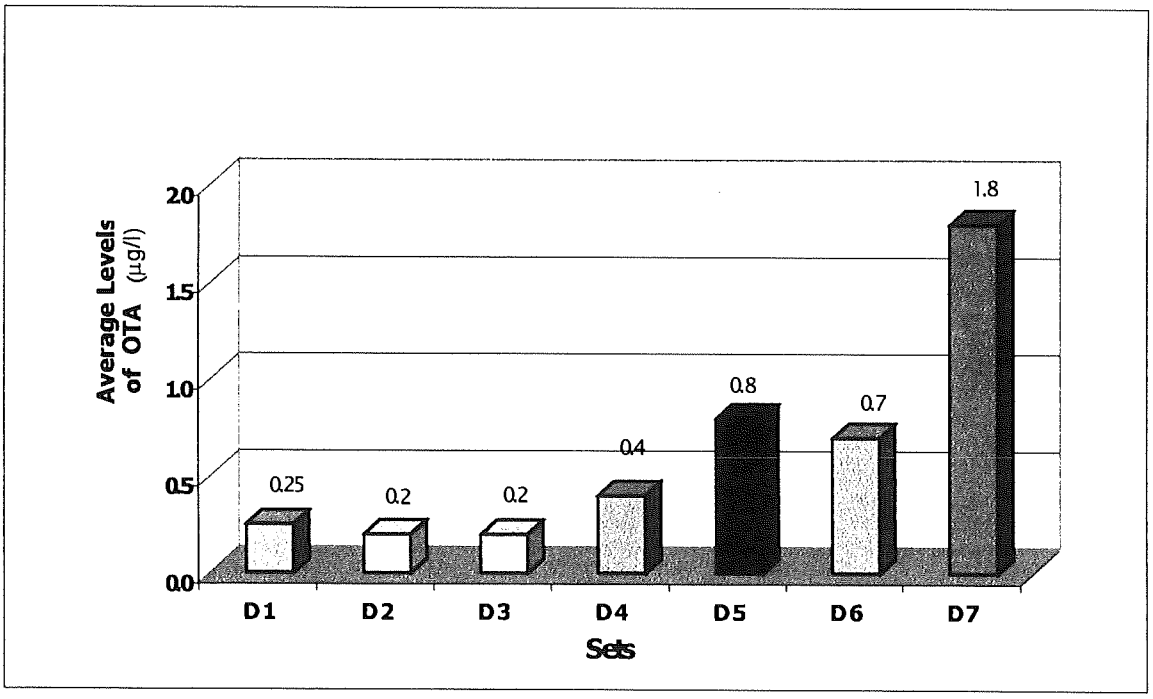
A Study of the Accumulation of Ochratoxin A (OTA) in Patients with Chronic Renal Insufficiency (CHRI) in the Czech Republic

F. Malir[1], M. Bmdiar[2], T. Roubal[1], J. Severa[1], P. Fixa[3], J. Kacerovsky[2], J. Zahradnik[3], J. Österreicher[4], J. Knizek[4], M. Cerna[5]

[1] Regional Hygiene Station, Xenobiochemistry Dept., National Reference Laboratory for Biomarkers of Mycotoxins and Mycotoxins in Food, Nezvalova 958, 500 02 Hradec Kralove, Czech Republic
[2] Purkyne Military Medical Academy, Nephrology Dept., Hradec Kralove, Czech Republic
[3] Faculty Hospital, Nephrology Dept., Hradec Kralove, Czech Republic
[4] Purkyne Military Medical Academy, Institut of Radiobiology and Immunology, Hradec Kralove, Czech Republic
[5] National Institute of Public Health, Centre of Environmental Health, Prague, Czech Republic

The attention of public health authorities in the Czech Republic has also been focused on the systematic control of ochratoxin A. Experimental studies on the nephrotoxicity of OTA have shown that OTA damages the intracellular metabolic processes, renal haemodynamics and, to a significant degree, the functions of the proximal tubules. OTA causes the decrease of glomerular filtration and tubular resorption and affects all parts of the nephron and kidneys in toto. Since 1994 the occurrence of OTA has been systematically monitored in the serum of blood donors (1,620 analyzed serum samples - arithmetic mean 0.25 μg OTA/l, geometric mean 0.19 μg/l, median 0.20 μg/l, the minimal value 0.1 μg/l and maximal one 13.70 μg/l). During the monitoring it was decided to carry out a study of the accumulation of OTA in the serum of patients with decreased renal functions (who do not need regular dialysis) and in the serum of those patients who are regularly treated by dialysis (RTD). The dietary regimen was investigated. Determinations of OTA were carried out using HPLC with fluorescence detection.

Fig.1 - Summary of Average Serum Levels of OTA in Studied Groups



D1 – control group (blood donors); D2 - hospitalized patients without demonstrable CHRI;
D3 – hospitalized patients with pre-existing CHRI;
D4 – outpatients with stabilized CHRI;
D5 – total patients in RTD, state before dialysis (B. D.);
D6 – patients in RTD, randomly chosen, B.D.;
D7 - patients in RTD, selectively chosen, B. D.

This study was supported by the Government of the Czech Republic and by IGA MZ CR, assignment No.NK/4576-2.

In-vitro-Untersuchungen zur immunmodulatorischen Wirkung von Ochratoxin A und weiteren sekundären Metaboliten OTA-bildender Pilze

Heike Köhler[1], Günter Müller[1], Martin Heller[1], Heino Rosner[2]
[1] Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Fachbereich 4, Jena, Naumburger Strasse 96a, D - 07743 Jena, Deutschland
[2] BMVEL, Rochusstraße 1, D - 53123 Bonn, Deutschland

Ochratoxin A (OTA) wird in der Literatur überwiegend eine generelle immunsuppressive Wirkung zugeschrieben. Eigene In-vivo-Untersuchungen am Schwein deuten jedoch auf ein selektives Eingreifen des Mykotoxins in immunologische Prozesse hin, da sowohl hemmende als auch stimulierende Effekte gefunden wurden. In der vorliegenden Untersuchung wurden verschiedene immunologische In-vitro-Methoden (Proliferation von porzinen Lymphozyten; Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1α, IL-6 und TNFβ durch porzine PBMC; Bildung freier Sauerstoffradikale durch porzine Monozyten) eingesetzt, um zu ermitteln, welche immunologischen Mechanismen durch OTA im Detail beeinflusst werden. Da OTA in kontaminierten Lebens- und Futtermitteln selten allein, sondern meist gemeinsam mit weiteren sekundären Pilzmetaboliten vorliegt, wurde die Wirkung von reinem OTA mit der eines *Aspergillus-ochraceus*-Toxingemischs (Rohtoxin) verglichen.
Alle geprüften Parameter wurden durch beide Toxinpräparationen konzentrationsabhängig gehemmt, wobei Rohtoxin etwa 10-fach stärker wirkte als reines OTA. In bestimmten niedrigen Konzentrationsbereichen wurde die Bildung freier Sauerstoffradikale und die Produktion von IL-1β und IL-6 z.T. deutlich stimuliert.
Ausgehend von der Annahme, dass die stärkere Wirkung des Rohtoxins durch synergistische Effekte von OTA mit weiteren Pilzmetaboliten hervorgerufen wird, wurde das Rohtoxin mit Hilfe einer präparativen HPLC in 9 Fraktionen aufgetrennt, deren Wirkung in den beschriebenen Testverfahren vergleichend zu OTA und Rohtoxin untersucht wurde. Eine HPLC-Fraktion (RE 2) zeigte eine bis zu 100-fach stärkere Wirkung als reines OTA. Diese Fraktion wurde mit Hilfe der GC-MS als Ochratoxin C (OTC) identifiziert.
Vergleiche zwischen der Fraktion RE 2 und synthetisch hergestelltem OTC zeigten z.T. eine starke Übereinstimmung in der Wirkung auf immunologische Reaktionen, z.T. deutliche Unterschiede. Die Ursachen für diese Beobachtungen werden z. Z. untersucht.
Es ist anzunehmen, dass in natürlich kontaminierten Produkten beide Derivate (OTA und OTC) gemeinsam vorkommen. Aussagefähige Untersuchungsdaten dazu liegen bisher nicht vor. Ausgehend von der Tatsache, dass OTC bereits in 100-fach niedrigerer Konzentration im Vergleich zu OTA modulierende Effekte auf die von uns geprüften immunologischen Parameter ausübt, wäre eine verstärkte analytische Untersuchung des Vorkommens von OTC in Lebensmitteln (und auch Futtermitteln) wünschenswert.

Effects of Ochratoxin A on DNA in *vitro* Evaluated with the Single Cell Gel Electrophoresis (COMET) Assay

Stefan Lebrun and Wolfram Föllmann
Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund, Ardeystr. 67, D-44139 Dortmund, Germany

The mycotoxin ochratoxin A (OTA), a widespread contaminant of food and feedstuffs, is nephrotoxic, immunosuppressive, and carcinogenic in domestic and laboratory animals. Additionally, it is suspected to be responsible for urinary tract tumours in patients suffering from Balkan Endemic Nephropathy. Although, evidence has accumulated that OTA is a genotoxic carcinogen, the mechanism that results in DNA damage has not been fully resolved.

In this study the induction of DNA damage by OTA and the subsequent DNA repair was investigated with the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay.

In madin darby canine kidney (MDCK) cells OTA induced single strand breaks (ssb) in a concentration dependent manner. When an external metabolizing enzyme system (S9-mix) was added, this genotoxic effect was significantly stronger.

By addition of methotrexate, a substrate of the organic anion transporter, the effect of OTA can be completely inhibited at concentrations $\geq$100 µM methotrexate.

When DNA repair was inhibited by addition of cytosine arabinose (araC) and hydroxyurea (HU) the tail length increased dramatically and all treated cells showed ssb. A further culture of the damaged cells in the absence of any supplement resulted in a complete repair of the DNA within two hours.

In contrast to MDCK cells, primary cultured porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) showed weaker effects in the comet assay when treated with OTA. The presence of S9-mix enhanced the response but only at higher OTA concentrations compared to MDCK cells.
When DNA repair was inhibited in PUBECs also clearly more ssb were induced by OTA.

These results demonstrate that OTA induce single strand breaks *in vitro*. The damaged DNA can be repaired more effectively in primary cultured epithelial cells (PUBECs) compared to cells of a cell line (MDCK cells). By competitive inhibition of OTA uptake with a substrate of the organic anion transporter the DNA damage can be prevented.

Bildung von Ochratoxin A bei der Lagerung von Triticale, beimpft mit *Penicillium verrucosum*, bei unterschiedlichen Feuchtegehalten

W.I.F. Richter[1], A. Baranowski[2]; M. Schuster[1]; W. Scholz[1]
[1] Bayerische Landesanstalt für Tierzucht , Grub . Postfach 1180 85586 Poing. Tel. 08999141 – 430 ; Telefax 08999141 – 105; e – mail: wolfgang.richter@blt.bayern.de
[2] Institute of Genetics and Animal Breeding, Polish Academy of Science, Jastrzebiec, PL-05-551 MROKOW

Der Anbau von Triticale, einer Kreuzung von Weizen (triti*cum*) mit Roggen (*se*cale), gewinnt zunehmend an Bedeutung. Hohe Korn- und Stroherträge auf leichtem Boden im Vergleich zu Weizen und die Möglichkeit des Anbaus im Rahmen des Kulturlandschaftsprogramms werden als Hauptgründe für die Anbauausweitung gesehen. Dem stehen auch Nachteile gegenüber. Auswuchsrisiko, Lagergefahr und spätere Reife als Wintergerste sind Merkmale, die durch Neuzüchtungen verbessert werden sollen.

Triticale (Sorte Trimaran) der Ernte 1997 (Ertrag 60 dt/ha, Direktsaat) in Saatgutqualität wurde wiederbefeuchtet und mit *Penicillium verrucosum* (CBS 190 89) beimpft (Schneckenmischer, 30 Minuten). Der Titer der Konidiensuspension wurde auf ca. 4 x 10^8 kbE/ml eingestellt, wobei mit 1 ml/kg Triticale beimpft wurde. Das Ausgangsmaterial mit 14,5 % Feuchtegehalt wurde auf eine Sollfeuchte von 16 %, 18 % bzw. 19 % eingestellt und 1Tag zum Feuchteausgleich bei ca. 4 °C kühl gelagert. Die perforierten Beutel mit 15 kg Triticale, wurden je nach Feuchte in freistehenden, getrennten Silos in einer Halle, mit ca. 50 cm Getreide bedeckt (2 Beutel (A+B)/Silo), gelagert. Alle 4 Wochen wurden je Beutel ca. 200 g Triticale entnommen und halbiert. Eine Probe wurde sofort der Bestimmung der Schimmelpilze (kbE/g) mit den üblichen Plattengußverfahren zugeführt. Die andere zur Bestimmung von Ochratoxin A (OTA) und Trockensubstanz (T) ins Labor der BLT wobei die Proben zur OTA-Bestimmung bis Versuchsende bei -18°C zwischengelagert wurden. Vom Ausgangsmaterial wurde eine Rohnährstoffanalyse durchgeführt. Ochratoxin A (OTA) wurde mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion in allen Proben analysiert (NWG 0,5 µg/kg für Gerste und Weizen bzw. 1,0 µg/kg für Hafer und Mais; Wiederfindungsrate 80-85 %;). Citrinin (CT) wurde mittels kompetitivem indirektem Enzymimmuntest am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der LMU München bestimmt

Für die Lagerung von Triticale in der Praxis hat dies normalerweise keine Bedeutung, da so feucht nicht gelagert wird, ohne eine Konservierungsmaßnahme durchzuführen. Durch temperaturbedingte Feuchtigkeitswanderungen können aber Kondensationspunkte die Bildung von Schimmelnestern (hot spots) begünstigen. Entscheidend ist daher, ob immer bzw. nur unter bestimmten Bedingungen Ochratoxin A gebildet wird, wenn ein toxinbildender Schimmelpilz anwesend (zugeimpft) ist. In diesem Versuch können die Bedingungen für die Mykotoxinbilung so beschrieben werden, daß bei einem Schimmelpilzbefall von mehr als 3,0 x 10^5 kbE/g Triticale und mehr als 16 Wochen Lagerung und einer Sollfeuchte von 19 % (Beginn U=18,9 %; Ende U=18,4 %) die Bildung von Ochratoxin A (OTA) beginnen kann. Nach 20 Lagerwochen konnten 22 ± 2 µg OTA/kg nachgewiesen werden. Dies steigerte sich bis auf 635 ± 77 µg/kg nach 28 Lagerwochen. Nach 28 Lagerwochen konnte auch in den 18 % Varianten (Beginn U=17,5 %; Ende U=17,2 %) OTA nachgewiesen werden, allerdings lagen die Gehalte im Bereich der Nachweisgrenze. Bei den Triticaleproben mit OTA wurden auch CT-Analysen durchgeführt. Es konnte jedoch kein CT bestimmt werden, obwohl die Nachweisgrenze gegenüber früheren CT-Analysen um den Faktor 10 (Nachweisgrenze < 10 µg/kg) gesenkt werden konnte.
Offensichtlich wird CT erst gebildet, wenn schon mehr als 1 mg OTA/kg Getreide gebildet wurde. Bei der Beurteilung der Futtertauglichkeit ist dies zu berücksichtigen.

A rapid extraction method for ochratoxins A and B from blood serum of swine

V. G. Curtui[1] and M. Gareis[2]
[1] Dairy Science, Institute of Veterinary Food Science, Justus-Liebig-University, Ludwigstrasse 21, 35390 Giessen, Germany
[2] Institute for Microbiology and Toxicology, Federal Centre of Meat Research, E.-C.-Baumannstr. 20, 95326, Kulmbach, Germany

A simple method for the extraction of ochratoxins A (OTA) and B (OTB) in pig blood serum is presented. The method includes serum acidification (pH < 1.6) and precipitation of protein with 15% trichloroacetic acid, liquid partitioning with dichloromethane and fluorescence detection. The estimated detection limit was 0.1 ng OTA /ml and 0.2 ng OTB /ml. The mean recovery from artificially contaminated samples (n = 6 replicates/mycotoxin) spiked at 0.3, 1 and 3 ng OTA and OTB/ml, respectively, was 86.8% (s.d. = 8.4) for OTA and 90.0 % (s.d.= 9.8) for OTB. Naturally contaminated pig blood serum samples (n = 52) were found OTA positive (94%) in the range 0.1-13.39 ng/ml. No sample was found positive for OTB. The method is technically simple, specific, cost effective, suitable for large sample throughput and requires small amount of sample and reagents. It fulfils the criteria for a routine method and could be a suitable tool for surveying OTA in pig herds and in slaughter pigs.

Einsatz einer kombinierten Immunoaffinitätssäule zum Nachweis von Aflatoxinen (B1, G1, B2, G2), Ochratoxin und Zearalenon

Roswitha Göbel
Institut für Veterinär-Pharmakologie und Toxikologie GmbH, Weißenseer Str. 36, 16321 Bernau

In Getreide- und Futtermitteln ist oftmals die gleichzeitige Bestimmung der Mykotoxine Aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2, Ochratoxin A (OTA) und Zearalenon (ZEA) erforderlich.

Bisher werden dabei die Mykotoxine jeweils einzeln aus dem Substrat extrahiert, gereinigt und detektiert. Dies ist meist mit einem erheblichen Zeit- und Materialaufwand verbunden. Die kombinierte Analytik der genannten Mykotoxine wird bisher nur wenig eingesetzt.

Ziel der Untersuchungen war es, für die genannten Mykotoxine eine gemeinsame Reinigung und Detektion zu ermöglichen, wobei Immunoaffinitätssäulen zum Einsatz kommen sollten.

Zur Extraktion von Getreideproben wurden Acetonitril-Wasser- bzw. Methanol-Wasser-Mischungen eingesetzt. Die Reinigung erfolgte über eine neue „AflaOchraZea-Säule" der Fa. VICAM. Vergleichend wurden Immunoaffinitätssäulen der Fa. VICAM eingesetzt, mit denen jeweils nur die einzelnen Mykotoxine analysiert werden konnten.

Die Reinigung von verschiedenen Getreideextrakten führte mit der neuen kombinierten „AflaOchra-Zea-Säule" zu sauberen Extrakten, so dass sich niedrige Blindwerte und Nachweisgrenzen für verschiedene Matrizes ergaben. Beim Einsatz von Getreideproben, denen die genannten Mykotoxine zugesetzt wurden, konnten bei Einsatz der kombinierten „AflaOchraZea-Säule" hohe Wiederfindungsraten ermittelt werden.

Über die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen mit einzelnen Immunoaffinitätssäulen und der kombinierten „AflaOchraZea-Säule" wird berichtet.

Alternative and simple approaches for quantification of aflatoxins separated by thin-layer chromatography

Joerg Stroka and Elke Anklam
European Commission, DG Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, Food Products Unit, I-21020 Ispra.

Aflatoxins are secondary metabolites produced by the fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus Parasiticus*. They can be found in a wide range of food and feeding stuff and are hazardous to both humans and animals. Current maximum levels set by the European Commission are 2 ng/g aflatoxin B1 and 4 ng/g total aflatoxins for groundnuts, nuts, dried fruits and cereals.
Since their discovery, methods based on thin-layer chromatography (TLC), high-performance liquid chromatography (HPLC) or enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) have been developed. Among these, TLC is the method which requires the least instrumentation and materials. This makes it suitable for the analysis of aflatoxins under unfavourable conditions.

Since aflatoxins are highly fluorescent (excitation 366 nm, emission >420 nm) the quantification of aflatoxins is usually performed by visual comparison of the unknown with standards under UV light or by densito-fluorometric scans of the developed TLC-plates. In the first case the precision and reliability of the results depends directly on skilled and experienced personal, while in the latter case expensive devices with costs comparable to HPLC equipment are necessary.
Thus, simple and reliable alternative low cost densitometers are highly desirable. We describe in this presentation 2 new approaches: one is based on the use of computer office scanners (COS); the other is based on a semiconductor based detection cell (SeBaDeC). These densitometers can be used for aflatoxin quantification on common TLC plates.
Both detection approaches (COS and SeBaDeC) have shown excellent results in in-house validation studies compared to commercial densitometers.
The data evaluation can be performed with any data recording device e.g. PalmPCs or high-technology toys (Game-boy) in combination with an analogue-digital converter and software.

Investigation of a detection system for simultaneous determination of various mycotoxins

Andri Papadopoulou-Bouraoui, Joerg Stroka and Elke Anklam
European Commission, DG Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, Food Products Unit, I-21020 Ispra.

Aflatoxins (AFs) B_1, B_2, G_1, and G_2 (AFB_1, AFB_2, AFG_1 and AFG_2), Ochratoxin A (OTA), Fumonisins (FBs) B_1 and B_2 (FB_1 and FB_2), and Zearalenone (Zea) are toxic secondary metabolites of the Aspergillus, Penicillium, and Fusarium species. They are classified as carcinogenic or considered to be potentially carcinogenic and can occur in a wide range of food commodities, including cereals such as barley and corn that are used in beer brewing.

The monitoring of food commodities for mycotoxins as a result of limits set by regulations, or to be established by many countries worldwide has also created the need for adequate analysis methods. Various studies have shown the possibility of contamination of beer with AFs, OTA, FBs and Zea, and numerous surveys conducted worldwide on beer confirm this possibility (1). Since various mycotoxins can often co-occur in beer, their simultaneous detection is desirable.

In this paper we present the development of two novel methods for multiple mycotoxin detection in beer. The first method involves the simultaneous detection of AFs and OTA, and the second the simultaneous detection of FBs and Zea. Both methods include an immunoaffinity column (IAC) clean-up step followed by a reversed-phase high-pressure liquid chromatographic separation and detection by fluorescence.

For the first group of mycotoxins (AFs and OTA), two different types of post-column derivatization techniques, one involving bromination and the other photochemical irradiation (2) were applied and compared. The simultaneous determination of the second group of mycotoxins (FB_1, FB_2 and Zea) included a pre-column derivatization method for FB_1 and FB_2 involving *o*-phtaldialdehyde (OPA) and 2-mercaptoethanol.

References

[1] Scott P.M., 1996. Mycotoxins Transmitted into Beer from Contaminated Grains During Brewing. Journal of AOAC Int., 79: 875-882.
[2] Papadopoulou-Bouraoui A., Stroka J., Anklam E., 2001. Comparison of Two Post-Column Derivatization Systems for the Determination of Aflatoxins in Food: Photochemical *vs.* Bromination. J. of AOAC. Int. (in print).

Der lange Weg zur Herstellung von zertifizierten Referenzmaterialien für die Zearalenon-Analytik

R. Krska and R. Josephs
Analytikzentrum, IFA-Tulln, Konrad-Lorenz-Str. 20, A-3430 Tulln, Austria

The contamination of food and animal feed by fungi is a world wide problem. The mycotoxin zearalenone (ZON), a fungal metabolite, which is mainly produced by *Fusarium* species on maize, is an important mycotoxin in both the temperate and the warm regions of the world. Numerous surveys and monitoring studies on the presence of mycotoxins indicate that ZON and the large group of trichothecenes (e.g. deoxynivalenol) belong to the most prevalent *Fusarium* mycotoxins with respect to agricultural production. ZON has been implicated in a range of human and animal diseases. It shows marked oestrogenic and anabolic properties and can cause severe reproductive and infertility problems in farm animals, particularly in pigs. The risk of ZON contamination has been addressed by several food authorities in different countries and will increasingly become a quality criterion in trade especially for maize. Therefore, ZON belongs to the frequently analyzed mycotoxins and ZON analysis has been included in the internal quality control of maize production in many cereal handling companies. However, there is no certified reference material (CRM) available for ZON analysis, which would enable the comparability of measurement results between laboratories. Therefore, the European Commission (program Standards, Measurement and Testing – SMT) has funded a project coordinated by the IFA-Tulln whose overall objective is the preparation and certification of maize, naturally contaminated with ZON, to be used as reference samples for ZON analysis and to improve the quality of analysis for ZON. Since commercial mycotoxin standards are known to vary in purity and there are in addition great differences between the extinction coefficient used there is also a need for certified ZON standard solutions. This need is also addressed by the current SMT-project.

The preliminary intercomparison studies were carried out by a consortium of 27 laboratories from 11 different countries. Three of the laboratories additionally take responsibilities for substantial parts of other project activities.

In this paper we will report on the feasibility studies for the preparation of the candidate reference maize materials which comprises the preparation and certification of a solution of ZON in an organic solvent, characterisation of the maize matrix, stability studies, preliminary intercomparison studies and improvement of the analytical methods. These results can be of great value for any laboratory analysing ZON in maize and other commodities.

Ergebnisse einer Zertifizierungsstudie zur Bestimmung von Zearalenon in Mais

Ralf Josephs[1, 2] *und Rudolf Krska*[1]
[1] IFA-Tulln, Analytikzentrum, Konrad Lorenz-Str. 20, A-3430 Tulln
[2] EC-IRMM-JRC Geel, Reference Materials Unit, Retieseweg, B-2440 Geel (current address)
(ralf.josephs@irmm.jrc.be)

Das wachsende öffentliche Interesse an Chemikalien die eine hormonähnliche Wirkung entfalten können („endocrine disruptors"), führt auch zu einem steigenden Interesse an östrogenwirkenden Mykotoxinen, wie Zearalenon (ZON). Damit unerwünschte Begleiterscheinungen durch die Kontamination von Nahrungs- und Futtermitteln mit solchen Mykotoxinen verhindert werden können, sind dementsprechend präzise und richtige analytische Bestimmungen an kritischen Stellen der Lebens- und Futtermittelkette erforderlich. In einigen Ländern wird die Kontamination von Lebensmitteln mit ZON bereits von den Behörden reglementiert.

Zertifizierte Referenzmaterialen (CRMs) tragen in hohem Maße dazu bei, dass entsprechende Bestimmungsmethoden entwickelt werden können und helfen die Vergleichbarkeit und Rückführbarkeit von Meßergebnissen zu gewährleisten.

Im Rahmen eines 4-jahrigen Projektes des „Standard, Measurement and Testing" Programmes der EC wurde durch zwei vorausgehende Ringversuche die Basis für die Zertifizierung von Referenzmaterialien für ZON in Mais geschaffen. Nach der Überprüfung und Verbesserung der Leistungsfähigkeit der analytischen Methoden der einzelnen Teilnehmer durch diese umfangreichen Vorversuche, wurde von Okt. bis Dez. 2000 die Zertifizierungsstudie mit 26 Teilnehmern durchgeführt.

Die verwendeten Bestimmungsverfahren für ZON basierten fast ausschließlich auf der Hochleistungschromatographie (RP-HPLC) in Verbindung mit Fluoreszensdetektion. Zur Probenvorbereitung wurden überwiegend Immunoaffinitätssäulen, in einigen Fällen aber auch die klassische flüssig/flüssig-Extraktion eingesetzt.

Die Teilnehmer hatten an drei verschiedenen Tagen jeweils eine natürlich mit ZON kontaminierte Maisprobe und eine kontaminationsfreie Maisprobe doppelt zu analysieren. Die Ergebnisse wurden mit der Wiederfinderungsrate korrigiert, die durch die Bestimmung von künstlich mit ZON kontaminierten Mais erhalten wurde. Ferner mussten an jedem Tag neue Kalibrierungen mit einer gemeinsamen ZON Standardlösung erstellt werden.

Im Vergleich mit den Resultaten der vorausgehenden Ringversuche zeigt die vorläufige Auswertung dieser Zertifizierungsstudie eine weitere deutliche Verbesserung der Vergleichbarkeit der Labormittelwerte für das natürlich mit ZON kontaminierte Maisreferenzmaterial, u.a. hervorgerufen durch die Herstellung und des Einsatzes der gemeinsamen ZON Standardlösung.

Neben dem natürlich mit ZON kontaminierten Mais wurde auch ein „kontaminationsfreies" Maisreferenzmaterial mit < 5 µg/kg ZON in Mais bestätigt.

Die Summe der Ergebnisse für den künstlich mit ZON kontaminierten Mais verdeutlicht außerdem, dass die analytischen Methoden der Teilnehmer die Methodenkriterien des „Europäischen Komitees für Normung" (CEN) für ZON erfüllen [CEN Report, CR 13505 (1999)].

Metabolisierung von Zearalenon im Schwein: Bestimmung von Zearalenon und seiner Metabolite im Urin und Fleisch des Schweines

P. Zöllner[1], J. Jodlbauer[1], M. Kleinova[1], T. Kuhn[3], H. Kahlbacher[2], W. Hochsteiner[2], W. Lindner[1]
[1] Institut für Analytische Chemie, Universität Wien, Währinger Str. 38, A-1090 Wien, Österreich
[2] II. Medizinische Universitätsklinik für Klauentiere, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, A-1221 Wien, Österreich
[3] Bundesanstalt für Tierseuchenbekämpfung, Robert-Koch-Gasse 17, A-2340 Mödling, Österreich

Zearalenon (ZON), α- und β- Zearalenol (α- und β-ZOL), Zeranol (α-Zearalanol, α-ZAL), Taleranol (β-Zearalanol, β-ZAL) und Zearalanon (ZAN) besitzen alle zum Teile starke östrogene Wirksamkeit bei Mensch und Tier. ZON, α- und β-ZOL werden von verschiedenen *Fusarium* Pilzen auf diversen Getreidesorten als Sekundärmetaboliten (Mykotoxine) gebildet. Insbesondere für ZON wurden daher in vielen Ländern Grenzwerte zwischen 30 und 1000 μg/kg Getreide festgelegt. Zeranol (α-ZAL) wird und wurde weitverbreitet als Mashilfsmittel eingesetzt. Seit 1985 ist seine Verwendung in der EU vollkommen verboten, während es jedoch in den USA nach wie vor legal eingesetzt werden darf. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß Rinder ZON in α- und β-ZOL und in nicht unbeträchtlichem Maße in Taleranol sowie in das in der EU verbotene Zeranol metabolisieren können [2;3]. Daraus erhebt sich die Grundsatzfrage, inwiefern zwischen Zeranol Mißbrauch und natürlicher Kontamination durch ZON Metabolisierung unterschieden werden kann bzw. inwiefern ein ZON Grenzwert für Futtermittel einzusetzen wäre, um eine Bildung nachweisbarer Mengen des verbotenen Zeranols zu unterbinden.

Ziel der hier vorgerstellten Tierstudie war es, zu untersuchen, in welchem Ausmaß und auf welche Weise Schweine ZON metabolisieren und inwiefern ZON oder seine Metabolite in Muskelgewebe, das schlußendlich zum menschlichen Verzehr gedacht ist, eingelagert werden. Dazu wurden sieben Schweine über einen Zeitraum von 14 Tagen eine Tagesdosis von 0.7 mg Zeralenon (ZON) pro Tier in Form eines ZON belasteten Futtergetreides verabreicht. Zur Kontrolle wurde eine weitere Gruppe von sieben Tieren ZON freies Getreide verfüttert. Nach Abschluß des Versuches wurden alle Tiere geschlachtet und Gewebeproben von der Rückenmuskulatur und vom Schlögel der Tiere genommen. Während des Versuches wurden zudem jeden Tag Urinproben von den Versuchstieren genommen. Die Harn- und Gewebeproben wurden nachfolgend auf ZON, α- und β-ZOL, Zeranol (α-ZAL), Taleranol (β-ZAL) und ZAN analysiert. Die gewählte Analysemethode [1] umfaßt neben einem Extraktionsschritt für die Gewebeproben, sowie der enzymatischen Deglukuronidierung der Urinproben einen Festphasenextraktionschritt zur Probenaufreinigung bzw. -anreicherung. Mittels LC-MS/MS können abschließend nicht nur sehr empfindlich, sondern auch zweifelsfrei alle Analyten identifiziert und quantifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Studie werden im Rahmen dieses Vortrages vorgestellt und im Lichte bereits bestehender lebensmittelrechtlicher Bestimmungen innerhalb der EU diskutiert.

[1] J. Jodlbauer, P. Zöllner, W. Lindner, *Chromatographia* 51 (2000), 681.
[2] A.F. Erasmuson, B.G. Scahill, D.M. West, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994), 2721.
[3] D.G. Kennedy, S.A. Hewitt, J.D.G. McEvoy, J.W. Currie, A. Cannavan, W.J. Blanchflower, C.T. Elliot, *Food Add. Contam.* 15 (1998), 393

Entwicklung einer neuen Detektionsmethode zur Bestimmung von Fusarien Pilzen auf Mais mittels FTIR/ATR Spektroskopie

Gregor Kos, Hans Lohninger und Rudolf Krska
IFA-Tulln, Analytikzentrum, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln
Telefon: +43-2272-66 280-409; Fax: -403
Email: gkos@ifa-tulln.ac.at

Fusarium graminearum ist einer der wichtigsten Pilze, die auf Mais zu finden sind und richtet großen wirtschaftlichen Schaden an, da er den Nährwert von Tierfutter herabsetzt und durch die Produktion von Mykotoxinen (v.a. Deoxynivalenol) die Produktivität in der Tiermast reduziert. Konventionelle Methoden zur Bestimmung von Ergosterol (als Parameter für die Pilzmasse) und Deoxynivalenol sind arbeits- und zeitintensiv [1]. Lange Analysendauern (mit HPLC-DAD und GC-MS) setzen den Probendurchsatz herab. Eine schnelle Bestimmungsmethode ohne aufwändige Probenvorbereitung könnte rasch einen Überblick über mögliche Kontaminationen durch Pilze in Getreide und Mais ermöglichen.

Dieser Abstract beschreibt eine neue Methode zur Detektion von *Fusarium graminearum* auf Mais durch die Anwendung von Fourier Transform Infrarot Spektroskopie mit abgeschwächter Totalreflexion (FTIR/ATR). In dieser Studie wurde der Pilz selbst durch Aufnahme des Mid-Infrarot Spektrums (600-4000 cm^{-1}) bestimmt, indem die gemahlene Probe mit einem Stempel reproduzierbar gegen einen ATR Kristall aus Diamant gepresst wurde, der horizontal in der Probenkammer eines FT-IR Spektrometers montiert war. Dadurch war der Kontakt zwischen Probe und Kristall gesichert

Referenzmessungen wurden durch die Bestimmung von Ergosterol durchgeführt, nach einer Methode, die von Schwadorf and Müller beschrieben wurde [2]: Die Proben wurden mit einer Mischung aus Methanol, Ethanol und Kalilauge bei 80°C für 30 min extrahiert und nach einer Vorreinigung mittels Isolute® Säulen mit Hexan eluiert. Ergosterol wurde mittels HPLC-DAD bei 282 nm detektiert und die erhaltenen Konzentrationen als Parameter für die gesamte Pilzmasse in der Probe verwendet [2]. Die Referenzwellenlänge lag bei 585 nm.

Multivariate Datenanalyse diente zur Interpretation der Spektren, da die Auswertung einzelner Banden keine zufriedenstellenden Ergebnisse brachte. Hauptkomponentenanalyse (PCA) wurde zur Trennung von kontaminiertem Mais und nicht infiziertem Material angewandt. Die Spektren wurden mit den entsprechenden HPLC Resultaten mittels Hauptkomponenten Regression (PCR) korreliert.

Geplante Arbeiten für die Zukunft beinhalten sowohl die Optimierung der Methode zur Verbesserung der Empfindlichkeit als auch die Untersuchung von einzelnen Körnern verschiedener Getreidesorten (z.B. Weizen, Mais). Darüber hinaus werden auch Vergleichsmessungen mit anderen Infrarotspektroskopischen Methoden vorgenommen. Zur Auswertung werden auch andere multivariate Methoden untersucht. (z.B. Neuronale Netze, Cluster Analyse).

References:
[1] V. Betina, Chromatography of Mycotoxins, J. of Chromatography Library, 54 (1993)
[2] K. Schwadorf and H. Müller, Determination of Ergosterol in Cereals, Mixed Feed Components and Mixed Feeds by Liquid Chromatography, J. of AOAC, 72, 457-462 (1989)

Zur Bewertung von Mykotoxinbefunden in der Praxis

Hanna Wolf[1], E. Schwedler[1], P. Steinbach[2]
[1] Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Mecklenburg-Vorpommern
[2] Landespflanzenschutzamt Mecklenburg-Vorpommern

In den letzten Jahren hat eine Intensivierung der Forschungsaktivitäten auf dem Gebiet der Mykotoxine zu einem beachtlichen Erkenntniszuwachs geführt, der eine immer bessere Risikoabschätzung für Mensch und Tier ermöglicht. Dennoch ist die Umsetzung dieser Ergebnisse in der Praxis der Nutztierhaltung oft schwierig und führt nicht selten zu Irritationen. Das liegt in erster Linie in der Tatsache begründet, dass Mykotoxikosen, sofern man darunter monokausal bedingte Erkrankungen versteht, in der Regel nicht vorkommen. Die im Zusammenhang mit Mykotoxinen vielfach beschriebenen Symptome sind meist nicht spezifisch und lassen daher eine gezielte Diagnostik nicht zu. Vielmehr besteht die Schwierigkeit darin, den Mykotoxinen in jedem einzelnen Fall einen objektiven Stellenwert in einer Reihe von ursächlich infrage kommenden Faktoren zuzuordnen.

Im Zusammenhang mit der Einsendung von Futtermitteln und Sektionsmaterial überwiegend aus Rinderbeständen an das Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Mecklenburg-Vorpommern wird nicht selten vorberichtlich der Verdacht auf eine Mykotoxinwirkung erhoben. Anhand von Fallbeschreibungen werden die Schwierigkeiten bei der Bewertung von Mykotoxinbefunden dargelegt. In vielen Fällen konnte diese Ursache durch eine gründliche differenzialdiagnostische Abklärung ausgeschlossen werden. Niedrige Mykotoxinwerte in Futtermitteln, die im Zusammenhang mit Stoffwechselstörungen und Leistungsdepressionen erhoben wurden, sollten sachkundig bewertet und kritisch hinterfragt werden. Die Frage nach der Beteiligung von Mykotoxinen an einem Verlustgeschehen ist meist nicht mit der Untersuchung auf ein spezifisches Mykotoxin zu beantworten. Die Diagnostik sollte deshalb um mykologische Untersuchungen und um Methoden erweitert werden, die ein breites Spektrum erfassen, z. B. Zytotoxizitätsbestimmungen (MTT-Test).

In Zuchtschweinebeständen wird bei Fruchtbarkeitsstörungen häufig der Verdacht auf eine Fusariumtoxikose geäußert. Nachweise von Zearalenon und Deoxynivalenol (DON) in Gallenflüssigkeit von Schweinen werden dabei nach unserer Erfahrung in vielen Fällen überbewertet. Die Frage nach der Eintragsquelle kann jedoch oft nicht beantwortet werden, da die Befunde sich im Futtermittel nicht reproduzieren lassen.

Aufgrund dieser aufgezeigten Probleme bei der Bewertung von Mykotoxinbefunden wurde Getreide der Erntejahre 1999 und 2000 in Mecklenburg-Vorpommern auf die Mykotoxine DON und Zearalenon mit dem Ziel untersucht, eine Risikoabschätzung für die Tierbestände noch vor dem Einsatz als Futtermittel vornehmen zu können. Die Untersuchungen wurden mit einem ELISA durchgeführt. Herausragende Werte wurden mit einer zweiten Methode (HPLC) bestätigt. Im Ergebnis wurde in beiden Jahren nur eine geringe Mykotoxinbelastung ermittelt. Zearalenon konnte in 133 Proben nicht nachgewiesen werden (< 50 µg/kg). Lediglich 31 von 157 untersuchten Proben enthielten DON in Konzentrationen von 0,2-0,6 mg/kg. Der Fusarienbefall, darunter potente Arten wie F. graminearum und F. culmorum, wurde ebenfalls als geringgradig eingestuft.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass mit der Verfütterung von Getreide dieser beiden Erntejahre in M-V nur ein geringes Risiko für die Tierbestände besteht. Diese Informationen sollten durch Untersuchung weiterer Futtermittelarten und durch Ergebnisse aus anderen Regionen ergänzt werden.

Richtwerte für Mykotoxine in Futtermitteln von Nutztieren

M. Schuh
II Medizinische Universitätsklinik für Klauentiere, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien. E-mail: maximilian.schuh@vu-wien.ac.at

Mykotoxine stellen Sekundärstoffwechselprodukte von potentiell toxigenen Schimmelpilzen dar, die in allen für unsere Nutztiere relevanten Futtermittelkomponenten vorkommen und werden unter bestimmten Bedingungen sowohl auf dem Feld (Fusarien) als auch während der Lagerung (Aspergillen, Penicillien) gebildet. In den letzten Jahren haben Untersuchungsergebnisse gezeigt, dass besonders Mais (Körnermais, Maissilagen), Hafer, Gerste, Mischfutter und pelletiertes Futter vor allem für Nutztiere positive Mykotoxinbefunde erbrachten. Damit verbunden sind eklatante Leistungseinbußen in Rinder-, Geflügel- und Schweinebetrieben und somit enorme wirtschaftliche Verluste für den Tierbesitzer die Folge.

Mit besonderen Problemen ist dann zu rechnen, wenn durch längerfristige Verabreichung mykotoxinkontaminierter Futtermittel chronische Schäden bei den betroffenen Tieren auftreten und Entschädigungsansprüche von Seiten des Tierbesitzers gestellt werden und auf legistischem Weg eine Lösung der Probleme erfolgen soll.

Um einen kausalen Zusammenhang zwischen dem eingetretenen Schadensfall durch mykotoxinhältige Futtermittel und den gesundheitlichen Schäden der inkriminierten Nutztiere herstellen zu können sind mehrere Kriterien unbedingt zu berücksichtigen. Grundsätzlich kann die Diagnose Mykotoxikose aufgrund der in der Regel unspezifischen klinischen Symptome der betroffenen Tiere nur durch den chemisch-analytischen Nachweis der betreffenden Mykotoxine in den inkriminierten Futtermitteln, Serum- oder Organproben gestellt werden. Dafür ist eine repräsentative Futterprobe (amtliche Futterprobenentnahme) und ein exakter Vorbericht des praktischen Tierarztes unerlässlich, wobei vorerst andere Krankheitsursachen wie Bakterien, Viren, Parasiten sowie Managementfehler oder Hygienemängel ausgeschlossen werden müssen.

Besondere Probleme hinsichtlich der Interpretation von Untersuchungsergebnissen sind vorprogrammiert, da sowohl in den verschiedenen europäischen Ländern als auch in den USA und Kanada sehr unterschiedliche sogenannte Richtwerte für die am häufigsten vorkommenden Mykotoxine (DON, ZON, OA), bezogen auf die klinisch relevanten Konzentrationen bei den Tierspezies Rind, Schwein und Geflügel, angewendet werden.

Aufgrund dieser Unsicherheiten innerhalb von Spezialisten auf dem Gebiet der Mykotoxinforschung und der praktischen Anwendung als Interpretationshilfe von Mykotoxinbefunden wäre es wichtig und wünschenswert eine Vereinheitlichung der Richtwerte für die wichtigsten und praxisrelevanten Mykotoxine im Rahmen dieses Workshops zu erarbeiten, um bei o.a. Problemfällen eine einheitliche Vorgangsweise zu ermöglichen. Gerade diesem Fachgremium sollte es aufgrund experimenteller Untersuchungen sowie durch die langjährige Erfahrung auf dem Gebiet der Mykotoxikosen in der Nutztierpraxis gelingen, um eine entscheidende Hilfestellung der Futtermittelindustrie, den Tierbesitzern und praktischen Tierärzten geben zu können.

Mycotoxin Control for Food Safety and Trade

M.B. Doko
International Atomic Energy Agency (IAEA), Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Food and Environmental Protection Section,
Wagramer Strasse 5, P.O. Box 100, A-1400 Vienna, Austria.
Tel: +43 1 2600 26058; Fax: +43 1 26007
E-mail: B.Doko@iaea.org

The harmful effect of mycotoxin contamination of commodities on human and animal health and the subsequent negative impact on national and international trade is increasingly recognized by national authorities in both advanced and developing countries. In most of the developing world, official monitoring of mycotoxin is rare. There are few regulations or guidelines and seldom are there economic incentives for high quality products with acceptably low levels of mycotoxin contamination. To assist national food control authorities to strengthen their analytical capabilities for food contaminants (mycotoxin and microbiological contaminants, pesticide and veterinary drug residues, radio nuclides), an FAO/IAEA Training and Reference Centre for Food and Pesticide Control (TRC) was established at FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratories, Seibersdorf, Austria in 1998. Activities with regard to mycotoxin control in food that have been implemented in recent years included:

- The organization of the FAO/IAEA Consultants Meeting on Analytical Methods for Determining Mycotoxin Contamination of Food/Feed in Trade (1997);
- The implementation of a five-year FAO/IAEA Co-ordinated Research Programme (from 1998) on *Evaluation of Methods of Analysis for Determining Mycotoxin Contamination of Food and Feed* (under technical/research contracts and research agreements covering areas ranging from the improvement of mycotoxin clean-up techniques, analytical methodologies, to the use of radio labelled compounds to assess mycotoxin distribution in processed foods), and laboratory proficiency testing programmes, involving laboratories/research centres in developed and developing countries;
- Regional Training Workshops on Development of Quality Assurance for Mycotoxin Determination in Food and Feed organized for Asia and Pacific (1999), Latin America (2000), Eastern Europe (2000), and Near East/Africa (2001);
- Implementation of a two-year mycotoxin project (from 2001) with the National Agency of Food and Drug Administration and Control (NAFDAC) Nigeria, funded by IAEA Technical Co-operation Project NIR5030 (*Regulatory Control and Monitoring of Contaminants and Residues in Fresh Produce*), to improve the safety and quality of foods and to provide up-to-date information on methods of regulatory control in order to comply with international standards for mycotoxin control.

Activities of the TRC are aimed to provide knowledge and up-to-date information, and strengthen capacities within national food control laboratories enabling compliance with international standards and codes of conduct through the use of analytical methodologies. The IAEA TC project is meant to enable appropriate capacity building in mycotoxin control, and thereby to foster systematic and sustainable food quality control policy to ensure consumer safety.

Funktion der Zeolithe bei der Mykotoxinbindung sowie die Kombination mit Nukleotiden

Eduard Mazelle
unipoint ag
Langenmoos 9, 8467 Truttikon, Schweiz
unipoint@swissonline.ch

Der Einsatz von Mineralien wie Bentonite, Vermiculite, die Zugabe von Enzymen sowie auch Hemicellulosen (Polymannosen) aus Hefeextrakten zur Inaktivierung von Mykotoxinen ist bekannt. Versuche haben jedoch unterschiedliche Resultate aufgezeigt. Wenn jedoch ein Zeolithmineral, ein Klinoptilolith in einem speziellen Verfahren aufbereitet und aktiviert wird, so kann die Bindung gegenüber Mykotoxinen verbessert werden. Ein solches Produkt mit dem Namen Klinofeed hat sich als ein sehr wirkungsvolles Bindemittel gegenüber Mykotoxinen gezeigt. Weitere Tests in vitro und in vivo liegen nun vor und zeigen überzeugende Resultate auf.

Alle Arten der Bindung der Mykotoxine, der enzymatischen Spaltung sowie der mechanischen Trennung kann nicht als endgültige Lösung des Problems betrachtet werden. Mykotoxine, aber auch Toxine die durch den Stoffwechsel oder durch Stress entstehen, belasten die Leber und greifen das Immunsystem direkt an. Aus diesem Grund wird mit dem Produkt Klinosan ein ganz neuer Weg eingeschlagen. Klinosan ist eine Kombination von Klinofeed mit Nukleotiden. Die Funktion ist folgende: Die Bindung der Mykotoxine durch Klinofeed und die direkte Unterstützung der Leber und des Immunsystems durch die Nukleotide. Bekanntlich sind die Nukleotiden Bestandteile jeder Zelle. Immunologen haben aufgezeigt, dass die Bildung neuer Zellen entscheidend davon abhängt welche Mengen Nukleotide vorhanden sind. Die Nukleotide im Klinosan gelangen mit der Nahrung über die Pfortader direkt in die Leber und stehen für die Bildung von neuen Zellen direkt zur Verfügung. Die Leber als ‚Entgiftungsorgan' vom Körper wandelt alle toxischen Verbindungen in ungiftige Metaboliten um. Bei diesen Prozess werden Leberzellen zerstört. Somit ist eine schnelle und zuverlässige Neubildung von Zellen der entscheidende Faktor für den Zustand der Leber, bzw. des Immunsystems. Die vorliegenden Versuche mit Klinosan zeigen auf, dass die Zuführung von Nukleotiden sich entscheidend für die Bewältigung der Belastung durch alle Toxine darstellt.

[1] A. Blüthgen und M. Schwertfeger, Bundesantalt für Milchforschung, Kiel 2000 und Trevor K. Smith et. al. Ontario und Ewen J. Mac Donald, Kuopio, Finnland 2000
[2] Schuh, M. Binder, E. M.; Plank, B. Experimental studies on the effect of two additives as detocifaicants of deoxynivalenol contaminated feed of growing pigs. the 16th internat. pig veterinary society congress, Melbourne, 17-20 Sept. 2000 und andere

Adsorption von Mykotoxinen

N. Thimm[1], B. Schwaighofer[2], F. Ottner[2], H. Fröschl[3], S. Greifeneder[2], E.M. Binder[1]
[1] Biomin G.T.I. GmbH, Industriestr. 21, A-3430 Herzogenburg,
[2] Institut für Angewandte Geologie, Universität für Bodenkultur Wien, Peter Jordan-Straße 70, A-1190 Wien,
[3] Österreichisches Forschungszentrum Seibersdorf Ges.m.b.H, Geschäftswelt Chemische Analytik, Faradaygasse 3, A-1030 Wien

Futtermittel, die mit Mykotoxinen kontaminiert sind, bilden weltweit ein Problem für die Futtermittelindustrie [1]. Zur Dekontamination von mit Mykotoxinen kontaminierten Futtermitteln wurden verschiedene physikalische und chemische Methoden wie die Separation der befallenen von den nichtbefallenen Körnern, Waschen, Schälen, Behandlung mit Aluminiumhydroxid oder Hydrogenperoxid getestet. Methoden dieser Art kommen aber aufgrund geringer Effizienz bzw. Verminderung des Nährwertes der Futtermittel selten zum Einsatz [2,3]. Eine häufig verwendete und in der Literatur diskutierte Methode ist der Zusatz von Adsorbentien zum Futtermittel, die im Tier, während der Verdauung, das Potential haben, Mykotoxine zu binden [2].

In der hier vorgestellten Studie wurden zahlreiche Tonminerale (Smektite, Kaolinite, Vermikulite) sowie Zeolithe *in vitro* auf ihre Adsorptionskapazität gegenüber den Mykotoxinen Aflatoxin B_1, Zearalenon und Ochratoxin A getestet. Als Testsystem wurden zwei unterschiedliche Puffer (pH 3 und pH 6,5), versetzt mit Mykotoxinen, verwendet. Die Tonmineralien und Zeolithe wurden in verschiedenen Konzentrationen den Puffern beigefügt und die Ansätze 1h bei 37°C geschüttelt. Nach Zentrifugation und Filtration der Proben wurden die verbleibenden Konzentrationen der Mykotoxine in Lösung mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert. Bei jeder Versuchsserie wurden mehrere Blank-Proben (Puffer mit Mykotoxinen und ohne Adsorbentien) mitgeführt. Der Prozentanteil adsorbiertes Mykotoxin wurde durch den Vergleich der Konzentration in den Blank-Proben und den Proben mit Adsorbent ermittelt.
Um zu untersuchen, ob die Bindung der Mykotoxine an die Adsorbentien reversibel oder irreversibel ist, wurden bei einigen Materialien Desorptionstests durchgeführt.
Generell ist festzustellen, dass die Adsorption von Mykotoxinen vom pH-Wert abhängig ist. Als Beispiel sei die Adsorption von Aflatoxin B_1 an Zeolithe genannt, bei der die Bindungsrate bei pH 6,5 fast immer höher ist als bei pH 3 (z.B.: 71% bei pH 6,5 und 22% bei pH 3 bei einer Binder-Konzentration von 0,1%).

Um einen eventuellen Zusammenhang zwischen den Eigenschaften der Tonminerale und ihrem Adsorptionspotential gegenüber Mykotoxinen herzustellen, wurden von den Tonmineralen der Gesamtmineralbestand, die Tonmineralzusammensetzung, die spezifische Oberfläche, die Kationenaustauschkapazität und die austauschbaren Kationen bestimmt.

Wichtig ist, festzuhalten, dass die hier durchgeführte *in vitro* Studie zum Screening von möglichen Adsorbentien, die später als Futtermittel eingesetzt werden könnten, und zur eventuellen Aufklärung von Bindungsmechanismen durchgeführt wurde. Ohne die Durchführung von Fütterungsversuchen kann keine Aussage über die reale Wirkung von Adsorbentien im tierischen Verdauungstrakt erstellt werden.

[1] Charmley, L.L., H.L. Trenholm, D.B. Prelusky, and A. Rosenberg. (1995) Natural Toxins 3, 199-203.
[2] Charmley, L.L., and D.B. Prelusky in J.D. Miller, and H.L. Trenholm (ed) (1994): Mycotoxins in Grain, Eagan Press, St. Paul.
[3] Doyle, M.P., R.S. Applebaum, R.E. Bracket, and E.H. Marth. (1982) J. of Food Protection, 45(10), 964-971.
[4] Grant, P.G., Phillips, T.D. (1998) J. Agric. Food Chem., 46, 599-605.

Zytotoxizität der Extrakte von Schimmelpilzen aus feuchtebelasteten Gebäuden

K. Senkpiel, T. Schulz, H. Ohgke
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Universität Lübeck

Neuere Untersuchungen im Bereich der Wohnhygiene und Umweltmedizin zeigen bei lang anhaltendem Wasserschaden eine Belastung mit toxinogenen Schimmelpilzen in Gebäuden, die bei den Bewohnern Störungen der Atemwege, Hautreizungen, Konjunktivitis und allgemeine Befindensstörungen sowie immunchemische Laborveränderungen insbesondere der Leukozyten- und T-Lymphozytenzahl hervorrufen. Diese Symptome können durch Inhalation von Endotoxinen aus gramnegativen Bakterien, Mykotoxinen und Glukanen aus Schimmelpilzen auftreten (Mykotoxitose, Toxische Alveolitis). Bekanntlich sind die optimalen Bedingungen für die Bildung von Mykotoxinen schimmelpilzbelasteter Gebäude abhängig von dem Nährstoffangebot, den Raumklimaparametern, pH-Wert und Wachstumszeit, so dass verstärktes Wachstum nicht zwangsläufig mit einer optimalen Mykotoxinbildung korrelieren muß. Eine gesundheitliche Risikoabschätzung bei Langzeitaufnahmen von Mykotoxinen im Niedrigdosisbereich durch Inhalation über luftgetragene Pilzsporen oder über den Hautkontakt ist gegenwärtig noch ungenügend untersucht worden. Daher erscheint die Überprüfung des Toxizitätspotentials in schimmelpilzbelasteten Gebäuden (Summenparameter) sinnvoll, zumal Atopiker als auch Nicht-Atopiker gleichermaßen betroffen sind. Hierzu ist der einfach durchzuführende Pollenschlauch-Wachstumstest (Testorganismus: *Nicotiana silvestris*) eine gute Alternative zu den bekannten Zellkulturtests. Da die Pollenschläuche ein sehr schnelles Wachstum zeigen (110 - 150 µm/Std) wird die mykotoxininduzierte Hemmung des Wachstums nach Anfärbung der Zellwand mit Alcian- Blau durch eine photometrische Bestimmungsmethode bei 618 nm ausgewertet. Zunächst wurden die IC_{50}-Werte von ausgewählten Standardmykotoxinen bestimmt, um anschließend den Toxizitätstest an Wildstammisolaten zu überprüfen.

Lfd.Nr.	Mykotoxinart	IC_{50}-Werte [µg/ml]	Lfd.Nr.	Mykotoxinart	IC_{50}-Werte [µg/ml]
1	Satratoxin H	0,01	5	Aflatoxin G1	3,32
2	Patulin	1,36	6	Citrinin	4,52
3	Gliotoxin	1,47	7	Ochratoxin A	6,53
4	Aflatoxin B1	2,40	8	Fumagilin	11,18

Die vorgestellte Sreening-Testmethode ist zeit- und kostensparend und kann zur Erfassung von toxinogenen Wildstämmen dienen, die anschließend nach bekannten immunchemischen Verfahren bzw. HPLC/ GC-MS-Analytik auf Mykotoxinart und -gehalt zu untersuchen sind.

[1] KIRSTEN, U., K. JUNG, W. PAPE, A. PFANNENBECKER, A. RENSCH, R. SCHELL: Performance of the pollen tube growth test in the COLIPA validation study on alternatives to the rabbit eye irritation test. Toxicology in Vitro 13 (1999) 335 – 342

[2] GAREIS, M., E. JOHANNING and R. DIETRICH: Mycotoxin Cytotoxicity Screening of Field samples. In: E.Johanning (ed), Bioaerosols, fungi and mycotoxins; Health effects, Assessment, Prevention, and Control, Saratoga Springs, New York, pp.202 -213 (1999)

Stachybotrys-Toxine in einer Münchner Wohnung mit Wasserschaden

E. Usleber[1], R. Dietrich[2], E. Schneider[1] und E. Märtlbauer[2]
[1] Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig-Universität, Ludwigstrasse 21, D-35390 Gießen
[2] Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität, Veterinärstr. 13, D-80539 München

Das Münchner Wetter war Ende Juni - Anfang Juli 2000 durch anhaltende Regenfälle und niedrige Temperaturen gekennzeichnet. In einem Münchner Mietshaus (Wohnblock fünfstöckiger Häuser) war zu diesem Zeitpunkt die Zentralheizung seit mehreren Wochen ausgefallen, so dass die Raumtemperatur teilweise bei nur 12-14 °C lag. Aus ungeklärter Ursache drang über die Zwischenmauer zum Nachbarhaus Feuchtigkeit in zwei Wohnungen im 1. und 2. Stockwerk. Die Wohnung im 1. Stock wurde zum damaligen Zeitpunkt von E.U. und E.S. bewohnt. Bei Rückkehr nach einer mehrtägigen Abwesenheit Anfang Juli wurde in einem Zimmer ein modrig-feuchter Geruch sowie Feuchtigkeitsflecken an der Rauhfasertapete bemerkt. Nach Entfernen eines Möbelstücks wurde an mehreren Stellen der Tapete ein starker Befall mit rundlichen Kolonien schwarz-gräulicher Schimmelpilzen bemerkt (ca. 0,5 bis 5 cm Durchmesser), die als charakteristisch für *Stachybotrys spp.* angesehen wurden. Unabsichtlicher Hautkontakt mit einer dieser Kolonien führte zu einem subjektiv brennenden Gefühl an der betroffenen Stelle, was nach sofortigem gründlichem Waschen der betroffenen Stelle aber wieder aufhörte. Bereits ein kurzer Aufenthalt in dem betroffenen Raum führte bei mehreren Personen zu Reizungen ("brennendes Gefühl" der Schleimhäute des Mundes und der Nase sowie zu einer Reizung der Augenbindehaut. Die Luft in diesem Raum roch trotz weit geöffnetem Fenster auch nach Tagen feucht-modrig, stickig und beklemmend und wirkte reizend auf die Schleimhäute.

Das betroffene Zimmer wurde geräumt und Proben der Tapete aus verschimmelten und nicht verschimmelten Bereichen genommen. In der Wohnung im 2. Stock war das genau darüber liegende Zimmer ebenfalls stark vom Wasserschaden betroffen, die Rauhfasertapete war großflächig durchnässt. Auch hier wurde stellenweise Schimmelpilzbefall (gleich aussehende Kolonien) festgestellt. Die Raumluft war allerdings weniger stark beeinträchtigt. Auch in dieser Wohnung wurden Proben der Tapete genommen.

Die Tapetenstücke wurden mittels eines Enzymimmuntests (EIA) auf makrocyclische Trichothecene (Stachybotrys-Toxine) untersucht. Jeweils 4 cm^2 verschimmelter oder unauffälliger Tapetenabschnitte wurden mit Methanol (5 ml) extrahiert (20 min) und anschliessend zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Phosphatpuffer verdünnt und im EIA unter Verwendung einer Roridin A-Standardkurve untersucht. Stark befallene Tapetenstücke aus der Wohnung im 1. Stock wiesen stark positive Meßwerte auf (Maximalwert 1,1 Mikrogramm/cm^2, Roridin A-Äquivalente), optisch nicht befallene Abschnitte waren negativ (<3 ng/cm^2). In der Wohnung im 2. Stock waren selbst stark befallene Tapetenstücke dagegen negativ. Eine Identifizierung des Toxins wurde nicht durchgeführt. Sollte es sich bei dem Toxin jedoch um Satratoxin H (Kreuzreaktion ca. 15%) gehandelt haben, läge die tatsächliche maximale Belastung sogar bei ca. 6-8 Mikrogramm/cm^2. Es ist davon auszugehen, dass derart hohe, potentiell gesundheitsschädliche Toxinbelastungen in Wohnräumen auch in Deutschland gelegentlich in Verbindung mit Wasserschäden vorkommen, normalerweise aber aufgrund des Fehlens mykotoxikologischer Untersuchungen nicht erkannt werden.

Ergebnisse aus 11 Jahren Fusarium-Monitoring in Bayern

Günther Bauer
Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau

Aus dem Fusarium-Monitoring liegen in Bayern Ergebnisse zum Deoxynivalenol-Gehalt von 3246 zufällig gezogenen Winterweizen-Ernteproben aus den Jahren 1989-1999 vor.

Für die epidemiologische Analyse ihrer Toxin-Belastung und die Bestimmung von Risikofaktoren für die Toxin-Bildung auf dem Feld wurde zunächst die stochastische Unabhängigkeit der betrachteten Produktionsfaktoren (Vorfrucht, Bodenbearbeitung, Sortenwahl, Fungizid-Einsatz, Witterung) nachgewiesen. Nach einer kurzen Analyse der zu Grunde liegenden Lognormal-Verteilung der DON-Gehalte wurde mit Hilfe von Rangsummentests nach WILCOXON gezeigt, dass die Vorfrucht Mais, die nicht-wendende Bodenbearbeitung nach Mais, der Anbau einer anfälligen Sorte, der Einsatz eines der Fungizide Amistar, Brio, Juwel oder Juwel Top sowie eine infektionsfördernde Witterung zur Blütezeit als Risikofaktoren (zum Signifikanzniveau 0,001) für erhöhte Toxin-Werte gelten müssen.

Der entscheidende Gedanke bei der Risiko-Abschätzung konkreter, individueller Produktionsbedingungen ist (bei a-priori unbekannter Witterung zur Weizenblüte), dass sich bei einer Kumulierung von Risikofaktoren das Toxin-Risiko multiplikativ erhöht. Dies resultiert aus der Tatsache, dass sich die Toxin-Zentralwerte der Monitoring-Proben - geschichtet nach der Anzahl vorhandener Risikofaktoren iin etwa gemäß einer Exponentialfunktion zunehmen, also anfänglich annähernd linear und anschließend progressiv.

Die unterschiedlichen Beiträge der einzelnen Risikofaktoren zum gesamten Toxin-Risiko können hieraus nicht entnommen werden, sie werden über ein mathematisch-statistisches Modell ermittelt. Ausgehend von den logarithmierten Toxinwerten lässt sich ein lineares Modell formulieren, aus dem sich ein (jahrgangsabhängiges) DON-Grundniveau von 0,03-0,06 ppm und die Gewichte der einzelnen Risikofaktoren zum Toxin-Risiko wie folgt ergeben:

Risikofaktor	Gewicht
Vorfrucht Mais	2,1
nicht-wendende Bodenbearbeitung nach Mais	4,0
anfällige Sorte	1,9
infektionsfördernde Witterung zur Weizenblüte	2,1
Einsatz von Amistar, Juwel oder Juwel Top	2,1

Das zu erwartende Toxin-Niveau einer konkreten Probe ergibt sich nach diesem Modell - bei natugemäß großer Streubreite - aus dem Grund-Niveau multipliziert mit den Gewichten der tatsächlich gegebenen Risikofaktoren.

Überraschenderweise errechnet sich nicht die Vorfrucht Mais als wichtigster Einzel-Risikofaktor, sondern die nicht-wendende Bodenbearbeitung nach Mais. Dieser Risikofaktor kann natürlich nur zusammen mit der Vorfrucht Mais gegeben sein, woraus sich für diese Kombination bereits ein Faktor von ca. 8 ergibt (=4*2). Das Toxin-Risiko jeder individuellen Risikofaktoren-Kombination wird analog durch die jeweils geeigneten Multiplikationen ermittelt.

Fusarium-Toxine in Getreide – Ergebnisse des Jahres 2000 aus 8 Bundesländern Deutschland

Ellner, F. M.
Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für ökologische Chemie
14195 Berlin, Königin Luise Str. 19

In Fortführung des Monitorings zum Auftreten von Fusarium-Toxinen in Getreide wurden im Jahr 2000 über 250 Proben aus 8 verschiedenen Bundesländern Deutschlands untersucht. Die Proben stammten sowohl von Praxisschlägen als auch von Feldversuchen verschiedenster Versuchsansteller. Berücksichtigt wurden nur solche Proben, die nicht künstlich inokuliert worden sind.

Aufgrund der Witterungsverhältnisse, wenig Niederschläge zum Zeitpunkt der Blüte, ist der Grad der Kontamination mit Mykotoxinen relativ gering. In ca. 80 % der Proben lag die nachgewiesene Konzentration an DON unter den empfohlenen bzw. diskutierten Höchstmengen (500µg/kg). Zearalenon war in nur 33% der Proben in Konzentrationen größer 50 µg/kg nachweisbar. Auffällig ist die relativ hohe Anzahl an NIV positiven Proben. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Jahren ist ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen, denn in mehr als 20% der Proben konnte NIV in Konzentrationen größer 100µg/kg nachgewiesen werden, davon in ca. 50 % mit mehr als 1000µg/kg.

Der Einsatz von Fusarium wirksamen Fungiziden führte zu einer Verringerung der Mykotoxinbelastung, so sank z.B. die mittleren DON Belastung von 910 µg/kg (alle Proben berücksichtigt) auf 635 µg/kg (Proben ohne Pflanzenschutz). Der befallsfördernde Effekt von nichtwendender Bodenbearbeitung und Vorfrucht Mais oder Getreide kommt wieder voll zum Ausdruck und spiegelt sich in signifikant höheren Mykotoxinkonzentrationen wider.

Ochratoxin A and other mycotoxins in Polish cereals and foods

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

In 1990-2000 selected Polish cereals, cereal products and some different commodities collected in several regions of Poland and from Warsaw market were investigated on presence of the most important mycotoxins, namely: ochratoxin A (OA) and aflatoxins.
In 1990-1992, 351 several cereal products, including bread, special formulas for babies and children were investigated on presence of ochratoxin A. This mycotoxin was detected only in one out of 204 samples of grain/milk and grain and rice groats for babies and children at the level 3,5 µg/kg. However 10 out of 110 bread samples (ca.10%), showed the presence of ochratoxin A at levels 3-16 µg/kg, mean 6,7 µg/kg. It should be highlighted that 70% contaminated bread were rye bread samples. Though the highest concentrations of OA was found in samples of barley and oats flakes; 140-160 µg/kg.
In 1996-1999 in frames of monitoring survey, 2379 samples of cereals for human consumption (wheat, rye) from different regions of Poland were investigated on ochratoxin A. In general, frequency of cereal contamination by ochratoxin A was higher in rye (50,3%) in comparison to wheat samples (38,6%). It should be stressed that only about 20% samples of wheat and rye showed the level of contamination by ochratoxin A >5 µg/kg.
Similar results were obtained in trials of 250 samples of cereals and 80 samples of cereal products collected from Warsaw marked in 2000/2001. The mean frequency of rye contamination - 35%, was higher in comparison to wheat samples – 24%. Moreover, in about 70% and 80% contaminated samples of rye and wheat, respectively; concentrations of OA were at the levels <5-5 µg/kg. Maximal content of OA, 667 µg/kg, was found in one rye sample. Ochratoxin A was detected in 14 out of 80 samples of cereal products (cereal flakes, bran, musli, etc.) at levels of 0,1-24 µg/kg. Among of cereal products bran showed the highest frequency of ochratoxin A contamination – about 80%. The highest concentration - 24 µg/kg, was found in one sample of muesli. The levels of ochratoxin A detected were much lower in all cereal products in comparison to cereals.

Investigations on aflatoxins content of several commodities available in Poland, such as cereal products, bread, cereal- milk formulas for babies and children, milk and powder milk conducted in 1990-92, showed incidentally contamination of one out of 351 samples. Only aflatoxin G_1 was detected at the level 0,6 µg/kg. There was no evidence of aflatoxin M_1 present in 270 samples of milk and special milk formula products for children. The last result could indicate, that for production of milk formula products for babies and children the best quality raw materials were used.
In further investigations of 1995-2000 of 105 different imported products, e.g. peanuts, aflatoxin B_1 was determined in 10% of peanut samples and in 30% of pistachio nuts at levels 0,5-3,0 µg/kg.In some samples (e.g. wine samples), aflatoxin G_1 in trace levels was determined.
It could be concluded then, that the frequency and the level of contamination of Polish cereal samples by ochratoxin A is similar as in the most European countries and ochratoxin A is a real contaminant of Polish cereals and cereal products. On the other hand aflatoxins in cereals and their products do not seem to be a problem in Poland, however the attention should be paid to some imported products like peanuts. But more significant importance may have the possibility of milk contamination by aflatoxin M_1.

Occurrence of the Toxigenic Fungi (Producers of Aflatoxins and Ochratoxin A) in Foodstuffs in the Czech Republic in Years 1999 - 2000

V. Ostry[1], J. Ruprich[1], J. Skarkova[1], I. Prochazkova[1], A. Kubatova[2]
[1] 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, Czech Republic
[2] CCF - Culture Collection of Fungi, Department of Botany, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

Toxigenic micromycetes are microorganisms capable of producing mycotoxins. They are important factors that may have a potentially adverse effect on human health. Mouldy foodstuffs containing toxigenic micromycetes and mycotoxins represent a potential hazard for health of the Czech population. Theoretically at least 114 species of micromycetes may occur in foodstuffs, and 65 of them can be toxigenic. Therefore the foodstuffs contaminated with the toxigenic micromycetes present a serious hazard of "hidden mycotoxins". An occurrence of the toxigenic micromycetes producing aflatoxins and ochratoxin A in foodstuffs were studied in order to obtain information about food contamination in the Czech Republic in 1999 and 2000. 25 commodities were collected at 12 collection places in the Czech Republic (300 food samples together). View of the sample collection is shown in the following

Table.

Sampling period	Commodities	No. of samples
1.	"Vysocina" salami, "Selsky" salami, semi-dry salami, "Polican" salami, raisins, pasta, rice	84
2.	Edam cheese	12
3.	sweet red pepper, caraway seeds, black pepper	36
4.	lentils, beans, peas, walnuts, peanuts, semi-granular flour, fine flour, granular flour, oat flakes, barley, fine semolina, instant semolina, fruit tea and black tea	168

Incidence data were obtained for toxigenic micromycetes in these commodities. Total counts of the colony - forming units per gram ($CFU.g^{-1}$) and mycological profile of the selected toxigenic micromycetes were assessed. Mycological profile is characterized with the contamination index (I_c) i.e. the ratio between the number of potentially toxigenic micromycetes ($CFU.g^{-1}$) and the total micromycetes count ($CFU.g^{-1}$).
The presence of potentially toxigenic micromycetes *Aspergillus flavus* (producers of aflatoxins) in the year 1999 was observed in 28% of the sampled foodstuffs (black pepper, caraway seeds, fruit tea, black tea, oat flakes, fine flour, rolled oat flakes and semolina) and in 25% of the sampled foodstuffs (black pepper, black tea, fine flour) in the year 2000. The aflatoxins were detected in black pepper and caraway seed samples in the year 1999 and in sweet red pepper in the year 2000. *Aspergillus tamarii* (aflatoxins producer) was found in 3 black pepper samples (25%) in the year 1999. *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus nomius* were not isolated. *Aspergillus* section *Nigri* (potential producer of ochratoxin A) was detected in 67% of the sampled foodstuffs (raisins, fruit tea, black tea, black pepper and sweet red pepper) in the year 1999 and in 69% of the sampled foodstuffs (raisins, fruit tea, black tea and black pepper) in the year 2000. The ochratoxin A was detected in 4 samples of raisins (33 %) in both years. Found concentrations within 1.9 - 52.5 $\mu g.kg^{-1}$ in the year 1999 and 2.4 - 9.3 $\mu g.kg^{-1}$ in the year 2000. *Penicillium verrucosum and Aspergillus ochraceus* were not isolated from the tested foodstuffs. Inspections of the Edam cheese samples showed that 8 samples (67%) were contaminated with *Penicillium roqueforti* in the year 1999. Very interesting was the detection of *Penicillium crustosum* (potential producer of neurotoxin penitrem A) in 4 walnut samples (33 %) in the year 1999 and in 3 walnut samples (25 %) in the year 2000.

Deoxynivalenol in Getreide, Malz, Treber und Bier

H. Taschan, G. Puchtinger, U. Waller
Staatl. Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Mittelhessen,
Marburger Str. 54; 35396 Giessen

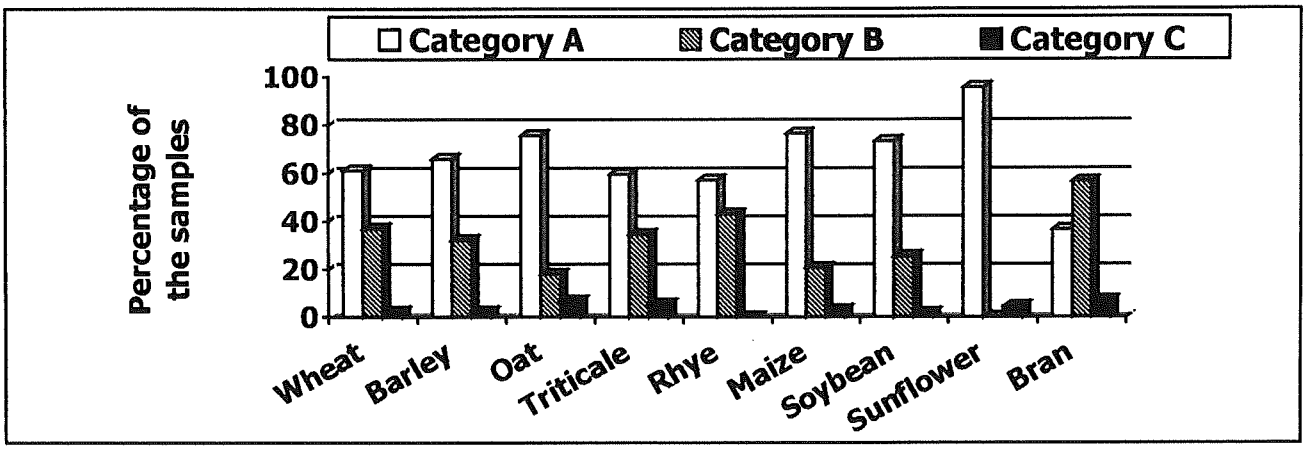
Deoxynivalenol (DON) wird von Pilzen der Gattung Fusarium (F. culmorum und graminaerum) gebildet und gehört zur Gruppe der Trichothecene. Verschiedene Untersuchungen zeigen, daß Getreide sowohl auf dem Feld als auch bei der Lagerung von Pilzsporen befallen werden kann. Entwickelt sich der Pilz auf dem Getreide, so können Trichothecene auf Getreide ausgeschieden werden.
Laut Veröffentlichungen gehören die Trichothecene zu den potentiell braurelevanten Fusarium - Toxinen. In Anbetracht der Tatsache, dass Wassergehalt und Temperaturen bei der Keimung optimal sind, bietet die Malzbereitung den Mikroorganismen hervorragende Entwicklungsmöglichkeiten. Daher ist das Auftreten von DON in Bier wahrscheinlicher als in anderen alkoholischen Getränken.
Eine potentielle Gefährdung des Menschen durch DON wird z. Z. intensiv diskutiert. Sowohl die allgemeine Toxizität als auch die Immunotoxizität von DON wurden kritisch eingestuft. Der wissenschaftliche Lebensmittelausschuss legte eine vorläufige duldbare tägliche Aufnahmemenge (tTDI) von 1 µg/kg KG fest.
Für die lebensmittelrechtliche Beurteilung der Proben gibt es in Deutschland weder Grenzwerte noch Richtwerte. Nur in einigen Ländern existieren über DON Toleranzgrenzen für Getreide und Getreideerzeugnisse, die der menschlichen Ernährung dienen.
Da sowohl die klimatischen Verhältnisse als auch die Produktionsverfahren sowie die Lagerung für die DON-Bildung eine große Rolle spielen, besteht dringender Bedarf an Untersuchungen.
Im Rahmen dieser Arbeit wurden bisher insgesamt 283 Proben auf ihren DON-Gehalt mittels ELISA-Methode (Ridascreen, r-Biopharm) untersucht. Dabei handelte es sich um Getreide, Braugetreide , Malz und Bier.
Darüber hinaus wurden Braugerste und das dazugehörige Malz aus einer Mälzerei untersucht. Im weiteren erfolgte eine Stufenkontrolle in einer Brauerei während des Bierprozesses.
Die Zusammenfassung der Ergebnisse (µg/kg bzw. µg/l) ist nachfolgend dargestellt.

Probenart	n	Min.	Max.	Med.
Getreide	53	38	1344	239
Malz	59	10	453	127
Bier	165	10	185	37
Treber	6	65	101	80

Occurrence of Mycotoxins in Hungarian Food Samples

Árpád Bata[1] , *Pál Rafai*[2]
[1] Dr Bata Ltd, H-2364 Ócsa, Hungary
[2] Dept. of Animal Hygiene, Szent István University, Budapest, Hungary

In the period between 1992 and 1998 760 maize, 367 wheat, 119 soybean, 222 barley, 85 bran 32 triticale 60 oat 14 rye and 22 sunflower samples were investigated for the presence and concentration of eight Mycotoxins (T-2 toxin, zearalenone, deoxinivalenol, nivalenol, diacetoxyscirpenol, HT-2 toxin, fusarenon X and ochratoxin A.
On the basis of the analytical results samples were categorized into three groups;
Group A; The samples belong into this group were free from the examined Mycotoxins or may be contaminated, but the Mycotoxin concentration were considered harmless. (examples (a), in the case of 0 contamination the commodity my be fed to all species even in pure form; (b), wheat with 0.14 mg/kg ZEA and 0.23 mg/kg DON may be incorporated into feed mixtures at usual proportion etc.)
Group B; In the samples contains one or more Mycotoxins at different concentrations, which is higher than the limit. Incorporation into feeds of animals, those are not sensitive to the mycotoxins, or use mycotoxin degradative material.
Group C; Due to the extreme contamination, these feedstuff cannot be diluted or add to not mycotoxin sensitive animals. Use mycotoxin degradative material or disband.



As from the figure can see from 0 % up to 7.1 % in the examined period the mycotoxin content of Hungarian feed samples were in the category C.

Nachweis und Vorkommen von Mykophenolsäure und Citrinin in Rotwein

K. Meyer[1], T. Müller[1], R. Dietrich[2], E.Märtlbauer[2], J.Bauer[1]
[1] Lehrstuhl für Tierhygiene, Technische Universität München; Freising-Weihenstephan
[2] Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München

Durch den Befall von Weintrauben mit Schimmelpilzen bereits an der Rebe kann es im Verlauf der Rotweinherstellung, besonders während der Maischegärung, zur Bildung sekundärer Stoffwechselprodukte kommen. Hierbei sind vor allem Metaboliten der Gattung *Penicillium* von Bedeutung, da deren Vertreter auf Trauben häufig anzutreffen sind (1). Da Ochratoxin A in Rotwein nicht selten nachweisbar ist (2, 3) und Citrinin häufig gleichzeitig gebildet wird, wurde dieses nephrotoxische Mykotoxin ausgewählt. Weiterhin wurde das Vorhandensein der von zahlreichen *Penicillium*-Arten gebildeten, immunsuppressiv wirksamen Mykophenolsäure (MPA) geprüft.
Als Untersuchungsmaterial dienten Rotweine (n=44) unterschiedlicher geographischer Herkunft und Jahrgänge. Die Bestimmung von MPA und Citrinin erfolgte vergleichend mittels ELISA und LC-MS. In 4 der 44 untersuchten Proben konnte im ELISA keine Mykophenolsäure nachgewiesen werden (<1,5 ng/ml), 35 Weine zeigten Gehalte zwischen 3 und 20 ng/ml. In fünf Proben wurden höhere Gehalte bis zu 130 ng/ml detektiert. Bei den hochkontaminierten Proben handelte es sich, in Übereinstimmung mit Untersuchungen auf Ochratoxin A (2), vor allem um Weine aus dem südlichen Mittelmeerraum (Spanien, Griechenland). Durch LC-MS-Analyse konnte MPA ab einer Konzentration von 1 ng/ml nachgewiesen werden. In den Ergebnissen fanden die enzymimmunologisch ermittelten Gehalte weitgehend ihre Bestätigung (vergl. Abbildung 1).

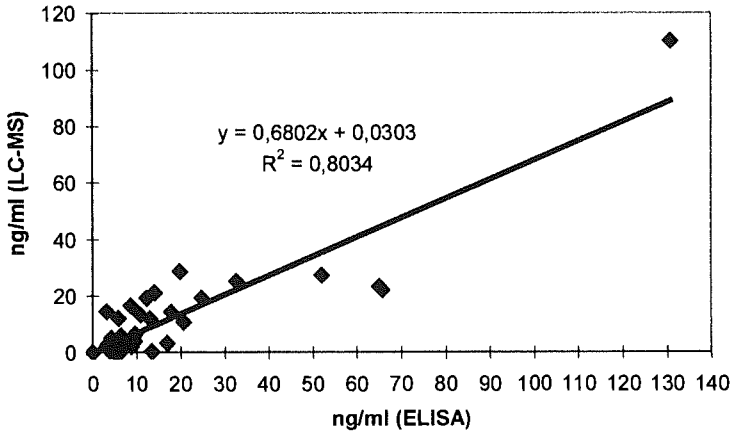


Abb. 1: Korrelation der in Rotwein ermittelten MPA-Gehalte (ELISA/LC-MS)

Der Citrinin-ELISA ergab Wiederfindungsraten zwischen 50 und 60% bei einer Nachweisgrenze von 0,2 ng/ml. Der Großteil der Weine (86%) zeigte Gehalte zwischen 0,2 und 1 ng/ml; eine Probe war mit 2 ng/ml höher belastet.
Obwohl die in vorliegender Untersuchung nachgewiesenen Toxinkonzentrationen wohl keine Gefährdung für den Verbraucher darstellen, wäre ein Verwendung als Parameter in der Produktionshygiene denkbar.

Literatur

[1] RADLER et al. 1972: Vitis 10, 314-317
[2] ZIMMERLI et al. 1996: Food Addit. Contam. 13, 655-668
[3] MAJERUS et al. 2000: Arch LM-Hygiene 51, 95-97.

Mycotoxins: The Situation in Kenya

George M. Siboe
Department of Botany, University of Nairobi, P.O. Box 30197, Nairobi. Kenya.
E-Mail: siboe@uonbi.ac.ke or siboe@yahoo.com

The paper highlights the scope of the mycotoxin problem from consumption of maize meal in Kenya. The analysis is based on data from routine examination of suspect samples by public health laboratories and scientific surveys from 1981 to 2000. These data have revealed that Aflatoxins B_1 & B_2, Ochratoxin A, and Zearalenone are common natural contaminants of maize meal, and feed constituted from maize. There are no actual data on human exposure, determined by measuring the presence of residues of mycotoxins in the tissues, body fluids, or excreta of suspect victims, but the high levels and frequency of mycotoxins in maize undoubtedly suggest high human exposure to these toxins.

Maize is a staple food consumed at 0.4 kg/person/day. Therefore, on average, a Kenyan is ex[posed to a total daily intake of not less than 7.4 µg/kg/day of these mycotoxins from direct consumption of maizemeal alone. At this rate, it is possible that maize contaminated with the lowest amount of toxins can cause significant effects since some mycotoxins are cumulative. Maize is also a major component in livestock and poultry feed, therefore regular indirect human exposure through the consumption of animal products that contain mycotoxin residues could be common. Many deaths have been recorded. Our current dilemma is wheather these mycotoxins are promoters of HIV/AIDS.

The data discussed in this paper may be just a tip of a large and widespread problem, probably at worst in rural areas where subsistence on substandard cereals, especially during the frequent food shortage periods is a common habit due to poverty and lack of awareness. Indeed, there is urgent need for a mycotoxin control program to reduce or eliminate exposure of humans to mycotoxins. At present there is inadequate data to develop such a program. Kenya alone does not have the resource capacity to tackle this magnitude of mycotoxin contamnation problem. Help!

POSTER

The System Approach to the Identification of Aflatoxigenic Fungi in Foodstuffs and Feedstuffs

V. Ostry[1], J. Ruprich[1], J. Skarkova[1], I. Prochazkova[1], A. Kubatova[2]

[1] National Institute of Public Health Prague, Centre for the Hygiene of Food Chains, National Reference Centre for Microscopic Fungi and Mycotoxins in Food Chains, Palackeho 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic

[2] CCF - Culture Collection of Fungi, Department of Botany, Faculty of Science, Charles University, Benatska 2, 128 01 Prague 2, Czech Republic

Aflatoxigenic *Aspergillus* species are important microorganisms capable of producing aflatoxins and further mycotoxins. *Aspergillus flavus, A. parasiticus, A. nomius* and *A. tamarii* are four morphologically similar species belonging to the Aspergillus section Flavi (Fig 1.). Occurrence and aflatoxigenic potential of fungal strains isolated from foods (cereals, pulses, oilseeds, dried fruit, spices), soil, air and water were determined. Especially in tropical countries food commodities are more prone to attack by the aflatoxigenic fungi. Reducing infection and contamination by the species of the Section Flavi that produce aflatoxins in the foodstuffs is an area of intensive interest .

Fig. 1

Section Flavi W.Gams et al.

(*A. flavus* group Raper & Fennell)

Accepted species

- *Aspergillus avenaceus* G. Sm.
- *Aspergillus caelatus B.W. Horn*
- *Aspergillus clavato-flavus* Raper & Fennell
- ***Aspergillus flavus*** Link
- *Aspergillus leporis* States & M. Chr.
- ***Aspergillus nomius*** Kurzman et al.
- *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn
- ***Aspergillus parasiticus*** Speare
- *Aspergillus sojae* Sakag. & K.Yamada ex Murak.
- *Aspergillus subolivaceus* Raper & Fennell
- ***Aspergillus tamarii*** Kita
- *Aspergillus zonatus* Kwon-Chung & Fennell

New described species

- ***Aspergillus argentinicus*** Vaamonde & Pitt
- ***Aspergillus zhaoqingensis*** Qi et Sun

If a strain of the micromycetes species is found to produce a specific mycotoxin, then all the strains of this species are considered to be *potentially toxigenic*, i.e. capable of producing a specific mycotoxin. Mycological analyses are based on the valid standards and recommendations of the International Commission for Food Mycology (ICFM). The identification of isolated aflatoxigenic fungi in foodstuffs and feedstuffs can be proved by using:

Classical mycological cultivation methods (morphological and cultural criteria)

Diagnostic nutrient media (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* agar (AFPA) medium */OXOID/* and Aspergillus Differentiation Medium Base (ADMB) */HIMEDIA/)*

Fig. 2

Fungi	AF $B_{1,2}$	AF $G_{1,2}$	AF M_1	CPA	KA	NOM
Aspergillus flavus	+	-	? (-)	+	+	-
Aspergillus flavus (new chemotype)	+	+	+	+	? (+)	?
Aspergillus parasiticus	+	+	? (-)	-	+	-
Aspergillus nomius	+	+	? (-)	-	+	+
Aspergillus argentinicus	+	+	? (-)	+	+	-
Aspergillus tamarii	+	-	? (-)	+	+	-
Aspergillus oryzae	-	-	? (-)	+	+	-
Aspergillus sojae	-	-	? (-)	-	+	-

CPA : Cyclopiazonic acid KA : Kojic acid

NOM : Nominine AF : Aflatoxins

Chemical identification is conducted by high performance thin-layer chromatography (HPTLC) determination of selected mycotoxins in YES (Yeast Extract Sucrose) medium after the incubation at 30^{0}C for 14 days (*Fig. 2*).

Molecular biological methods (PCR) have been used recently to assess the toxigenicity. They are independently confirmatory methods able to detect specific genes (f. e. omt-1, ver-1, apa-2) that encode enzymes participating in the biosynthesis of aflatoxins.

The system approach to the identification of aflatoxigenic fungi combines these four methods.

More than 30 strains of the aflatoxigenic micromycetes were tested with the methods ad 1), 2) and 3).

The Mycotoxin Research in Foodstuffs in the Czech Republic in the 90th Years

V. Ostry, J. Ruprich, J. Skarkova
National Institute of Public Health Prague, Centre for the Hygiene of Food Chains, National Reference Centre for Microscopic Fungi and Mycotoxins in Food Chains, Palackeho 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic

Mycotoxins are naturally occurring secondary metabolites produced by several toxigenic micromycetes on a variety of crops, especially cereal grains and further foodstuffs. The mycotoxins are associated with various diseases - mycotoxicoses in humans throughout the world (ergotism, alimentary toxic aleukia, aflatoxicosis, balkan nephropathy, yellow rice disease, oesophageal cancer etc.). The mycotoxins can enter the food chain by one of two major routes: a contamination resulting from the use of a foodstuffs component contaminated with mycotoxins and an contamination resulting from the growth of toxigenic fungi in the food.
Series of experimental research projects on the determination of mycotoxins (*aflatoxins, cyclopiazonic acid, ochratoxin A, patulin, DON, fumonisin B_1, T-2 toxin, zearalenone, sterigmatocystin, altemaria toxins*) in several foods were realized in the National Reference Centre for Microscopic Fungi and Mycotoxins in the 90th years.
The aim of our work was to estimate of dietary exposure to mycotoxins and risk assessment.
The method of a solid phase extraction (SPE), liquid - liquid extraction and immunoaffinity chromatography (f. e. R-Biopharm, VICAM) were used to elaborate for sample analyses of mycotoxins in our projects. The mycotoxins were detected most frequently by chromatographic methods (HPTLC, HPLC, GC) and immunochemical methods (ELISA). Average dietary exposure has been calculated by multiplying of concentration data for specific foods with consumption rate per 1 kg of b. w. per day.
The estimation of the dietary exposure dose of mycotoxins for the Czech population in the 90th years is presented in the following *Table.*

MYCOTOXIN	FOOD	DIETARY EXPOSURE FOR AVERAGE PERSON *(ng/kg body weight/day)*	% PTDI [1]
Aflatoxins	Cereal and cereal products, meat products, milk, milk products	< 3	? [2]
	Total diet	0.38 [3]	? [2]
Ochratoxin A	Cereal and cereal products	2,9	58
	Roasted coffee	0,14	3
Deoxynivalenol	Cereal and cereal products	730	73
	Beer	150	15
Fumonisin B1	Corn and corn products	1340	67
Zearalenone	Cereal and cereal products	4	2

[1] PTDI (Provisional tolerable daily intake)
[2] ALARA (*As low as reasonably achievable*)
[3] The dietary exposure of a man to aflatoxin B_1 was proved indirectly by determination of aflatoxin M_1 (biomarker of aflatoxin B_1) in human urine.

Rheologische und backtechnische Eigenschaften von *Fusarium*-inokulierten Weizenproben

Susanne Antes[1], Barbara Birzele[2], Alexander Prange[2], Johannes Krämer[2], Anja Meier[3], Heinz-Wilhelm Dehne[3] und Peter Köhler[1]*

[1] Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Lichtenbergstraße 4, D-85748 Garching

[2] Abt. Landwirtschaftliche und Lebensmittel-Mikrobiologie, Institut für Pflanzenkrankheiten, Rheinische Frierich-Wilhelms-Universität Bonn, Meckenheimer Allee 168, D-53115 Bonn

[*] E-mail: A.Prange@gmx.de

[3] Abt. Pflanzenkrankheiten, Institut für Pflanzenkrankheiten, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Nußallee 9, D-53115 Bonn

Die Kontamination von Getreide mit Mykotoxinen vermindert die Getreidequalität und stellt für den Verbraucher eine Gesundheitsgefahr dar. Hinsichtlich ihrer Entstehung wird zwischen Mykotoxinen unterschieden, die bereits vor der Ernte auf dem Feld gebildet werden (z.B. durch Feldpilze der Gattung *Fusarium*) und denen, die vorwiegend nach der Ernte aufgrund unsachgemäßer Lagerung im Erntegut wachsen (durch Lagerpilze der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*). Inwieweit der Befall des Getreides durch Feld- bzw. Lagerpilze und der Gehalt an Mykotoxinen, insbesondere der Gehalt an Deoxynivalenol (DON), sich auf die technologischen Eigenschaften von Weizenmehlen auswirken, wurde in den folgenden Untersuchungen ermittelt.

Zur Qualitätsbestimmung von inokuliertem sowie suboptimal gelagertem (Feuchte: 20%, Temperatur: 20°C) und jeweils hoch mit DON belastetem Weizen (DON-ELISA: 800-12.000 µg/kg TM) wurden verschiedene rheologische und chemische Methoden zur Untersuchung der Mehle angewandt. Die Inokulation erfolgte als Sprühinokulation zum Zeitpunkt der Blüte mit einem Cocktail aus *F. poae*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. cerealis* und *F. avenaceum* sowie zu verschiedenen Stadien (BBCH 49, 65, 85) mit *F. graminearum*. Die im Mehl enthaltenen Proteine, die maßgeblich am Aufbau der Kleberstruktur eines Brotes beteiligt sind, wurden aus den verschiedenen Mehlen extrahiert und über RP-HPLC analysiert und quantifiziert. Die ermittelten Mengen von Gluteninuntereinheiten und Gliadinen lassen bereits erste Schlüsse auf die Backqualität eines Mehles zu; so liefern Weizensorten mit hohen Gehalten an HMW-Untereinheiten größere Gebäckstücke [1]. Anhand von Zugversuchen wurden Kraft-Weg-Diagramme erhalten und so die Parameter maximaler Dehnwiderstand (DW) und Dehnbarkeit (DB) ermittelt. Das zu erwartende Gebäckvolumen ist um so größer, je höher der DW ist [2]. Um den Einfluß von Feld- und Lagerpilzen auf die Backfähigkeit zu untersuchen, wurden weiterhin Mikrobackversuche unter standardisierten Bedingungen durchgeführt [2]. Die Ergebnisse zeigen, daß vor allem der Befall mit Lagerpilzen (*Aspergillus* und *Penicillium*) eine starke Verminderung der Kleberproteine mit sich brachte, was sich rheologisch in einem stark verringertem DW und einem extrem verkleinerten Backvolumen zeigte. Interessanterweise hatten die inokulierten Proben trotz extrem hoher DON-Konzentrationen nur leicht verminderte Kleberproteingehalte. Auch die Zugversuche zeigten, daß diese Mehle zwar eine etwas verminderte Teigfestigkeit (DW) hatten, im Backversuch jedoch ein kaum vermindertes Backvolumen aufwiesen.

Literatur:

[1] Wieser, H., Seilmeier, W., Kieffer, R. (1994) In: Gluten Proteins 1993, pp 141-150

[2] Kieffer, R., Wieser, H., Henderson, M.H., Graveland, A. (1998) *J Cereal Sci* 27: 53-60.

PDR5-ähnliche ABC Transporter Proteine in Pflanzen

Brigitte Poppenberger, Rudolf Mitterbauer, Thomas Karl, Marc Lemmens und Gerhard Adam*
Zentrum für Angewandte Genetik, Universität für Bodenkultur Wien, Muthgasse 18, A-1190 Wien und
*Institut für Agrarbiotechnologie (IFA), Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln

Einleitung:
Die Resistenz gegen das Fusariumtoxin Deoxynivalenol (DON) dürfte eine wesentliche Komponente der *Fusarium*-Resistenz von Weizen sein, die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch unbekannt. Unsere Untersuchungen an Bäckerhefe haben ergeben, daß das ABC Transporter Protein *Pdr5* für die basale DON-Resistenz von Hefe maßgeblich ist. Es soll daher untersucht werden, ob *PDR5*-ähnliche Gene in Pflanzen existieren und relevant für die Mykotoxinresistenz sind.

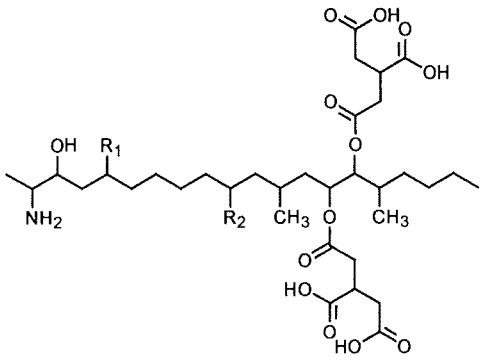
Ergebnisse:
ABC Transporter Proteine sind in Hefe verantwortlich für das Phänomen der „pleiotropic drug resistance – PDR". Einzelne Transporter wie z.B. *Pdr5p* haben eine (teilweise mit anderen *PDR*-Genprodukten überlappende) Substratspezifität für eine große Zahl strukturell verschiedener Verbindungen. Um zu testen ob „pleiotrope Drogenresistenz" auch in Weizen relevant ist, wurden Körner von Weizensorten mit unterschiedlicher Deoxynivalenol- (und *Fusarium*-Resistenz) mit weiteren strukturell nicht verwandten Inhibitoren getestet und eine sehr starke Korrelation zwischen Cycloheximid-Resistenz, Chloramphenicol-Resistenz und DON-Resistenz gefunden. Cycloheximid, Chloramphenicol und verschiedene Trichothecene sind in Hefe bekannte Substrate von *Pdr5p*. Das *PDR5*-Gen in Hefe ist ein Mitglied der Klasse der ABC Transporter vom Typ (NBF-TM6)x2: Bei diesem Typ sind - intern dupliziert - die ATP-Bindungsstellen (NBF: nucleotide binding fold) N-terminal angeordnet, gefolgt von 6 Transmembrandomänen. Die genaue Analyse der inzwischen verfügbaren Sequenz der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* ergab, daß mindestens 15 Gene dieses Strukturtypes vorliegen. Die Vorhersage der Gensequenzen ist jedoch nicht trivial, da die Gene sehr groß sind und bis zu 23 Introns enthalten. Die Analyse von cDNAs ergab, daß beispielsweise 4 unmittelbar hintereinanderliegende Gene auf Chromosom IV falsch annotiert wurden.
Um die Substratspezifität dieser Transporter zu charakterisieren wurde versucht, vollständige cDNAs einzelner Gene zu klonieren und diese in Hefemutanten zu exprimieren, die Deletionen endogener ABC Transporter aufweisen. Dabei stellte sich heraus, daß einige cDNA-Fragmente in *E. coli* toxisch sind. Es wurden daher durch homologe Rekombination in Hefe (zwischen geeigneten, neukonstruierten „gap repair" Vektoren und den synthetisierten cDNAs) die entsprechenden Genkonstrukte hergestellt. Um Probleme mit etwaiger Toxizität in Hefe zu vermeiden, wurden die Konstrukte unter einen induzierbaren *GAL1* Promotor gesetzt. Im Fall des Genes *AtPDR42* führte die Induktion auf Galaktosemedium zu einem völligen Wachstumsdefekt. Wegen dieser Probleme bei der heterologen Expression wird gegenwärtig die Überexpression der *Arabidopsis* cDNAs in Pflanzen versucht. Geeignete Vektoren, die eine Corticosteroid-induzierbare Expression in Pflanzen erlauben, befinden sich in Konstruktion.

Zusammenfassung:
Die Existenz einer großen Genfamilie von *PDR5*-ähnlichen Gene in *Arabidopsis* und die sich mehrenden Hinweise aus EST-Sequenzierprojekten (Reis, Gerste, Weizen) legen nahe, daß diese Gruppe von ABC Transportern auch in Pflanzen eine wesentliche Rolle in der Toxinresistenz und Pathogenabwehr spielen dürften. Unsere Versuche, die Substratspezifität durch heterologe Expression in Hefe zu studieren, waren jedoch bisher nicht erfolgreich.

Bestimmung der Fumonisine B_1, B_2 sowie ihrer hydrolisierten Metaboliten mittels HPLC - ESI - MS

Andreas Brockmeyer und Gerhard Thielert
Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Sigmaringen, Hedingerstr. 2/1, 72488 Sigmaringen

Fumonisine sind eine Gruppe von Mykotoxinen, die vor allem in Mais vorkommen und von einigen *Fusarien spp.*, hauptsächlich *Fusarium moniliforme*, gebildet werden. Bisher sind 7 verschiedene Fumonisine beschrieben, von denen natürlicherweise jedoch nur FB_1, FB_2 und FB_3 in bedeutenden Mengen vorkommen [1]. Die Aufnahme von Fumonisinen durch die Nahrung wird mit einem erhöhten Auftreten von Krebserkrankungen in Zusammenhang gebracht [2]. Durch Alkalibehandlung werden die Fumonisine unter Abspaltung der beiden Propantricarbonsäurereste zu sogenannten hydrolisierten Fumonisinen HFB_1, HFB_2 und HFB_3 abgebaut [1]. Hierbei wird die Toxizität der einzelnen Fumonisine sehr wahrscheinlich noch gesteigert [3].



FB_1: R_1=OH, R_2=OH; FB_2: R_1=OH, R_2=H; FB_3: R_1=H, R_2=OH

Bei der Herstellung von Tortillamehl, welches durch Kochen von Mais oder Maismehl mit Calciumhydroxid gewonnen wird, tritt diese Verseifungsreaktion in Erscheinung.
Tortillamehl bildet die Grundlage vieler Knabberartikel, wie Tortillachips, Tacos, Nachos und Extruderprodukten.

Um eine mögliche Belastung der obengenannten Knabberartikel mit Fumonisinen und hydrolisierten Fumonisinen nachweisen zu können, wurde eine geeignete Analytik, basierend auf HPLC-ESI-MS, entwickelt.

Methodenentwicklung und erste Ergebnisse der Untersuchungen von Tortillachips werden vorgestellt.

[1] Sydenham E.W., Stockenström S., Thiel P.G., Shephard G.S., Koch K.R., Marasas W.F.O., J. Agric. Food Chem., 1995, 43, 1198-1201
[2] Sydenham E.W., Thiel P.G., Marasas W.F.O., Shephard G.S., Van Schalkwyk D.J., Koch K.R., J. Agric. Food Chem., 1990, 38, 1900-1903
[3] Hendrich S., Miller K.A., Wilson T.M., Murphy P.M., J. Agric. Food Chem., 1993, 41, 1649-1654

Ochratoxins and zearalenone in Romanian slaughter pigs

V. G. Curtui[1], M. Gareis[2], E. Usleber[1] and E. Märtlbauer[3]
[1] Dairy Science, Institute of Veterinary Food Science, Justus-Liebig-University, Ludwigstrasse 21, 35390 Giessen, Germany
[2] Institute for Microbiology and Toxicology, Federal Centre for Meat Research, Kulmbach, E.-C.-Baumannstr. 20, 95326, Germany
[3] Institute for Hygiene and Technology of Food of Animal Origin, Faculty of Veterinary Medicine, University of Munich, Veterinärstr. 13, 80539 Munich, Germany

Slaughtered pigs (n = 52) were sampled each for blood serum, kidney, liver and muscle. All samples were analysed for ochratoxin A (OTA) and B (OTB) by HPLC methods. Zearalenone (ZEA) in serum was analysed by enzyme immunoassay. A total of 98% serum samples were found OTA positive in the range of 0.05 – 13.4 ng/ml and 85% contained under 5 ng OTA/ml. The incidence of OTA in kidney and liver was very similar (79%, 75%) with a mean level of 0.54 ng/g and 0.16 ng/g, respectively. The lowest incidence (17%) and the lowest mean level contamination (0.15 ng/g) were in muscle samples. The mean distribution in tissues followed the pattern serum>kidney>liver>muscle (100%: 26%: 8.5%: 2.57%). No sample was found positive for OTB. A very similar OTA contamination (mean = 4.19 ng/ml, coefficient of variation = 34.4%) was observed in the serum samples (n = 10) collected from the same farm. Zearalenone was detected only in 17.3% of the serum samples with a maximum concentration of 0.96 ng/ml. This survey shows the presence of OTA and ZEA in Romanian slaughter pigs at levels comparable to those reported in other countries.

Citrinin in Fruchtsäften

R. Dietrich, A. Schmid, E. Märtlbauer
Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Veterinärstr. 13, 80539 München

Bekanntermaßen wird Citrinin von verschiedenen Arten der Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus* gebildet, u.a. auch von *P. expansum*. Dieser Pilz gilt als Erreger der Braunfäule bei Äpfeln und dadurch als Ursache für die Patulin-Kontamination von Apfelsäften. In älteren Arbeiten konnte zwar Citrinin in verschimmelten Äpfeln, aber nicht im Apfelsaft nachgewiesen werden. Als Ursache wurde eine Instabilität des Toxins bzw. Bindung an Probeninhaltsstoffe vermutet. Da am Lehrstuhl basierend auf einem hochaffinen, monoklonalen Antikörper verschiedenene immunchemische Verfahren entwickelt wurden, die den sensitiven Nachweis von Citrinin ermöglichen, wurde überprüft, ob trotzdem Spuren dieses Mykotoxins in Apfelsäften und anderen Säften mittels Enzymimmuntest (EIA) nachweisbar sind.

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden verschiedene Probenaufarbeitungsverfahren überprüft, da im Gegensatz zu Erfahrungen beim Nachweis von Mykophenolsäure der direkte Einsatz (ohne Probenaufarbeitung; verdünnt in phosphatgepufferter Kochsalzlösung) des Apfelsaftes - insbesondere bei naturtrüben Säften - in den EIA zu massiven unspezifischen Reaktionen führte. Durch Flüssig-Flüssig Extraktion mit Dichlormethan konnten zwar diese Probenmatrixeffekte verhindert werden, aber die Wiederfindungsraten für dotierte Proben (0,2 - 4 ng Citrinin/ml) lagen in einem sehr niedrigen Bereich (20 - 30%). Überaschenderweise waren auch bei der direkten Aufarbeitung (ohne Extraktion) dotierter Apfelsäfte über Immunaffinitätssäulen ähnlich hohe Verluste festzustellen. Die Analyse anderer Frucht- (Kirsch, Johannisbeer) und Gemüsesäfte (Tomate) führte zu identischen Ergebnissen. Aufgrund dieser offensichtlichen Instabilität des Toxins in Säften war es nicht überraschend, dass bei der Untersuchung von insgesamt 55 Handelsproben nur Spuren (max. 0,2 ng/ml) von Citrinin nachweisbar waren.

Deoxynivalenol beim Schwein – wird „nur" der Appetit beeinflußt?

Tanja Dillenburger[1], U. Lauber[1], F. Klobasa[2], W. Drochner[1]
[1] Inst. f. Tierernährung, Universität Hohenheim, Emil-Wolff-Str. 10, 70599 Stuttgart
[2] Institut für Tierzucht und Tierverhalten, Mariensee, 31535 Neustadt

In einem Fütterungsversuch an Schweinen sollte die Konzentration reinen Deoxynivalenols (DON) ermittelt werden, ab der erste Leistungseinbußen (Futteraufnahme, Gewichts-entwicklung) meßbar werden. Hierzu wurden Läuferschweine, in drei aufeinanderfolgenden Durchgängen, mit reinem DON bzw. mit DON aus natürlich kontam. Material belastet.
Neben der Erfassung der täglich aufgenommenen Futtermenge und des Körpergewichtes wurden zelluläre Bestandteile, Enzyme, Substrate, Proteine und Hormone im Blut, aus-gewählte Enzymaktivitäten der Dünndarmmukosa sowie die Fähigkeit der Darm-mikroorganismen zur DON-Deepoxidierung untersucht.

Während bei Zusatz des reinen Toxins zu einer getreidefreien Ration (bis 6 mg DON/kg Futter) keine Unterschiede in der Leistung zu erkennen waren, reduzierte sich die tägliche Zunahme bei Tieren, die DON aus natürlich kontaminiertem Material erhielten um 22% (4 mg DON/kg Futter) bzw. 32,5% (6 mg DON/kg Futter) im Vergleich zu den Kontrolltieren.
Demgegenüber lagen die gemessenen Blutparameter aller Tiere, unabhängig von der Herkunft des Toxins und Belastung, im Referenzbereich. Unterschiede zu den Kontrolltieren traten nicht auf.
In der Literatur wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen Trichothecenen und dem Anstieg von Immunglobulinen (IgA) im Blut aufgezeigt. Dies könnte in der Folge Nephropathien verursachen, wie sie auch beim Menschen häufig gefunden werden.
In der vorliegenden Untersuchung wurde mit zunehmendem Alter ein Anstieg der Immunglobulingehalte (IgA) im Serum festgestellt. Dieser Anstieg erwies sich jedoch unabhängig von der Behandlung, er wurde demzufolge nicht durch DON verursacht.
Trotz des direkten Kontaktes der Darmmukosa mit DON waren die Aktivitäten ausgewählter Enzyme nicht beeinflußt.

Einflüsse auf die Leistung traten nur bei Verabreichung natürlich kontaminierten Materials auf. Demgegenüber war mit reinem DON bis 6 mg/kg Futter (0,23 mg/kg KM) kein dosis-abhängiger Effekt erzielbar.
Die Einbrüche in Futteraufnahme und Zuwachs (bei Belastung mit DON natürlichen Ursprungs) hatten jedoch keinerlei Einfluß auf die geprüften hämatologischen und immuno-logischen Parameter.
Pathologisch-anatomische Veränderungen in den Geweben konnten selbst bei einer Belastung mit 6 mg DON/kg Futter nicht gefunden werden. Ein Hinweis auf eine direkt zellschädigende Wirkung von DON, im Sinne einer Proteinbiosynthese-Hemmung (z. B. Schädigung der Darmzellen), lag somit nicht vor. Die Leistungsminderung kann daher nicht auf eine unzureichende Nährstoffaufnahme zurückgeführt werden.

Möglicherweise werden Futteraufnahme und damit Wachstum "sekundär" durch Wirkung auf das zentral gesteuerte Freßverhalten beeinflußt. So wäre denkbar, daß es durch ver-minderten Einbau von Tryptophan in Proteine zu einer Erhöhung von freiem Tryptophan resp. Serotonin im Gehirn kommt, was zu Inappetenz und damit zu verminderter Futteraufnahme führt.
Für eine abschließende Beurteilung des Einflußes von Fusarientoxinen in Getreide (insbes. in praxisüblichen Konzentrationen) auf die Tiergesundheit scheint es unerläßlich, die komplexen Wirkmechanismen im Tier Schritt für Schritt weiter aufzuklären.

Klinische und histologische Auswirkungen von Zearalenon bei Jungsauen

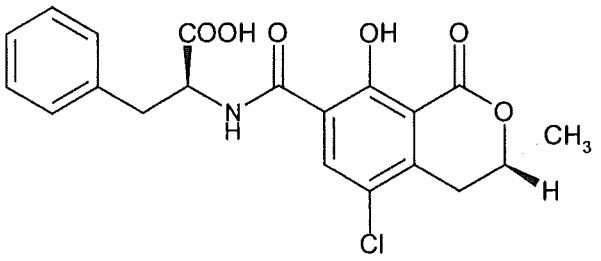
H. Eisschiel[1,2], C. Rosenkranz[2], W. Hochsteiner[1], H. Kahlbacher[1], M. Schuh[1]
[1] II.Medizinische Universitätsklinik für Klauentiere, Veterinärmedizinische Universität Wien
[2] Institut für Histologie und Embryologie, Veterinärmedizinische Universität Wien

Ziel der durchgeführten Untersuchung war es, eine Aussage über die bisher kaum untersuchten Auswirkungen von zearalenonkontaminiertem (ZON-kontaminiertem) Futtermitteln an nichtzyklischen Jungsauen treffen zu können. Der durchgeführte Fütterungsversuch umfasste 14 Jungsauen (7 Tiere dienten als Versuchsgruppe und 7 Tiere als Kontrollgruppe). Es sollte der Einfluß von natürlich kontaminiertem, zearalenonhältigem Futter (Haferschrot) auf klinische, patho-anatomische als auch histologische Parameter untersucht werden.
Das mittlere Einstellgewicht der Versuchsgruppe betrug 62,9 kg LM, das der Kontrollgruppe 54,3 kg LM. Nach Verbringung und getrennter Aufstallung der Versuchs- und Kontrolltiere folgte eine 6-tägige Eingewöhnungsphase. Sieben Tiere der Kontrollgruppe erhielten im Gegensatz zur Versuchsgruppe zearalenonfreien Haferschrot. Während des anschließenden 18-tägigen Fütterungsversuches betrug die durchschnittliche tägliche Futteraufnahme des natürlich ZON-kontaminierten Hafers 0,8 kg/Jungsau (die restliche Ration bestand aus ZON-freiem Sauenfutter). Damit ergibt sich eine durchschnittliche Aufnahme von 0,83 mg ZON/Tier/Tag. Die chemische Analyse wurde im Mykotoxinlabor der II. Medizinischen Universitätsklinik für Klauentiere mittels ELISA-Methode durchgeführt (externe Kontrolle durch die Firma Biomin, Herzogenburg).
Bei der klinischen Untersuchung konnten nach 12-tägiger Verfütterung des ZON-kontaminiertem Futtermittels Rötung und Schwellung der Vulva und des Gesäuges bei allen Tieren der Versuchsgruppe festgestellt werden, wogegen die Tiere der Kontrollgruppe keine auffälligen klinischen Befunde aufwiesen.
Die nach der Tötung vorgenommene patho-anatomische Beurteilung des Uterus zeigte innerhalb der Kontrollgruppe ein einheitliches Bild, bei den Tieren der Versuchsgruppe hingegen Veränderungen, die auf einen Hyperöstrogenismus hinwiesen.
Für histologische bzw. lektinhistochemische Untersuchungen wurden Organproben von Ovarien, Tubae uterina, Cornua uteri, Corpus uteri, Cervix, Vagina, Vulva und Mamma entnommen. Die Fixierung erfolgte mittels neutral gepuffertem Formol nach Lillie, die anschließende Einbettung in Paraffin. Gefärbt wurden 5 μm dicke Schnitte von sämtlichen Organproben mit Hämalaun/Eosin. Für die lektinhistochemische Untersuchung wurden 3 μm dicke Schnitte von Uterushorn und Uteruskörper mit folgenden 9 biotinylierten Lektinen (Con A, DBA, MPA, PNA, PSA, RCA-I, SBA, UEA, WGA) inkubiert und mittels Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) dargestellt.
Mikroskopisch zeigten sich an den Ovarien der Versuchsgruppe vermehrt atretische Follikel, am Eileiter eine vermehrte Desquamation der Epithelzellen. Weiters konnte vorallem im Bereich des Uteruskörpers eine vermehrte subepitheliale Zellinfiltration und Ödemisierung festgestellt werden. Deutliche Unterschiede konnten anhand der Lektinbindungsmuster der Epithel- (MPA, RCA-I, SBA und WGA) und der Drüsenzellen (RCA-I, SBA und WGA), der Uterushörner festgestellt werden. Ebenso verhielt es sich mit den Lektinbindungsmustern der Epithel- (MPA, PNA, RCA-I, SBA und WGA) und Drüsenzellen (DBA und SBA) des Uteruskörpers. Das Bindungsverhalten von RCA-I am Epithel des Uteruskörpers deutete auf eine verdickte Glycokalix hin.
Mittels der vorliegenden Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass eine tägliche Aufnahme von 0,83 mg ZON über das Futter, innerhalb von 18 Tagen bei nichtzyklischen Jungsauen, sowohl klinische als auch histologische Veränderungen an den Geschlechtsorganen hervorruft.

Monitoring of Residues of Ochratoxin A in Blood and Kidney of Broiler Chicken Using HPLC-FLD

[1]E. Fuchs, [2]E.M. Binder, [2]G. Schatzmayr, [2]D. Heidler and [1]R. Krska
[1] IFA-Tulln, Department of Environmental Biotechnology and Center for Analytical Chemistry,
Tel.:++43 2272 66280 409; Fax.: ++43 2272 66280 403; email: efuchs@ifa-tulln.ac.at
[2] Biomin GTI, Industriestr. 21, A-3130 Herzogenburg

The mycotoxin Ochratoxin A (OTA) is produced in moderate climates by *Penicillium* strains *(P. verrucosum)* on grains and in warmer parts of the world by several species of *Aspergillus (A. ochraceus, A.sulphureus...)* on a much wider range of food commodities (cereals, wine, grape juice and coffee). It is a relatively stable molecule that can pass unchanged through the food chain. Carry over can occur from contaminated feed into meat or meat products .



Ochratoxin A has been shown to be a potent nephrotoxin in almost all animal species. Its structure as a derivative of L-phenylalanine makes it an inhibitor of phenylalanine-tRNA synthetase. Ochratoxin A is, like aflatoxin and the trichothecenes, immunsupressive. It has also been reported that OTA is a carcinogen and may be genotoxic.

Fig.1: Ochratoxin A

Detoxification of ochratoxin A can be achieved by chemical or enzymatic hydrolysation, the products of such reactions are ochratoxin A and phenylalanine [4,5]. Ochratoxin A like ochratoxin A, is a fluorescing molecule, therefore sensitive analysis is possible at very low concentration levels.
To test detoxifying agents or adsorbents as feed additive, feeding trials with different species of animals have to be done. Ochratoxin A is known to accumulate in the muscle and in the kidneys of animal fed contaminated feed. Collecting blood samples is a harmless way to screen the contamination of animals. In the case of feeding trials using contaminated feed in order to check feed additives for their ability to detoxify the mycotoxin ochratoxin A and their effect on animals, it is necessary to look for residues of the toxin in blood and tissues of the animals.
Therefore methods have been established that make it possible to look for residues of ochratoxin A and its main metabolite ochratoxin A in blood and tissues at very low concentration levels. Plasma is extracted by the use of small amounts of chloroform, the extract is cleaned with water and afterwards evaporated to dryness[1]. The residue is re-dissolved and analysed by HPLC-FLD, using an HP ODS Hypersil column with a gradient of water, acetonitrile and acetic acid.
Tissues are homogenized together with distilled water and extracted with chloroform. The extract is cleaned by the use of liquid liquid extraction. After a concentration step the samples are analysed by HPLC-FLD using the same method as for the plasma samples.

[1] J.Bauer, M. Gareis, B. Gedek; Berl.Münch. Tierärztl. Wschr. 97, 279-283 (1984).
[2] K.Lusky, D. Tesch, R. Göbel, K.-D. Doberschütz; Fleischwirtsch. 74(5), 558-560 (1994).
[3] Breitholtz-Emanuelsson, M. Olsen, A. Oskarsson, I. Palminger, K.Hult; Journal of AOAC International 76(4), 842-846 (1993).
[4] Pitout M. J; Biochemical Pharmacology 18, 485-491 (1969).
[5] H. Xia, R.R. Marquardt, A.A. Frohlich, G.D. Phillips, T.G. Vitti ; J.Anim.Sci. 69, 3715-3723 (1991).

Production of Ochratoxin A for Detoxification Experiments

Schatzmayr, G.[1], Fuchs, E.[3], Heidler, D.[1], Thum, V.[2], Thamhesl, M.[2], Krska, R.[3], Loibner, A.P.[2], Braun, R.[2] and Binder, E.M.[1]
[1] Biomin GTI GmbH (a), Industriestraße 21, 3130 Herzogenburg, Austria;
[2] Institute for Agrobiotechnology, Department of Environmental Biotechnology (b), Center for Analytical
[3] Chemistry, Konrad Lorenz Str.20, A-3430 Tulln, Austria.

Ochratoxins are structurally related mycotoxins produced by many strains of *Aspergillus* and *Penicillium.* In animals ochratoxin A (OTA), the main representative of these toxins, causes tubular necrosis of the kidney and degeneration of the liver. For degradation experiments with various microorganisms large amounts of ochratoxin A are required. The addition of OTA in standard quality for this purpose is relatively costly. Since the used culture media are very heterogeneous matrices the addition of coarsely cleaned up OTA is sufficient. Therefore production experiments with *Aspergillus ochraceus* [ATCC 22947], *Petromyces albertensis* [ATCC 58745] and *Aspergillus sulphureus* [ATCC 16893] were conducted by applying liquid and solid culture-media. The aim was the production of OTA in a matrix that make a simple clean up procedure possible. In the first experiment 140mg/l OTA were obtained by using a medium consisting of 15% sucrose and 2% yeast extract inoculated with spores of *P. albertensis. A. sulphureus* produced 41,5mg/l whereas the medium inoculated with *A. ochraceus* spores only contained 193µg/l OTA. These samples were incubated for nineteen days at a temperature of 30°C. The inoculation of a defined liquid medium (Czapek-medium) with these fungi led to OTA yields of average 10mg/l. Preliminary solid state fermentation trials (30°C, 21days, 30-40% moisture) with wheat and rice as substrates yielded in 350-390mg/l (*A. ochraceus*) and 150-190mg/l of OTA (*P. albertensis*), respectively. By changing the surface-volume ratio of the production batches the OTA concentration could be increased up to 1027mg/l after inoculation of wheat by spores of *A. ochraceus.* Clean up experiments using chloroform revealed that it is much easier to recover this mycotoxin from liquid broth than from wheat or rice. Additionally, extracts obtained from broth were much "cleaner" than that of solid state fermentations. After evaporation of the solvent ochratoxin A was solved in Tris-puffer - this solution served as a stock for degradation experiments. Another test was performed to determine the influence of sucrose- and yeast extract- concentration as well as the temperature on the OTA yield of *P. albertensis.* For this purpose a 2^3-factorial experimental design was employed. It turned out that high sucrose- and yeast extract- contents in the medium led to a high toxin production rate. Comparatively the increase of temperature from 25°C to 30°C resulted in a lower improvement of ochratoxin A- concentration.

[1] Davis, N.D., Searcy J.W. and Diener U.L. (1969). Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in a semisynthetic medium. Applied Microbiology, 17:742-744.
[2] Nefisa, M.A., El-Shayeb, N.M.A.; Mabrouk, S.S. and Abd-El-Fattah, A.M.M. (1992). Production of ochratoxins by some Egyptian *Aspergillus* strains. Zentralbl.-Mikrobiol., 47(1-2): 86-91.
[3] Varga, J., Kevei, E., Rinyu, E., Teren, J. Kozakiewicz, Z. (1996). Ochratoxin Production by *Aspergillus* Species Applied And Environmental Microbiology, 62(12): 4461-4464.

Vergleichende Untersuchung zu Deoxynivalenol- und Zearalenon -Gehalten in Körnern von gentechnisch verändertem (*Bt*-Mais) und herkömmlichem Mais.

Hana Valenta[1], S. Dänicke[1], G. Flachowsky[1] und T. Böhme[2]
[1] Institut für Tierernährung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig,
[2] Syngenta Seeds GmbH, D-32076 Bad Salzuflen

Der Befall von Mais mit Maiszünsler (ECB, *Ostrinia nubilalis*) führt nicht nur zu Ernteverlusten, sondern fördert auch den Fusariumbefall der Pflanzen und folglich die Kontamination mit Fusariumtoxinen. Der gentechnisch veränderte *Bt*-Mais wird wegen der Produktion eines gegen den Zünsler wirksamen Proteins weit weniger durch den Maiszünsler geschädigt. Im Rahmen der vorliegenden Studie sollte untersucht werden, ob dies auch zu einer geringeren Kontamination von *Bt*-Mais-Sorten mit den Fusariumtoxinen Deoxynivalenol und Zearalenon im Vergleich zu entsprechenden konventionellen Maissorten führt.

Dafür wurden Proben aus Körnermais-Anbauversuchen im Jahr 1999 auf 9 Standorten im süddeutschen Raum mit 7 Sorten-Paaren von *Bt*-Mais (*Bt*-176 bzw. Mon 810) und isogenem Mais gezogen. An zwei Standorten wurde im Rahmen eines Versuchs der Universität Hohenheim eine Infestierung mit ECB-Larven durchgeführt. Es wurden ca. 40 Maiskolben zufällig verteilt pro Parzelle gezogen und nach dem Entfernen der Lieschen in vom ECB befallene und nicht befallene Kolben aufgeteilt. Die Körner der befallenen und nicht befallenen Kolben wurden separat auf Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) analysiert. DON wurde orientierend mit ELISA analysiert, die positiven Proben wurden mit HPLC bestimmt (Nachweisgrenze 100 µg/kg). ZON wurde ebenfalls mit HPLC bestimmt (Nachweisgrenze 1 µg/kg), die positiven Proben wurden qualitativ mit ELISA abgesichert.

Die Ergebnisse sind in Tab. 1 dargestellt. Da die Werte nicht normal verteilt waren, wurde ein nichtparametrischer statistischer Test (Mann-Whitney U-Test) angewendet. Der prozentuale Anteil der ECB-befallenen Kolben war mit 5% bei den *Bt*-Mais-Sorten signifikant niedriger als bei den konventionellen Sorten mit 31%. Die DON-Konzentration der Körner von befallenen Kolben von isogenen Sorten war signifikant höher als die DON-Konzentration aller anderen Gruppen. Bei der ZON-Konzentration zeigte sich der gleiche Trend, die Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant. Es müsste in weiteren Untersuchungen über mehrere Erntejahre geklärt werden, ob sich der bei dieser Studie festgestellte Trend zu einer geringeren Belastung von *Bt*-Mais mit DON und ZON im Vergleich zu konventionellem Mais bestätigt.

Tabelle 1: DON- und ZON-Konzentrationen in Körnern von ECB-befallenen und nicht befallenen Maiskolben von *Bt*- und isogenen Maissorten

Mais		N	DON (µg/kg)			ZON (µg/kg)		
			Bereich	Mittelwert[1]	Median[2]	Bereich	Mittelwert[1]	Median
isogen	befallen	15	nd-4120	873	482[b]	nd-1924	256	80[c]
isogen	nicht befallen	15	nd-330	77	0[a]	nd-104	19	4[ab]
Bt	befallen	10	nd-1360	152	0[a]	nd-186	33	12[bc]
Bt	nicht befallen	15	nd-230	51	0[a]	nd-19	3	1[a]

nd – unter der Nachweisgrenze (DON: 100 µg/kg, ZON: 1 µg/kg), verschiedene Buchstaben in einer Spalte bedeuten signifikant unterschiedliche Werte
[1] Mittelwert aller Proben; Werte unter der Nachweisgrenze wurden als 0 berücksichtigt
[2] Werte unter der Nachweisgrenze wurden als 0 berücksichtigt

Development of enzyme-immunoassays based on egg yolk antibodies for the detection of mycotoxins

H. Pichler[1], M. Freudenschuss[2], S. Palme[2], E.M. Binder[1], R. Krska[2]
[1] Biomin GTI GmbH, Industriestr. 21, A-3130 Herzogenburg
Tel.: +43-2782-803, Fax: +43-2782-803-30, email: harald.pichler@biomingti.com
[2] IFA-Tulln, Center for Analytical Chemistry, Konrad Lorenz Str. 20, A-3430 Tulln

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) proved to be a fast and simple method for the detection of mycotoxins and other undesired contaminants in food and feed. Therefore, polyclonal antibodies are often produced by blood collection and serum separation from immunized mammals. Besides also monoclonal antibodies are produced and applied for mycotoxin detection. A simple alternative to conventional antiserum production is represented by the isolation of antibodies from egg yolks of immunized chickens [1]. Chickens have a great production capacity for polyclonal antibodies when the egg yolk is used as antibody source.

The present study is focused on the optimization and exploitation of the egg yolk antibody technique in order to develop competitive ELISAs for the detection of mycotoxins in cereals. Due to its importance as one of the most relevant *Fusarium* mycotoxins, the trichothecene deoxynivalenol (DON) was selected as representative. For this reason several immunogens based on different carrier proteins like bovine serum albumin (BSA), keyhole limpet hemocyanine (KLH) and bovine thyroglobulin (BTG) were synthezised [2]. Three chickens in parallel were immunized at least three times with different immunogen concentrations. The immunoglobulines (IgY) are isolated from egg yolks by a modified method according to Polson [3] and characterized for sensitivity and specificity in order to determine the most efficient immunization strategy.

Additional efforts for the improvement of the extracted antibodies as well as for the ELISA procedure have been performed in this study. Both antibody purification by chromatography (FPLC) and separation of undesired antibodies against the carrier protein lead to an assay improvement. Furthermore, unspecific background signal could be reduced by optimization of certain assay parameters.

The widespread opinion about worse sensitivity and specificity of egg yolk antibodies should be disproved by our studies. It can be demonstrated that egg yolk antibodies are not only suitable for certain medical research topics, but also for the development of enzyme-immunoassays for mycotoxin detection. The high productivity of chickens compared with mammals, combined with the simplier and more animal friendly task of collecting eggs instead of blood sampling should result in an increasing interest for the use of chickens in antibody production facilities.

[1] R. Schade, C. Staak, C. Hendriksen, M. Eberhard, H. Hugl, G. Koch, A. Larsson, W. Pollmann, M. van Regenmortel, E. Rijke, H. Spilemann, H. Steinbusch, D. Straughan, ATLA 24 (1996) 925-934.
[2] S. Bauminger, M. Wilchek, Methods Enzymol. 70 (1980) 151-159.
[3] A. Polson, M.B. von Wechmar, M.H.V. van Regenmortel, Immunol. Comm. 9(5) (1980) 475-493.

Fusarientoxinergebnisse in österreichischen Futtermitteln des Jahres 2000

H. Kahlbacher, W. Hochsteiner, M. Schuh
II. Medizinische Universitätsklinik für Klauentiere der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Die Hauptquelle für die Belastung der landwirtschaftlichen Nutztiere mit Mykotoxinen sind kontaminierte Futtermittel, die nach oraler Aufnahme jene für die Tierproduktion wichtigen Leistungsparameter negativ beeinflussen können. Aus diesem Grunde wurden zahlreiche Futtermittel, die speziell bei Zuchtsauen zum Einsatz kommen, prophylaktisch auf deren Mykotoxingehalte untersucht.
Im Zuge dieser Kontrollen wurden 2000 im Mykotoxinlabor der II. Medizinischen Universitätsklinik für Klauentiere, 1681 Untersuchungen auf das Vorhandensein von Deoxynivalenol sowie Zearalenon durchgeführt (1026 Deoxynivalenol- und 655 Zearalenonbestimmungen). Eingesandt wurden Mais-, Maissilage-, Weizen-, Hafer-, Gerste-, Pellets-, Mischfutter-, Getreideschrot-, Sauenalleinfutter-, Weizenkleie-, Geflügelfutter- und in geringerer Anzahl auch Futtermittelproben für Pferde. In Tabelle 1 sind die einzelnen Futtermittel mit jeweils Minimal- und Maximalwert dargestellt. Der Hauptanteil setzte sich jedoch aus Futtermitteln zusammen, die in Schweineproduktionsbetrieben zum Einsatz kommen. Als Einsender fungierten Tierärzte, Landwirte, Futtermittelhersteller sowie andere Futtermittellabors. Teilweise wurden auch Proben im Rahmen einer Problembestandsbetreuung, die von der Klinik gemeinsam mit den vor Ort praktizierenden Tierärzten durchgeführt wird, untersucht. An Hand der klinischen Symptomatik und dem festgestellten Mykotoxingehalt des Futters, wird dem Landwirt und dem betreuenden Tierarzt ein Sanierungskonzept vorgestellt und an einer gemeinsamen Problemlösung gearbeitet. Bei den heimischen Alleinfuttermitteln sind besonders Mais, Weizen und Hafer stark mit Fusarientoxinen belastet. Mykotoxine müssen als potentielle Risikofaktoren für die Entstehung von Bestandserkrankungen speziell bei Zuchtsauenbetrieben gesehen werden. Deshalb ist es für große Schweinezuchtbetrieb unumgänglich, in prophylaktischen Untersuchungen die vorhandenen Mykotoxinkonzentrationen sicherzustellen.

Tab. 1: Minimal- und Maximalwert sämtlicher im Jahre 2000 untersuchten Futermittel

	Deoxynivalnol (mg/kg)		Zearalenon (mg/kg)	
Futtermittel	Minimal	Maximal	Minimal	Maximal
Mais	0,05	6,35	0,001	0,344
Maissilage	0,08	3,64	0,002	0,052
Weizen	0,06	4,04	0	0,243
Hafer	0,08	5,42	0	0,215
Gerste	0,08	2,54	0	0,023
Pellets	0,50	3,84	0	0,006
Mischfutter	0,07	2,04	0	0,078
Getreideschrot	0,25	0,50	0,002	0,012
Sauenalleinfutter	0,07	4,91	0,001	0,074
Weizenkleie	0,11	2,83	0,004	0,008
Geflügelfutter	0,12	2,15	0,009	0,024
Pferdefutter	0,05	8,13	0	0,079

Anschrift der Verfasser:
Dipl. Tzt. Hermann Kahlbacher, Dr. Werner Hochsteiner, Univ. Prof. Dr. Maximilian Schuh; II. Medizinische Universitätklinik für Klauentiere, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien
Email: hermann.kahlbacher@vu-wien.ac.at

Induction of a Zearalenone degrading Enzyme caused by the Substrate and its Derivatives

Matthies I., H. Buchenauer, G. Woerfel, P. Karlovsky
Institute of Phytomedicine, University of Hohenheim

The *Fusarium* toxin Zearalenone (ZON) is harmful to animal and man due to its estrogenic effect, immunotoxicity, and genotoxicity. Therefore it is of high importance to have a system for the detoxification of ZON.

In large screening programs the mycoparasite *Gliocladium roseum* was found to be capable of detoxifying ZON. This microorganism hydrolizes the lactonic bond within the macrocyclic ring system of ZON. The resulting products are less toxic because they loose their estrogenic capacity.

The ZON-degrading enzyme is inducible by ZON itself and its derivatives α-Zearalenone (α-ZOL), Zearalanone (ZAN) and α-Zearalanone (α-ZAL) but not by β-Zearalenone (β-ZOL) and β-Zearalanone (β-ZAL).These compounds differ only in the position of one hydroxyl group in the molecule. However, the enzyme metabolizes all ZON-derivatives.

This different ability of ZON and its derivatives to induce the enzyme production was investigated under *in vitro* conditions. Differences were found in the necessary amount of the inducing substances and optimal time of induction in order to get maximal degradation of ZON. In our study, we found the highest degradation ability at a constant induction time of 24 h with an induction concentration of 20 µg ZON per ml liquid culture of the fungus or 40 µg α-ZOL per ml, respectively. We also compared all six derivatives of ZON at the same toxin induction concentration of 20 µg/ml and found that ZAN and α-ZAL showed the highest degradation ability.

The regulation and biochemical properties of the enzyme were characterized as a prerequisite to develop applications aimed at the detoxification of ZON in food and feedingstuff. Our goal is to isolate this largely unknown enzyme which is capable to detoxify this mycotoxin.

A survey of young children exposure to ochratoxin A in Poland

J. Postupolski, K. Rybińska, E. Ledzion, M. Szczęsna, J. Kurpińska-Jaworska, K. Karłowski
National Institute of Hygiene, Department of Food Research, Warsaw, Poland

Ochratoxin A (OA) is a mycotoxin, produced by a number fungal species from *Aspergillus* and *Penicillium* genus. OA is a genotoxic carcinogen and has teratogenic, neurotoxic and immunosuppresive properties. In temperature climate primary sources of OA in diet are stored cereales. Nuts, coffee, beans, pulses and spices may be additional sources. OA is stable in high temperature and other physical food processing, therefore it can also occur in food products produced from these ingredients. Scientific Committee on Food (SCF) suggested reducing exposure of OA as much as possible and recommended tolerable daily intake (TDI) of 5 ng/kg b.w/day.

The aim of this work was to estimate the exposure of young children in Poland to OA.
The study was performed during 1998 – 2000 years. Test material was obtained from children's social welfare homes, located in different provinces of Poland. Test material was taken twice the year, on spring (April-May) and autumn (September-November). Final number of 57 total diet samples was prepared as follow: 10-days daily menu (including beverage) were pooled, weight, frozen after homogenisation and delivered to the laboratory. After thawing each sample was homogenised, and 50 g analytical sample was withdrew to perform determination.

Analytical samples were extracted with chloroform-phosphoric acid mixture pH 1.6. The organic phases were collected together and evaporated; residues were dissolved in chloroform and extracted twice with sodium bicarbonate. The water phases were pooled together and cleaned-up using immunoaffinity columns. The eluate was evaporated in the stream of nitrogen and dissolved in HPLC mobile phase. Quantitation of OA was performed by reversed phase HPLC with post-column derivatization using ammonia solution and fluorescence detection. OA methyl ester was used for confirming test results. The limit of quantification of the method was estimated 5 ng/kg. The average recovery was 73% with coefficient of variation of 8 - 13%.

Ochratoxin A was found in all diet samples. The levels were ranged from 0,005 to 0,062 ng OA/kg diet, mean level was 0.025 ng OA/kg, and the median level was 0.025 ng OA/kg.

The daily intake based on body weights (10 kg for 1-year old, 12 kg for 3 year old children) and OA levels in diet ranged from 2,0 (6.8) to 6.8 (5.7) ng/kg bw/day mean level was 4.81 (4.01) ng/kg bw/day, the median level was 4,91 (4.09) ng/kg bw/day.

Mean dietary intake in all year and season was lower than tolerable intake of 5 ngkg bw/day suggested by the SCF, but maximum values intake exceeded TDI value.

Deoxynivalenol und Zearalenon in Getreide- und Getreideerzeugnissen des Bundeslandes Sachsen-Anhalt

Katrin Woese
Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Sachsen-Anhalt, Freiimfelder Str. 66-68, 06112 Halle

In Sachsen-Anhalt wurde wie auch deutschlandweit in vergangenen Erntejahren aufgrund günstiger Witterungsbedingungen sowie veränderter Fruchtfolgen und Bodenbearbeitungstechnologien ein verstärkter Befall des angebauten Getreides mit Fusarien festgestellt. Stichprobenartige Untersuchungen ergaben die Korrelation mit hohen Gehalten an den durch diese Schimmelpilze gebildeten Toxinen Deoxynivalenol und Zearalenon.

Im Rahmen eines Fusarien- und Fusarientoxin-Überwachungsprogramms werden von verschiedenen Landeseinrichtungen im Zeitraum von 2001 bis 2003 Getreide sowie Lebensmittel und Futtermittel auf Getreidebasis mit gesicherter sachsen-anhaltinischer Herkunft auf ihren Befall mit Fusarien bzw. ihre Kontamination mit Deoxynivalenol und Zearalenon geprüft. Durch die stichprobenartigen Untersuchungen auf allen Erzeugungs- und Verarbeitungsstufen soll ein erweiterter Einblick in die Belastungssituation einheimischer Produkte gewonnen werden. Im Sinne eines vorbeugenden gesundheitlichen Verbraucherschutzes sollen aus den gewonnenen Daten mögliche Risiken auf den verschiedenen Erzeugungsebenen abgeschätzt sowie gegebenenfalls notwendige Maßnahmen zu deren Minimierung und Untersuchungsschwerpunkte für die amtliche Lebensmittel- und Futtermittelüberwachung abgeleitet werden.

Erste Ergebnisse der Untersuchung von Lebensmitteln auf Deoxynivalenol und Zearalenon im Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Sachsen-Anhalt werden vorgestellt.

The Dialysis of Ochratoxin A (OTA)

[1]F. Malir, [1]J. Severa, [1]T. Roubal, [2]J. Kacerovsky, [3]P. Fixa, [3]P. Moucka, [3]J. Zahradnik, [4]J. Knizek, [4]J. Österreicher, J., [2]M. Brndiar, [5]M. Cerna

[1] Regional Hygiene Station, Xenobiochemistry Dept., National Reference Laboratory for Biomarkers of Mycotoxins and Mycotoxins in Food, Nezvalova 958, 500 02 Hradec Kralove, Czech Republic

[2] Purkyne Military Medical Academy, Nephrology Dept., Hradec Kralove, Czech Republic

[3] Faculty Hospital, Nephrology Dept., Hradec Kralove, Czech Republic

[4] Purkyne Military Medical Academy, Institut of Radiobiology and Immunology, Hradec Kralove, Czech Republic

[5] National Institute of Public Health, Centre of Environmental Health, Prague, Czech Republic

Our previous study showed that standard dialysis did not result in a decrease of the OTA level in the blood serum of patients regularly treated by dialysis, although the dialysis was effective in terms of inner homeostasis. However, from a theoretical point of view, OTA (with regard to its molecular weight) should be transported through the membrane in a similar way as e.g. creatinine and urea. One of the reasons for this problem could be the insufficient traverse of OTA through the dialysis membrane. Levels of OTA in the serum, as found after one dialysis, led us to deal with this problem more closely. Therefore, we examined the effect of dialysis on both OTA bound to the blood plasma proteins and free OTA. We carried out an in vivo experiment (see Table 1). Its aim was to determine OTA levels in the serum of patients in the terminal stage of chronic renal insufficiency (CHRI) before and after dialysis and also in the dialysate. Patients were dialyzed using the cellulose diacetate hollow fiber dialyzer FB-150 T_{GA} at the same blood flow (producer: Nissho Corporation, Osaka, Japan; effective surface area 1.5 m^2, membrane volume 90 ml, ultrafiltration coefficient 640 $ml.h^{-1}.100^{-1}$ mm Hg). For OTA determinations we employed the HPLC with fluorescence detection (detection limit 0.1 $\mu g.l^{-1}$; the method of J.BAUER, M. GAREIS J.Vet.Med., 34, 613-627, 1987 modified according to E.E. CREPPY et al. J.Sci. Publ., No.115, 145-151, 1991).

Table 1 Levels of OTA Found in the Serum of Patients Before and After Dialysis and in the Dialysate

Age (year)	Sex	Blood Flow (ml/ min)	Weight (kg)	Weight Loss (kg)	Levels of OTA (µg/l) Before Dialysis	After Dialysis	in Dialysate
68	Male	270	67.2	-1.2	2.3	1.7	0.05
72	Female	270	84.7	-0.2	0.5	0.5	0.05
75	Female	270	58.0	-0.8	3.6	3.6	0.05
75	Male	270	90.2	-3.2	2.3	2.0	0.05
67	Male	270	87.1	-1.6	2.1	1.6	0.05

OTA levels < 0.1 µg/l given as 1/2 of the detection limit i.e. 0.05 µg/l

It appears from Table 1 that we did not find OTA in the dialysate. OTA bound to blood plasma proteins did not penetrate the dialysis membrane. In contrast, free OTA, as confirmed by the in vitro experiment with the identical dialyzer, easily penetrated the same dialysis membrane and a dynamic balance was achieved within less than 30 min.

This study was supported by the IGA MZ CR, grant assignment No. NK/ 4576-2.

Auswirkungen konservierender Bodenbearbeitungssysteme auf Schimmelpilzbelastung und Mykotoxingehalt bei Winterweizen

Marina Müller [1] & Kurt Werner [2]: Zentrum für Agrarlandschafts- und Landnutzungsforschung Müncheberg,
[1] Institut für Primärproduktion und Mikrobielle Ökologie, Gutshof 7, D-14641 Paulinenaue,
[2] Forschungsstation Landwirtschaft Dedelow, Dorfstr., D-17291 Dedelow

Konservierende Bodenbearbeitung verändert das Bodengefüge und die Verteilung des organischen Materials im Boden. Durch die Anreicherung von organischer Substanz und Pflanzennährstoffen in den oberen Bodenschichten wird die Größe, die Zusammensetzung und die Aktivität der mikrobiellen Populationen entscheidend beeinflußt. Über die Auswirkungen dieser Veränderungen im Oberboden und in den Pflanzenresten nahe bzw. auf der Bodenoberfläche ist bisher noch wenig bekannt. Die Gefahr einer Kontamination der heranwachsenden Pflanzenbestände aus diesen oberen Bodenschichten sollte bei allen positiven Effekten dieser Bearbeitungsverfahren unbedingt beachtet werden. So besteht die Möglichkeit, daß es neben Selektionsvorteilen für potentiell tier- bzw. pflanzenpathogene Mikroorganismen auch zu einer verstärkten Bildung von Mykotoxinen kommen kann.

Die vorliegenden Arbeiten zeigen einjährige Untersuchungen zum Schimmelpilzbesatz und zur Mykotoxinbildung in der Phyllosphäre von Winterweizen auf einem lehmigen Sandstandort in Dedelow, Uckermark, Land Brandenburg. Dieser Parzellenversuch zur Aufklärung der Langzeitwirkung aufwandsreduzierter Bodenbearbeitung wurde im Herbst 1985 begonnen und besteht aus einer 5-feldrigen Fruchtfolge. Es wurden der Anbau von Winterweizen nach Vorfrucht „Kartoffel" und nach Vorfrucht „Silomais" untersucht, jeweils in zwei verschiedenen Bodenbearbeitungsverfahren, die als Variante „P" (Traditionelle Grundbodenbearbeitung mit Pflugfurche) und Variante „M" (laufend flache Grubberbearbeitung bis 15 cm Tiefe) bezeichnet wurden. Die untersuchten mikrobiologischen Parameter umfassen die Keimzahlen der Hefen und Schimmelpilze im Boden und auf der Pflanze während der Vegetationsperiode im Jahr 2000. Die Population der Schimmelpilze wird durch die Bestimmung der Gattungen näher charakterisiert. Die mikrobiellen Aktivitäten werden anhand von Enzymaktivitäten (Glucosidasen, Phosphatasen und Aminopeptidasen) gemessen. Die Mykotoxine Deoxynivalenol (DON), Zearalenon (ZEA) und T2-Toxin werden durch RIDASCREEN FAST Enzymimmunoassays der Firma r-biopharm (Darmstadt) bestimmt, die Toxine Alternariol (AOH), Alternariolmonomethylether (AME) und Altenuene (ALT) nach Auftrennung durch HPLC an RP18-Säulen mittels Fluoreszenz und Diodenarray detektiert.

Die Gesamtkeimzahlen der Hefen und Schimmelpilze im Boden zeigt einen zunächst leicht ansteigenden, dann relativ konstanten Verlauf, während die MO-Population in der Phyllosphäre des Weizens deutlich vom Witterungsverlauf im Jahr 2000 geprägt ist: Das außergewöhnlich warme und trokkene Frühjahr führte zu einer deutlichen Abnahme der Keimzahlen, gefolgt von einem erneuten Anstieg nach Einsetzen der feuchten Witterung. Dabei gab es keine Unterschiede zwischen den Varianten der Bodenbearbeitung bzw. der Vorfrucht. Optisch waren die Winterweizen-Ähren auf allen Parzellen kurz vor der Ernte deutlich schwarz gefärbt. Die Population der filamentösen Pilze umfasst typische Feldpilz-Gattungen wie *Epicoccum*, *Cladosporium*, *Stemphylium*, *Trichoderma* und *Verticillium*, zu allen Probenahmezeitpunkten auch hohe Anteile der toxinogenen Gattungen *Fusarium* und *Alternaria*, regelmäßig geringe Anteile an *Aspergillus* und *Penicillium*. Es wurden aber keine auffälligen Bezeihungen zu Bodenbearbeitung und Vorfrucht gefunden. Bereits einen Monat vor der Ernte konnten die Mykotoxine DON (1,7-10,3 ppm), T2-Toxin (96,4-163,1 ppb) und AOH (5,7-15,4 ppm) in allen 4 Varianten bestimmt werden; ZEA (27 ppb) wurde nur in einer Variante (Pflug nach Mais), ALT nur vereinzelt in verschiedenen Konzentrationen und AME gar nicht detektiert.
Es ist wahrscheinlich, dass der mikrobielle Zustand und die toxische Belastung der Parzellen im Jahr 2000 eher von der rel. extremen aktuellen Witterung als von der Bodenbearbeitung bzw. der Vorfrucht beeinflusst wurde. Es ist geplant, die Versuche über mehrere Jahre weiterzuführen und größere Versuchsfelder mit einzubeziehen.

The effect of some *Fusarium* mycotoxins on maize plants

M. Nadubinska[1], *M. Ciamporova*[2]
[1] Institute of Experimental Phytopathology and Entomology, Slovak Academy of Sciences, Nadrazna 52, SK-900 28, Ivanka pri Dunaji, Slovakia
[2] Institute of Botany, Slovak Academy of Sciences, Dubravska cesta 14, SK-842 23, Bratislava, Slovakia

Fungi of *Fusarium* spp. produce a wide range of secondary metabolites, which can affect plants, animals and also other fungal species. Toxic compounds are to the greatest extent accumulated in wheat, maize and barley and are potential risk for human health [1]. Oat, rye and triticale seem to have developed some mechanisms of resistance or contamination escape. Simultaneous infection with different *Fusarium* species on cereals and maize has been observed and their interaction anticipated. Because certain fungal strains are able to synthesize a number of toxic metabolites (e.g., [2]), it is possible that several different toxins will be present in one plant. The resulting disease symptoms are dependent on their synergistic or antagonistic relationships and also on the resistance mechanism of the host plant. Some plants are able to prevent pathogen contamination, while others can inactivate toxin or restrict its production by the pathogen, so that susceptibility to infection need not be in correlation with toxin cummulation and sensitivity to toxin action [3].

In this survey the influence of fusariotoxin mixture on maize plants with different susceptibility toward *Fusarium* infection was studied and compared to results obtained after exposure to single toxins. Two week old hydroponic maize plants of resistant (Lucia) and susceptible cultivar (Pavla) were transferred to toxin solution containing moniliformin, fumonisin B_1, fusaproliferin, zearalenone, zearalenol and deoxynivalenol, each at concentration 3.5 µg/ml. Although biomass production after 48-hour treatment with both cultivars was 6% lower than in respective controls growing in solvent without toxins, chlorophyll content in leaves was influenced differentially. In resistant cultivar chlorophyll content was increased comparing to control, with higher increase in chlorophyll *b*. In susceptible cultivar Pavla chlorophyll *a* was not significantly changed and chlorophyll *b* content was decreased, in comparison with the control. Additionally ultrathin sections from leaves and roots of treated plants were evaluated under transmission electron microscopy.

[1] Miller, J.D., Trenholm, H.L. (eds.). Mycotoxins in grain. Compounds other than aflatoxin. Eagan press, Minnesota, U.S.A.,1994, 19 – 36
[2] Logrieco, A., Moretti, A., Ritieni, A., Bottalico, A., Corda, P., Plant Dis. 79 (1995), 727 – 731
[3] Casale, W.L., Hart, L.P., Phytopathol. 78 (1988), 1673 – 1677

A survey of Aflatoxin B1 contamination of marketed processed peanut products in Indonesia

Cuk Tri Noviandi[2], E. Razzazi[1], J. Böhm[1], Ali Agus[2], Sri Wedhastri[2], Y.B. Maryudhani[2], Nuryono[2], Sardjono[2] and J. Leibetseder[1]
[1]Institute of Nutrition, University of Veterinary Medicine, A-1210 Vienna, Austria
[2]Unit of Mycotoxicology, Life Sciences Laboratory, Gadjah Mada University, 55281 Yogyakarta, Indonesia

Aflatoxins, toxic metabolites produced by *Aspergillus spp.*, mainly *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*, are frequently found in many raw and processed feeds and food stuffs. High ambient temperatures and high relative humidity in humid tropical regions such as in Indonesia are highly favourable for the development of such fungi. Aflatoxin B1(AfB_1) was recognised as one of the most toxic mycotoxins and the world-wide regulatory control limits for AfB_1 in food and feed are well established. Also it has been reported that Aflatoxin contamination has become a serious problem in Indonesia but no strict regulatory control has been enforced in this country. Among agricultural products, peanuts are very susceptible to aflatoxin contamination. In Indonesia, peanuts and its processed products i.e. roasted peanuts, peanuts coated with egg flour (*kacang telur*) or wheat flour (*kacang atom*) and peanut sauce (*sambal pece*") are common foods . In the Javanese area, *Kacang telur* and *kacang atom* are generally consumed as snacks by children whereas *Sambal pecel* is commonly consumed with rice for breakfast,.

A preliminary survey was undertaken to evaluate the level of AfB_1 contamination of peanuts and their processed products, which were purchased from markets and supermarkets throughout the Province of Yogyakarta, Indonesia. Samples of roasted peanuts (n=21), roasted unshelled peanut (n=9), *kacang atom* (n=18), *kacang telur* (n=19) and *sambal pecel* (n=11) with different trade marks, were purchased. Quantitative analysis was carried out on all samples (n=70) by the ELISA technique with the use of commercial kits (Aflaplate®). The detection limit for AfB_1 was 2 ppb. Samples (50g) were ground and extracted using methanol/water (60/40) and measured for AfB_1. The results indicate that only 3 samples (14%) of roasted peanuts were contaminated with as high as 24 ppb AfB_1, while only 1 sample (8%) of unshelled peanuts was found to be only slightly positive for AfB_1 (2.2 ppb). In contrast, 13 samples of *kacang atom* (72%) were contaminated with as high as 61.7 ppb and an average of 24.2 ppb. On the other hand, *Kacang telur* 9 samples (82%) were positive with as high as 7 ppb and an average of 4.5 ppb. All *Sambal pecel* samples (100%) were contaminated with the highest level being 230 ppb and an average of 36.5 ppb. These results indicate a serious problem of AfB_1 contamination in processed peanut products available for human consumption in Indonesia, especially in snacks such as *sambal pecel*, *kacang atom* and *kacang telur*.

One decade of routine analysis of mycotoxine contamination of food (1990-2000)

O. Kräutler, F. Vojir, W. Mautner
Federal Institute for Food Control and Research, Vienna
(Bundesanstalt für Lebensmitteluntersuchung und -forschung, Wien)
B A L U F

As part of the official food control measurements in the Federal Institute for Food Control and Research (Vienna) mycotoxine contaminations were investigated since the early 80th. The results from the decade between 1990-2000 are presented.

About 2700 samples from various commodities were analysed for mycotoxine contamination. The mycotoxins sought were aflatoxins including aflatoxin M1 (pistachio nuts, peanuts, figs, spices...,.raw milk), ochratoxin A (fruit juices, coffee, spices, kidneys...), patulin (fruit juices and other fruit products) and deoxynivalenol (DON, Vomitoxin) in cereals and cereal products.

For the determination of residues of mycotoxins thin-layer chromatography (TLC), high-performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC) and enzym-linked immunosorbent assay (ELISA) were applied. HPLC is nowadays the most commonly applied technique for the non-volatile mycotoxins. GC has limited applications in mycotoxin analysis for trichothecenes after a derivatization step.

The sampling were carried out by trained officials from the Food Inspection Service. The sampling is not in all cases a random sampling, especially in the case of products with aflatoxin contamination enforcement samples were taken as a follow-up when the maximum level was exceeded. Therefore not all results are representative for a specific product but highlights a specific problem.
The combined data and four special issues are presented.

HPLC - MS as a tool for the determination of various mycotoxins in cereals

Lea Pallaroni, Christoph von Holst and Elke Anklam,
European Commission, DG Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection – Food Products Unit, Via E. Fermi, 21020 Ispra (Va), Italy, Tel. ++39-0332-785926; Fax ++39-0332-785707, lea.pallaroni@jrc.it

Nivalenol (NIV) deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) are produced by the same *Fusarium* species, therefore they frequently co-occur in the same agricultural commodities. At present NIV, DON and ZON are mostly analysed with two completely different techniques, as gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC), requiring two separate analyses. A rapid method for the simultaneous detection of these mycotoxins is desired to optimise the analysis of these compounds. In this study we present a method for the simultaneous detection of NIV, DON and ZON using RP-HPLC coupled to a mass spectrometer (MS) ion trap detector equipped with an atmospheric pressure chemical ionisation interface (APCI).
In this study the HPLC-MS method was evaluated not taking into account the extraction efficiency of the target analytes from the matrix, therefore the spiking procedure has been carried out on the crude extracts and not on the raw cereals. Moreover the possibility of drastically decreasing the sample preparation was investigated by analysing directly spiked crude extracts of four cereals (barley, oat, wheat flour and corn) without performing any clean-up step. A good liquid chromatography separation of the target analytes was achieved using a binary gradient acetonitrile-water.
In the negative ionisation mode the limits of detection were 60 μg/kg for NIV and 50 μg/kg for DON in barley and 15 μg/kg for ZON in corn, while the limits of quantification in the mentioned matrices were 200 μg/kg, 160 μg/kg and 50 μg/kg, respectively. Better LOD and LOQ were found in the other matrices.
Matrix interferences have a strong influence when a crude extract is injected. The matrix effect was evaluated comparing the standards calibration curves obtained dissolving the standards in the mobile phase and the calibration curves obtained adding the standards to the matrix. The standard curves show a good linearity in all the considered matrices, but the slope differ between matrices and standard calibration curves. For example barley quenches the MS signal for all the tree mycotoxins, while corn seems to be the most suitable matrix for direct analysis after extraction, skipping the clean-up procedure.
The developed LC-MS method allows for a simultaneous detection of NIV, DON and ZON in cereals crude extracts, avoiding time-consuming sample preparation and achieving reliable quantification limit for a screening method, nevertheless the use of a matrix standard calibration curves for quantification purposes is required.

Influence of Basic Nutrient Components on Ochratoxin A Biosynthesis by *Penicillium verrucosum*.

P.F. Färber and R. Geisen
Federal Research Center for Nutrition, Institute of Hygiene and Toxicology, Haid-und-Neu-Str. 9, D-76131 Karlsruhe, Germany

Ochratoxin A (OTA) and its derivatives are products of the secondary metabolism of different filamentous fungi belonging to the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. OTA acts as a genotoxic carcinogen in animals and humans; in addition it can cause fatal effects on fetal development and the immune system. Most important sources for this mycotoxin are plant products like cereals, coffee, fruit juices and wine. Besides those animal tissues except those derived from ruminants can be secondary sources for this fungal metabolite. Despite the importance of this mycotoxin for human and animal health nearly nothing is known about the genetic basis for ochratoxin biosynthesis. A presumable biosynthetic pathway for OTA is proposed and most of the metabolic intermediates are isolated and described. But structural as well as regulatory genes are still unknown. Different approaches are possible to identify genes involved in a special biosynthetic pathway. One possible approach is the analysis of differentially expressed genes. Generally in these differential display experiments the RNA pattern of an OTA producing fungus is compared to that of a non-producing strain. General basis for this type of experiments therefore can be the comparison of OTA^+ wild type strains with OTA^- mutant strains or the comparison of metabolic conditions which are suitable or non-suitable for OTA biosynthesis. The investigation of an OTA^+ strain under OTA producing and non-producing conditions requires the investigation of a suitable basic medium and additionally supplements leading to OTA production and OTA-non-production respectively. Using a strong OTA producing *P. verrucosum* strain, best results under the aspect of OTA production/non-production could be received by the use of a minimal medium supplemented by different C- and N-sources suitable or non-suitable for OTA biosynthesis. The best result for OTA production, in nearly the same amount as after growth on a complete medium like YES medium, could be received after growth on minimal medium supplemented with glycerin and NH_4^+. A complete depression of OTA biosynthesis was observed in minimal medium supplemented with lactose in combination with NO_3^-. These two combinations of the minimal medium with OTA promoting and non-promoting supplements will be used in the differential display experiments.

Fusarientoxine (DON und ZEA) in Mehl und Brot

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

Fusarien sind seit einigen Jahren zunehmend in der Diskussion. Getreideernten enthalten oft hohe Gehalte an Mykotoxinen, die von Fusarien gebildet wurden. In der Folge können auch Lebensmittel mit diesen Fusarientoxinen stark belastet sein. Insbesondere die Fusarientoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA) sind häufig nachzuweisen, wobei Witterung, Erntezeitpunkt und Lagerung Einfluß auf das Fusarienwachstum und den Mykotoxingehalt haben.

Seitdem das Scientific Committee on Food der Europäischen Kommission eine Bewertung der Fusarientoxine, v.a. für DON und ZEA, erarbeitet und eine vorläufige tolerierbare tägliche Aufnahmemenge dieser Toxine festgesetzt hat, steht die Einführung europaweiter Grenzwerte für diese Toxine zur Diskussion. Aufgrund der potentiellen gesundheitlichen Gefährdung ist der Gehalt an Mykotoxinen ein wichtiger Qualitätsparameter für Getreidesorten.

Durch Untersuchungen von Lebensmitteln aus dem Handel im Rahmen des gesundheitlichen Verbraucherschutzes kann ein möglichst wirklichkeitsgerechtes Bild der Belastung der Lebens-mittel und damit des Verbrauchers erstellt werden.
Getreide gelangt hauptsächlich als Weiterverarbeitungsprodukt in Form der Grundnahrungs-mittel Brot und Backwaren in die menschliche Nahrungskette.

Untersuchungen, die sich mit dem Einfluss des Brotherstellungsprozesses auf den Gehalt an DON und ZEA (möglicher Abbau durch Fermentation und Backprozess) beschäftigen, sind bisher selten und zeigen teilweise unterschiedliche Ergebnisse.

Im Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Sigmaringen wurde im Rahmen eines Forschungsprojektes damit begonnen, Brote sowie die zur Herstellung verwendeten Mehl-sorten zu untersuchen, um den Einfluss des Brotherstellungsprozesses aufzuklären.

Erste Ergebnisse der Untersuchungen werden vorgestellt.

Entwicklung eines hochempfindlichen Enzymimmuntests zum Nachweis von Ochratoxin A

E. Schneider[1], E. Usleber[1], R. Dietrich[2] und E. Märtlbauer[2]
[1] Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig-Universität, Ludwigstrasse 21, D-35390 Gießen
[2] Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität, Veterinärstr. 13, D-80539 München

Es ist zu erwarten, dass in naher Zukunft von der Europäischen Kommission Höchstmengen für Ochratoxin A in Lebensmitteln festgesetzt werden. Diese Höchstmengen liegen vermutlich für einige Lebensmittel in einem Konzentrationsbereich von unter 1 Mikrogramm/kg. Daher ist die Verfügbarkeit von Routinemethoden erforderlich, die den Nachweis von Ochratoxin A in diesem Konzentrationsbereich erlauben. Zur Entwicklung eines hochempfindlichen Enzymimmuntests für Ochratoxin A wurde als Immunogen ein Toxin-KLH-Konjugat synthetisiert und zur Immunisierung von Kaninchen (n=4) verwendet. Alle Tiere zeigten eine gute Immunantwort, die Seren von zwei Tieren zeigten im kompetitiven direkten Enzymimmuntest (Ochratoxin A-Meerrettichperoxidase-Konjugat als Markerantigen) eine sehr hohe Sensitivität für Ochratoxin A. Die Nachweisgrenze der Standardkurve des optimierten Testverfahrens unter Verwendung eines Antiserum-Pools betrug 15 pg/ml, die 50%-Bindungsdosis 50 pg/ml. Die relative Kreuzreaktion mit Ochratoxin B betrug 2%. Damit ist das hier beschriebene Verfahren der empfindlichste je beschriebene Enzymimmuntest zum spezifischen Nachweis von Ochratoxin A. Aufgrund dieser hohen Testempfindlichkeit ist mit diesem Verfahren ein einfacher Nachweis von Ochratoxin A in verdünnten Lebensmittel-Extrakten im Konzentrationsbereich von unter 1 ng/g möglich.

Mykotoxinbelastung ausgewählter Lebensmittel (aus der Sicht der amtlichen Lebensmittelüberwachung)

I. Hainschitz, K. Rieger, H. Siegl
Lebensmitteluntersuchungsanstalt des Landes Vorarlberg
Montfortstraße 4, A-6901 Bregenz Tel: 0043(0)5574/511-47099

Der Schwerpunkt der Mykotoxinuntersuchungen in Vorarlberg lag in den letzten Jahren bei den Aflatoxinen B_1, B_2, G_1, G_2 und sporadisch M_1, sowie Ochratoxin A (OTA) und Patulin. Die Analysen erfolgten dabei hauptsächlich durch Hochdruckflüssig-keitschromatographie (HPLC), wobei aber auch Immunoaffinitätsverfahren und in letzter Zeit der *CHARM II*-Test eingesetzt wurden. Dieses Screeningverfahren arbeitet nach dem Prinzip eines Radioimmunoassay.

Patulin in Säften und Saftkonzentraten:
Die Extraktion erfolgte durch flüssig/flüssig Extraktion mit Ethylacetat. Es wurden Säfte und Konzentrate untersucht, wobei der Gehalt der Konzentrate jeweils auf den trinkfertigen Saft umgerechnet wurde. Von den 327 untersuchten Apfelsaftproben bzw. verdünnten Konzentraten wurde bei 49 der Grenzwert von 50 µg/kg überschritten. Der Durchschnitt lag bei 27,6 µg/kg Apfelsaft mit Höchstwerten bis 190 µg/kg.

Ochratoxin A in Kaffee, Getreideprodukten und Bier:
Kaffeepulver wurde mit einer Methanol-$NaHCO_3$-Lösung extrahiert, die Extrakte durch Immunoaffinitäts-Festphasenextraktion aufgereinigt und mit Fluoreszenzdetektion analysiert. Bei den 38 untersuchten Proben lagen 31 unter der Nachweisgrenze von 0,2 µg/kg. Mit 10,5 µg/kg lag der höchste Wert aber deutlich über dem diskutierten Grenzwert von 4 µg/kg.
Es wurden auch 28 Bierproben untersucht. Der Mittelwert lag bei 0,018 µg/l mit Höchstwerten von 0,04 µg/l. Die Untersuchungen der Malzproben ergaben auch nur geringe Belastungen (<0,2 µg/kg).

Aflatoxine (B_1, B_2, G_1 und G_2) in Nüssen, Pistazien und Honig:
Die Probenvorbereitung erfolgte durch Extraktion mit Methanol/Wasser und Anreicherung auf Immunoaffinitätssäulen. Nach Derivatisierung mit Trifluoressigsäure wurden die Messungen mit HPLC und Fluoreszenz-Detektion durchgeführt. Von den 55 untersuchten Pistazienproben waren 29 unter der Nachweisgrenze von 0,5 µg/kg, wobei für Aflatoxin B_1 Werte bis 425 µg/kg gemessen wurden. Bei den 25 untersuchten Paprikapulvern wurden im Durchschnitt 15,6 µg/kg dieses Aflatoxins gefunden.
Es wurden auch orientierende Untersuchungen von Honig durchgeführt. Hier ergaben sich Werte von bis zu 0,6 µg/kg Aflatoxin B_1.

Die Untersuchungen belegen, dass nur wenige Proben wirklich frei von Mykotoxinen sind, wobei die Belastung der Lebensmittel aber im Allgemeinen sehr niedrig ist. Trotzdem sollte aus Vorsorgegründen die Belastung mit diesen Schimmelpilzgiften weiter minimiert werden.
Die Ergebnisse zeigten auch, dass bei Einzelproben die Grenzwerte um ein Vielfaches überschritten wurden. Es besteht daher neben der Notwendigkeit einer Verbesserung der Produktionsverfahren, auch jene einer amtlichen Kontrolle, um hochkontaminierte Lebensmittel nicht zum Verbraucher gelangen zu lassen.

Analysis of double-stranded RNA and virus-like particles in trichothecene-producing strains of *Fusarium graminearum*

Simone Theisen, Sabrina Röseler, Sibylle Berger and Heinrich Buchenauer
Institute of Phytomedicine, University of Hohenheim, Otto-Sander-Str. 5, D-70593 Stuttgart, Germany

Virus-like particles (VLPs) with double-stranded RNA (dsRNA) genome have been found in *Fusarium poae* [1] and *F. solani* f. sp. *robinae* [2]. In the worldwide fungal pathogen *F. graminearum* the presence of dsRNA elements and their phenotypic effect on the pathogenicity (virulence) have not been studied extensively. *F. graminearum* is one major producer of trichothecene mycotoxins.

In our studies we tested ten wild-type isolates of *F. graminearum*, collected from wheat in Germany, for extrachromosomal genetic elements such as mycoviruses or plasmids. In two trichothecene-producing strains of *F. graminearum*, dsRNAs were detected. The isolates *F. graminearum* 8.2 and 19.2 had dsRNA in the size of about 2.0 kb or 6.0 kb, respectively. The dsRNAs were associated with capsid proteins and persisted within the cytoplasm of the infected host cells as encapsidated VLPs. In both strains, icosahedral particles of about 38 nm in diameter could be identified with electron microscopy after mycovirus purification. The VLPs contained proteins of 30 kDa and 65 kDa.

The isolates *F. graminearum* 8.2 and 19.2 were studied for trichothecene production. Tox5 PCR [3] with a primer pair based on conserved sequences in the *tri5*-gene of *F. graminearum* showed in each isolate a 658 bp fragment. This result indicated potentially trichothecene-production. We tested the isolates for toxin production: both strains were able to produce the trichothecenes deoxynivalenol, nivalenol and the derivatives 3-acetyl-DON and 15-acetyl-DON.

References:
[1] [1] Fekete, C. *et al.* (1995). FEMS Microbiol. Lett. 131: 295-299.
[2] Nogawa, M. *et al.* (1993). FEMS Microbiol. Lett. 110: 153-158.
[3] Niessen, M.L., Vogel, R.F. (1998). System. Appl. Microbiol. 21: 618-631.

In vitro studies on the evaluation of mycotoxin decontaminating agents

Susanne Döll, S. Dänicke, Hana Valenta and G. Flachowsky
Institute of Animal Nutrition, Federal Agricultural Research Centre (FAL), Bundesallee 50, 38116 Braunschweig, Germany

It is known from the literature that several adsorbing agents are also able to bind several mycotoxins to different degrees. The ability to adsorb mycotoxins is claimed to some of these agents which are already commercially available. In this study, diverse decontaminating agents were tested for their ability to adsorb zearalenone (ZON) and deoxynivalenol (DON) in vitro.

The in vitro model employed simulated the in vivo conditions (pH, temperature, transit time) of the porcine gastrointestinal tract.
The decontaminating agents were added to phosphate-citrate buffer (pH 5) spiked with ZON and DON. Equipped with a magnetic stirrer the test tubes were placed in a water bath temperated to 37°C. After 2 hours of incubation the pH was adjusted to 3 and the tubes were incubated for another 2 hours. After a total of 4 hours of incubation, which simulated the conditions in the stomach within 4 hours after feeding, the pH was adjusted to 6 to simulate the conditions in the proximal small intestine followed by 3 hours incubation. The last step was the incubation for 3 hours after adjustment of the pH to 7.
Subsequent to the in vitro experiments the samples were fractionated by centrifugation into a supernatant containing the unbound mycotoxins and a residue consisting of the decontaminating agent and the bound mycotoxins. The supernatant was subjected to mycotoxin analysis.
ZON was analysed by HPLC with fluorescence detection and DON was determined by HPLC using diode array detection.

To determine the general ability of the decontaminating agents to bind the mycotoxins, the in vitro experiment was carried out in 4 replicates for each product, in 2 replicates for the spiked buffer (without adsorbents) in every run and for the buffer without mycotoxins (as references).
Experimental results depicting average adsorbtion of ZON to various decontaminating agents are shown in figure 1.
DON adsorbtion was rather low and highly variable for all tested products which indicates a poor adsorbtion ability.

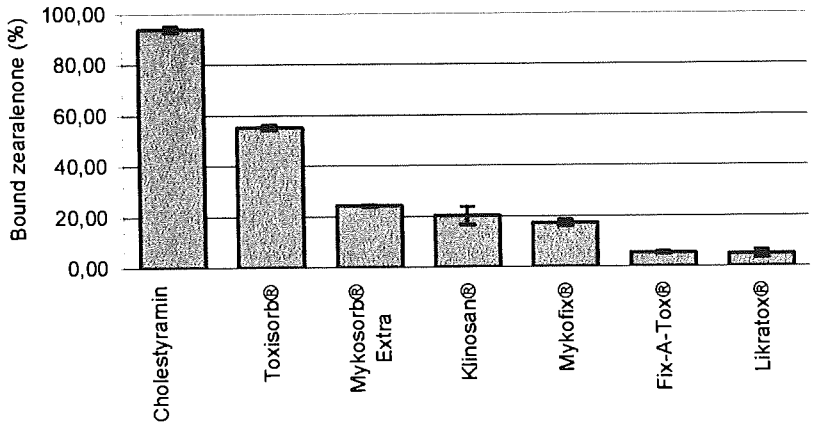


Figure 1: Average ZON adsorbtion (%) by diverse decontaminating agents tested in vitro

HPLC-MS – Methode zur Analytik der A-Trichothecene

N. Thimm, J. Handl, E.M. Binder
Biomin G.T.I. GmbH, Industriestr. 21, A-3430 Herzogenburg

Die Mykotoxine T-2 Toxin (T-2), HT-2 Toxin (HT-2) und Diacetoxyscirpenol (DAS) gehören zu der Gruppe der A-Trichothecene, die sich im Gegensatz zu den B-Trichothecenen darin auszeichnen, dass sie keine Carbonyl-Gruppe am C-8 Atom besitzen.
T-2, HT-2 und DAS kommen in Getreiden wie Mais, Hafer, und Gerste vor und werden von verschiedenen *Fusarium* species, z.B. *Fusarium sporotrichioides*, gebildet [1].
Bei Tieren führen Trichothecene abhängig von ihrer Konzentration und der Tierspezies zu erhöhter Anfälligkeit gegenüber Krankheiten, reduzierter Futteraufnahme bis hin zu Erbrechen und Futterverweigerung [2]. Den A-Trichothecenen wird dabei eine höhere Toxizität zugeschrieben als den B-Trichothecenen [3].

Zu den meist verwendeten analytischen Methoden für die A-Trichothecene gehört die Gaschromatographie mit Elektroneneinfangdetektor (GC-ECD) [4]. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die Verbindungen vor der Detektion derivatisiert werden müssen. Die Analytik mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gekoppelt mit UV-Detektor ist aufgrund des fehlenden Chromophors im Gegensatz zu den B-Trichothecenen nicht möglich. In dieser Arbeit wurde eine sensitive Methode entwickelt und aus Mais validiert, bei der eine HPLC gekoppelt mit Elektrospray-Ionisation und Massendetektor (ESI-MS) zum Einsatz kam.

Für die Extraktion wurden die Proben mit einer Mischung aus Acetonitril/Wasser (84/16) drei Minuten geblendet. Die Aufreinigung wurde mit Mycosep™-Säulen (#227) der Firma Romer™ Labs, Inc. (Union, MO) durchgeführt.
Die chromatographische Trennung der Verbindungen wurde auf einer Zorbax Bonus-RP – Säule (2,1x150mm) unter Verwendung eines Gradienten aus Ammoniumacetat/Ameisensäure und Acetonitril durchgeführt. Für jede Verbindung wurden zwei charakteristische Massen zur Qualifizierung herangezogen: T-2: m/z 484 [M + NH_4^+] und das Fragment m/z 305; HT-2: m/z 447 [M + Na^+] und m/z 442 [M + NH_4^+]; DAS: m/z 384 [M + NH_4^+] und das Fragment m/z 307. Die Quantifizierung wurde jeweils mit einer Masse durchgeführt: T-2: m/z 484, HT-2: m/z 442 und DAS: m/z 384. Die Fragmentorspannung für alle genannten Massen wurde optimiert.
Der Tabelle sind die Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen der einzelnen Verbindungen, erhalten bei der Validierung aus Mais, zu entnehmen.

Verbindung	Nachweisgrenze [µg/kg]	Bestimmungsgrenze [µg/kg]
T-2	3,5	12,7
HT-2	6,1	21,9
DAS	4,1	14,8

[1] [1] Rafai, P., A. Bata, A. Vanyi, Z. Papp, E. Brydl, L. Jakab, S. Tuboly, and E. Tury, (1995) The Veterinary Record, May 13, 485-489.
[2] Prelusky, D.B., B.B. Rotter, and R.G. Rotter in J.D. Miller, and H.L. Trenholm (ed) (1994), Mycotoxins in Grain, Eagan Press, St. Paul.
[3] Ueno, Y. Trichothecenes. Chemical, Biological and Toxicological Aspects (1983), Elsevier, Amsterdam.
[4] Kotal, R., K. Holadova, J. Hasjslova, J. Poustka, and Z. Radova, (1999), Journal of Chromatography A, 830, 219-225.

Einfluß der Extraktreinigung auf die Wiederfindung von Citrinin bei HPLC-Analysen

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

Das Mykotoxin Citrinin ist wie Ochratoxin A nephrotoxisch, d. h. nierenschädigend und nach neueren Erkenntnissen möglicherweise auch für den Menschen kanzerogen. Bei Ratten wurden im Tierversuch Nierentumore erzeugt. In in vitro-Testsystemen zeigte Citrinin ähnlich wie Ochratoxin A ein genotoxisches Potential. Citrinin kann gemeinsam mit Ochratoxin A als sekundäres Stoffwechselprodukt von Schimmelpilzen der Gattungen Penicillium, Aspergillus und Pythium auf einer Vielzahl von landwirtschaftlichen Produkten gebildet werden und damit 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 zum Ochratoxin A wenig Beachtung geschenkt, was möglicherweise auf die schlechtere analytische Bestimmbarkeit dieses Mykotoxins zurückzuführen ist. In der Vergangenheit sind verschiedene Methoden (DC, HPLC, ELISA) zur Citrininbestimmung in der Literatur publiziert worden. Zur Extraktion von Citrinin aus der Probenmatrix wird meist Chloroform, Dichlormethan oder Acetonitril verwendet, zum Teil in Mischung mit Phosphorsäure, Schwefelsäure oder Salzsäure unterschiedlicher Konzen-tration und Menge. Zur Extraktreinigung sind Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Säure-Base-Reinigung, Reinigung an Kieselgur und Gelpermeationschromatographie beschrieben worden. Zur HPLC wurden sowohl eine sauer gepufferte Normalphase als auch reversed-phase-Material (C18) verwendet. Zur Detektion wird die Eigenfluoreszenz von Citrinin genutzt. In vielen Publikationen wird von analytischen Schwierigkeiten und der Instabilität des Toxins berichtet.
Unlängst wurde ein ELISA-Verfahren zur Citrininbestimmung im ppb-Bereich entwickelt, das inzwischen auch kommerziell verfügbar ist. Da ELISA jedoch nur ein Screening-Verfahren ist, bedürfen mittels ELISA gewonnene Analysendaten stets einer Absicherung durch andere analytische Verfahren.
Von der IGV GmbH wird im Auftrag des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft an der Entwicklung einer problemlos anzuwendenden, zuverlässigen und empfindlichen HPLC-Methode im unteren ppb-Bereich gearbeitet, da eine solche Methode bisher nicht existiert. Basis dafür ist der Vergleich verschiedener in der Literatur beschriebener Methoden und die Untersuchung der Toxinverluste bei der Analyse. Die Anwendung verschiedener publizierter Methoden führte zu unbefriedigenden und widersprüchlichen Ergebnissen. Das Poster gibt einen Überblick über die erzielten Ergebnisse, insbesondere zum Einfluss verschiedener Extraktreinigungsverfahren auf die Wiederfindung von Citrininstandardzusätzen sowie den Einfluss des pH-Wertes bzw. der Säurekonzentration bei der Elution sowie in der HPLC.
Für die HPLC wurde in der IGV GmbH eine Gradientenmethode entwickelt, mit der noch 10pg Citrinin sicher detektiert werden können. Eine erfolgversprechende Festphasen-extraktionsmethode ist zur Zeit in Arbeit.

Aufreinigung und Nachweis von Deoxynivalenol aus Blut, Galle, Harn und Kot vom Schwein unter Verwendung von Immunoaffinitätssäulen und LC-UV Detektion.

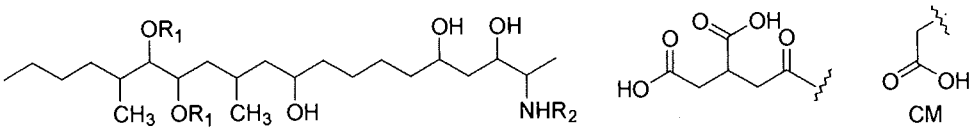
W. Janes und M. Schuster
Bayerische Landesanstalt für Tierzucht, 85586 Poing

Deoxynivalenol (DON) ist ein toxischer Metabolit, der von Fusarien-Schimmelpilzen gebildet wird. Der Schimmelpilz wächst vorwiegend auf Mais und Weizen, Getreidesorten, die bereits auf dem Feld befallen werden und als Lebensmittel und Futtermittel Verwendung finden.
Im Rahmen eines Fütterungsversuchs, in dem die Wirksamkeit verschiedener Futterzusätze zur Herabsetzung der Bioverfügbarkeit und damit die Verringerung des gesundheitsgefährdenden Potentials von DON bei Ferkeln abgeschätzt werden soll, wurde eine Methode erarbeitet, mit der DON in Blut, Harn, Galle und Kot über HLPC-UV-Detektion nachgewiesen werden kann.
Dabei sollte das Verfahren wegen des erwarteten Analysenumfangs mit möglichst geringen Aufwand durchzuführen und gleichzeitig durch hohe Empfindlichkeit charakterisiert sein um auch sehr geringe Belastungen erfassen zu können.
Ein wesentlicher Bestandteil des Verfahrens ist dabei die Reinigung und Konzentrierung mittels Immunoaffinitätssäulen. Mit Hilfe einer präparativen HPLC-Vorreinigung in Kombination mit Immunoaffinitätssäulen gelang es eine selektive Methode auszuarbeiten, mit der die Proben für die HPLC-UV-Detektion ausreichend aufkonzentriert und gereinigt werden, um DON eindeutig nachzuweisen.
Für die Matrices Blut und Harn kann auf eine Vorreinigung verzichtet werden. Komplexere Matrices wie Galle oder Kot jedoch müssen vorgereinigt werden. Die Wiederfindungsraten über das gesamte Verfahren liegen zwischen 75 und 90 %. Als Nachweisgrenzen für die DON-Bestimmung aus Blut und Harn werden ~ 10 ppb und aus Galle und Kot ~ 20 ppb erreicht.

Bildung von Fumonisinartefakten in thermisch behandelten Lebensmitteln

W. Seefelder, H.-U. Humpf
Universität Würzburg, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, 97074 Würzburg

Die Fumonisine sind eine Gruppe von Mykotoxinen, die hauptsächlich von *Fusarium moniliforme* gebildet werden und vorwiegend in Mais zu finden sind. Ihr bedeutendster Vertreter, das Fumonisin B_1 (FB_1), ist als Kontaminante in Maisprodukten weit verbreitet und besitzt nach neuesten Untersuchungen kanzerogene Eigenschaften [1]. Da Maismehl und -grieß bei der industriellen Herstellung verschiedener Lebensmittel in großen Mengen verarbeitet werden, ist die Kenntnis des Reaktions- und Stabilitätsverhaltens der Fumonisine während der Verarbeitungsprozesse eine entscheidende Voraussetzung für die Einschätzung des Verbraucherrisikos. Neben dem hydrolysierten Fumonisin B_1 (HFB_1), das vorwiegend nach Hitze- und Alkalibehandlung (z.B. Nixtamalisation) von Maismehl auftritt und in verarbeiteten Lebensmitteln wie z.B. Knabberartikeln zu finden ist [2], wurde kürzlich N-Carboxymethyl-Fumonisin B_1 (NCM-FB_1) als Reaktionsprodukt mit reduzierenden Zuckern beschrieben [3]. Ziel unserer Arbeiten war es, die Bedeutung von NCM-FB_1 in thermisch behandelten Lebensmitteln zu untersuchen.



FB_1: R_1 = TCA, R_2 = H, **HFB_1**: R_1 = TCA, R_2 = H, **NCM-FB_1**: R_1 = TCA, R_2 = CM

Basierend auf der Kopplung der Hochleistungsflüssigchromatographie mit der Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) wurde zunächst ein Verfahren zur Erfassung von NCM-FB_1 neben FB_1 und HFB_1 entwickelt [4]. Die Quantifizierung erfolgte dabei durch den Einsatz der Isotopenverdünnungsanalyse mit isotopenmarkiertem FB_1-D_6 als Standard. Weiterhin wurden Modellstudien mit FB_1 kontaminiertem Maismehl (FB_1: 2 mg/kg) durchgeführt. Das dotierte Maismehl wurde mit 5% Glucose oder Saccharose versetzt und unter industriellen Bedingungen – wie sie bei der Lebensmittelverarbeitung eingesetzt werden – zu Heisextrudaten verarbeitet. Der Gehalt an NCM-FB_1, FB_1 und HFB_1 in den erhaltenen Proben wurde in Abhänigkeit verschiedener Extrusionsparameter (Temperatur, Feuchtigkeit, Drehzahl) bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Bildung von NCM-FB_1 – bis auf eine saccharosehaltige Probe – auf die glucosehaltigen Proben beschränkt ist. Ein hoher Feuchtigkeitsgehalt (20%) und eine hohe Temperatur (180°C) begünstigen die Bildung von NCM-FB_1 [4]. Die Konzentrationen an NCM-FB_1 in den Heissextrudaten sind mit maximal 100 µg/kg, bei einer FB_1-Kontamination von 2 mg/kg, als gering einzustufen und lassen den Schluss zu, dass die Bildung von NCM-FB_1 von geringer Bedeutung für FB_1-kontaminierte Maisprodukte ist. Dies ergaben auch die Untersuchungen von maishaltigen Lebensmittelproben (NCM-FB_1: 10-76 µg/kg).

Literatur

[1] NTP Studie (1999) NIH Publication Nr. 99-3955, National Institutes of Health.
[2] Hartl M, Humpf H-U (1999) J Agric Food Chem 47: 5078-5083.
[3] Howard PC, Churchwell MI, Couch LH, Marques MM, Doerge DR (1998) J Agric Food Chem 46: 3546-3557.
[4] Seefelder W, Hartl M, Humpf H-U (2001) J Agric Food Chem im Druck.

Entwicklung und Anwendung eines Enzymimmuntests zum Nachweis von hydrolysierten Fumonisinen

Zimmer, I., Dietrich, R., Usleber, E., Märtlbauer, E., Schneider, E.**
Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Veterinärstr. 13, 80539 München
*Professur für Milchwissenschaften, Justus-Liebig-Universität Giessen
Ludwigstr. 21B, 35390 Giessen

Fumonisine (FB_x) werden durch gängige technologische Verarbeitungsprozesse bei der Lebensmittelherstellung üblicherweise nicht inaktiviert. Bei bestimmten Verarbeitungstechniken wie Extrusion und Nixtamalisation entstehen jedoch infolge der Abspaltung der Tricarboxypropan-Seitenketten hydrolysierte Fumonisine (HFB_x), deren toxikologische Bedeutung - insbesondere im Hinblick auf die karzinogene Eigenschaften - bislang widersprüchlich diskutiert werden.

Der Nachweis der HFB_x erfolgt in der Regel mittels chromatographischer Methoden. Um kostengünstig und ohne großen technischen Aufwand einen hohen Probendurchsatz ermöglichen zu können, wurde als Alternative ein direkter kompetitiver Enzymimmuntest basierend auf polyklonalen Antikörpern gegen HFB_1 entwickelt. Zur Herstellung der Immunreagenzien wurde HFB_1 mittels Glutaraldehyd an Keyhole Limpet Hemocyanin (Immunogen) bzw. reduktiver Alkylierung an Meerrettichperoxidase (enzymmarkiertes Antigen) gekoppelt. Es wurden drei Kaninchen immunisiert, bei allen konnte eine spezifische Immunantwort induziert werden.

Nach Optimierung des Testsystems lag die Nachweisgrenze für HFB_1 bei 0,25 ng/ml, der 50% Wert bei 1,2 ng/ml. Die Kreuzreaktion der Antikörper mit HFB_2 und HFB_3 betrug 4,3% bzw. 14,4%. Die entsprechenden originären Fumonisine zeigten keine Reaktivität im Testsystem (<0,1% Kreuzreaktion). Die Anwendbarkeit des Testsystems wurde bei Comflakes, Tortilla Chips und Nachos geprüft. Die Nachweisgrenze für HFB_1 lag bei 10 ng/g. Die mittlere Wiederfindungsrate für HFB_1/g in künstlich kontaminiertem Probenmaterial (50-250 ng/g) betrug 97%.

Diese Arbeit wurde gefördert durch das Bundesministerium für Gesundheit im Rahmen des Forschungsvorhabens „Fumonisinaufnahme des deutschen Verbrauchers".

Natural Occurrence of Aflatoxins in Feedstuffs and Milk of Dairy Farms in Assiut Province, Egypt.

Diefy A. Salem
Forensic Med. and Toxicology Dept., Faculty of Veterinary Medicine, Assiut University, Assiut, Egypt.

This study was carried to investigate the natural occurrence of total aflatoxins in feedstuffs and aflatoxin M_1 in raw milk of dairy farms in Assiut province to evaluate the hazardous effects of these toxins on animals and human. A total number of eighty-two representative feedstuff samples and eighty-five raw milk samples were collected from six dairy farms and two factories producing concentrate feedstuffs in Assiut province. All samples were obtained during the period from October 1999 to February 2000. Total aflatoxins in feedstuffs and aflatoxin M_1 in raw milk were analyzed by using ELISA technique.

All feedstuff samples were found to contain total aflatoxins with levels ranged between 2 - 60 ppb except six feed ingredient samples, which contained values lower than detection limit (1.75 ppb). Total aflatoxins mean value in all investigated dairy farm was 3.136 ± 0.96 ppb. Averages of the mean values of total aflatoxin ranged from 20.0-5.0 ppb in all investigated farms. Overall, four samples were exceeded the Egyptian maximum levels (20 ppb). The highest value was found in cotton seed meal.

Aflatoxin M_1 was found in 58.8% of the investigated milk samples (50 samples). The concentrations of aflatoxin M_1 ranged from nd -15 ppt. The obtained results revealed that aflatoxin M_1 levels in analyzed milk samples didn't reach the maximum permissible limit applied by the EU countries (50 ng AFM_1/l milk). 16 samples out of 50 positive samples were exceeded the Swiss legal limits, which are the most restrictive in the world (10 ppt). Health hazards of aflatoxins were discussed.

Contamination of Marketed Raw and Ultra High-Temperature Treated Milk with Aflatoxin M_1 in Assiut City, Middle Egypt

A. Sh. Seddek[1] and D. A. Salem[2]
[1] *Forensic Med. & Toxicology Dept., Fac. of Vet. Med., South Valley Univ., Qena;*
[2] *Forensic Med. & Toxicology Dept., Fac. of Vet. Med., Assiut Univ., Assiut, Egypt.*

A total of 110 milk samples were tested for aflatoxin M1. Buffaloes and cows milk samples (30 each) were obtained from retail markets and 50-marketed ultra high-temperature treated (UHT) milk samples were collected also from Assiut City markets. Raw milk, full and low cream and skimmed UHT milk were obtained during Oct. 1999 to Feb. 2000.

AFM1 was detected using ELISA in 57 samples (51.82%) out of 110 milk samples. AFM1 had a range of 3.5 ng/l to 65 ng/l in marketed raw or UHT milk. No change in AFM1 levels was found after boiling of the highest five positive raw milk samples for 10 min.

This study revealed that all AFM1 mean values found in different milk sources were below the levels recommended by the commission of the European Community (50 ng AFM1/L) and USA FDA (500 ng AFM1/L). Altogether, 15 out of 110 analyzed samples (13.64%) of raw and UHT milk (5 buffaloes, 2 cows and 8 UHT) were exceeded the European recommended levels. 26.32% (15/57) of the individual positive samples exceeded the European limit for AFM1 and never exceeded the USA FDA limits. A total of 27 out of 57 positive samples (47.37%) had levels of AFM1 exceeding the Swiss legal limits, which are the most restrictive in the world (10 ppt). Health hazards of AFM1 in milk were also discussed.

Induction of Genotoxic Effects by Fusarium Toxins and Ochratoxin A in Human Derived Hepatoma (HEPG2) Cells.

Veronika Ehrlich[1], *Firouz Darroudi*[2], *Siegfried Knasmueller*[1]
[1] Institute of Cancer Research, University of Vienna, Borschkegasse 8a, A-1090 Vienna, Austria;
[2] Department of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis, Leiden University Medical Centre, Wassenaarseweg 72, 2333 AL Leiden, The Netherlands;

In this study we investigated the effects of three widespread mycotoxins namely ochratoxin A (OTA), fumonisin B_1 (FB_1), 15-acetyldeoxynivalenol (15-ADON) and other trichothecenes. OTA is formed by *Aspergillus ochraceus* and was found particularly in maize and wheat. It is devoid of activity in most *in vitro* genotoxicity assays but causes DNA-adducts in laboratory rodents; it is also well documented that OTA causes kidney tumors in rats and evidence is accumulating that it is carcinogenic in humans. FB_1 is formed by *Fusarium moniliforme* and is found primarily in maize products, it does not induce UDS in rat hepatocytes *in vivo* or *in vitro* or mutations in bacteria but long term studies indicated that it is a hepatocarcinogen in rats with initiating and promoting properties. 15-ADON, a derivative of DON, is formed by *Fusarium graminearum* and found in maize, corn and oats. No data on its genotoxicity/carcinogenicity are available but there is some indication for induction of oesophagial cancer in humans by exposure to *Fusarium graminearum* contaminated foods. We investigated the effects of the three compounds in the micronucleus (MN) assay with the human derived hepatoma cell line HepG2. All compounds were tested in the dose range between 25 and 200 µg/ml. The cells were exposed either for 1 h or for 24 h to the different mycotoxins. With all compounds there was clear evidence for induction of MN in both cell lines. OTA caused significant induction of MN under all conditions of test. Pronounced effects were already seen with the lowest concentration (25 µg/ml); increase of the exposure concentrations did not lead to a dose related increase of the MN frequencies. The lack of a dose response is probably due to delayed cell division at increased exposure doses. With FB_1, pronounced induction of MN (2,5-fold over the background) was seen in the HepG2 cells after 24 h exposure at the highest dose level. 15-ADON was by far more active than FB_1. In HepG2 cells a more than 2-fold increase was observed already with 25µg/ml after 24 hours, whereas with the 1 h treatment protocol, a similar effect was measured only with 200 µg/ml. In addition also results from preliminary experiments with other Trichothecene mycotoxins, namely T-2 toxin, deoxynivalenol and nivalenol are available which indicate that also these compounds are able to induce genotoxic effects in the human derived cells. Taken together our findings suggest that the different mycotoxins cause DNA-damage in human derived cells and thus might pose health hazards (in particular cancer risks) in exposed populations.

Untersuchungen unterschiedlicher Baumaterialien auf das Vorkommen von Schimmelpilzen und deren Mykotoxinen

Twarużek M.[1], *Grajewski J.*[1], *Składanowska B.*[1], *Janińska B.*[2], *Fischer G.*[3]
[1] Instytut für Biologie und Umweltschutz, Kazimierz Wielki – Bydgoszczer Akademii
Chodkiewicza-Str. 30, PL-85-064 Bydgoszcz
[2] Instytut für Baukonstruktionen, Poznaner Technische Hochschule
Piotrowo-Str. 5, PL-60-965 Poznań
[3] Institut für Hygiene und Umweltmedizin, Universitätklinikum der RWTH
Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen

Das Auftreten mikrobieller Kontaminationen im Gebäuden hängt wesentlich von der Temperatur, der Luftfeuchte sowie von der Temperatur der Baumaterialien ab. Eine Reihe von Schimmelpilzen, die auf kontaminierten Baumaterialen vorkommen können Mykotoxine produzieren. Zu den charakteristischen Pilzarten im Innenraum gehören Vertreter der Gattungen: *Cladosporium, Penicillium, Alternaria, Aspergillus, Mucor, Trichoderma, Ulocladium* und *Stachybotrys*. Die Konzentration der luftgetragenen Schimmelpilze sollte unter natürlichen Bedingungen, 10^2 – 10^3KBE/100 cm^2 nicht überschreiten. Erhöhte KBE-Zahlen im Innenraum können die Gesundheit des Menschen beeinträchtigen. In den letzten Jahren ergaben sich Hinweise darauf, daß Symptome wie Allergie, Müdigkeit, Haut- und Schleimhautreizungen, Kopfschmerzen, Beschwerden der Atmungsorgane mit Belastungen durch Schimmelpilze einhergehen.
Durch das Hochwasser der Oder im Jahre 1997 in Südpolen wurden große Gebiete überschwemmt, auf denen anschließend Wohnpavillons errichtet wurden. Nach zwei Jahren führten ausgedehnte Kontaminationen dieser Gebäude mit Schimmelpilzen dazu, daß die Bewohner ausquartiert werden mußten. Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, den Grad der Besiedlung durch Schimmelpilze sowie eine Kontamination durch Ochratoxin (OTA) zu untersuchen.
Für die Untersuchungen wurden zwei Pavillons ausgewählt. In den Pavillons war die Konfiguration von der Lüftung, dem Befeuchter, dem Substrat und den aufgetragenen Sporen abhängig. Nach einem Jahr wurden die Wände und Baumaterialien in den Versuchspavillons auf eine Besiedlung durch Schimmelpilze und den Gehalt an Ochratoxin A untersucht. Die Schimmelpilze wurden nach Arten differenziert. Darüber hinaus wurden die Proben mittels eines Zytotoxizitättests (MTT assay) untersucht. In allen Tapetenproben wurde OTA festgestellt. Die höchste Konzentration wiesen mit 2,69 und 2,74 ppb die Tapeten aus dem feuchten Pavillon auf. In den trockenen Pavillons wurden 0,14 bis 0,61 ppb OTA gefunden. Auf den Wänden aus Karton- und Gipsplatten des Versuchspavillons war die Konzentration der Schimmelpilze höher als auf anderen Versuchsflächen. Im Falle der Küche und eines Zimmers wurde ebenfalls eine OTA Kontamination festgestellt. In den stichprobenartig ausgewählten Pavillons war der Schimmelpilzbefall (KBE/100 cm^2) ebenfalls sehr hoch (10^5 – 10^7), es wurde jedoch kein OTA festgestellt. Eine Bonitur des prozentualen Anteils verschiedener Pilzarten auf Tapeten, Karton- und Gipsplatten ergab eine Reihe von Arten, wobei in jeder Probe *Cladosporium* spp. und *Penicillium* spp. vorherrschten. Ein interessantes Ergebnis stellten Wandproben mit einem Anteil von 90 % *Ulocladium* sp. sowie die mit *A. flavus* kontaminierte Tapete dar. Es wurde ebenfalls festgestellt, dass sich auf den Versuchstapeten die Arten *Penicillium* und *Aspergillus* entwickelten, obwohl diese Materialien ursprünglich nicht mit den Pilzarten kontaminiert waren.

Roquefortin-C in Silagen aus Landschaftspflegegut [1]

Christine Idler, Klaus-Josef Schmerbauch
Institut für Agrartechnik Bornim e.V., Max-Eyth-Allee 100, D-14469 Potsdam

In der extensiven Grünlandwirtschaft und in der Landschaftspflege fällt rohfaserreiches Futter in großen Mengen an. Silagen aus diesem Material verschimmeln häufig während der Lagerung. Im Institut für Agrartechnik Bornim wurden Grenzbedingungen von Lagerungsdichte und äußerer Luftabschlussgüte zur Erzeugung verfütterungswürdiger Silagen aus solchem Grüngut erarbeitet.

Methoden
Mittels Rundballen- und einer Compaktrollenpresse wurden zwischen 1995 und 1997 165 Ballen bzw. Compaktrollen unterschiedlicher Lagerungsdichte (ca. 180 bzw. 300 kg TS/m^3) aus trockensubstanzreichem Landschaftspflegegut (Gras-Klee-Gemisch) erzeugt. Verschiedene Luftabschlussgüten der Ballen konnten durch unterschiedliche Anzahl von Folienlagen (2-8) erreicht werden. Nach der Lagerung im Freien (2-6 Monate) wurden die Ballen geöffnet und Gärqualität, Pilzwachstum sowie Gehalt an Roquefortin -C ermittelt.
Die Messung des Roquefortin-C - Gehaltes wurde nach einer modifizierten Methode nach ARMBRUSTER, 1994 unter folgenden Bedingungen vorgenommen: Vorsäule: LiChrospher 100 RP 18,5 µm, 25 X 4 mm, MERCK, HPLC-Säule: LiChrospher 100 RP 18,5 µm, 250 X 4 mm, MERCK, Eluent: Methanol/ Wasser (70:30) + 5,75 g/l Ammoniumdihydrogenphosphat; Flussrate: 1,0 ml/ min; Detektion: UV 328 nm.

Ergebnisse
Roquefortin-C konnte in nahezu allen Silagen unabhängig von der Lagerungsdichte, der Folienlagenzahl sowie der Pilzkeimzahl nachgewiesen werden.
Die Bildung wurde im Wesentlichem vom Anwelkgrad bzw. des Trockensubstanzgehalt der Silagen beeinflusst. Bei Trockensubstanzgehalten bis 45 % konnten in 88% der Silagenproben Roquefortin-C nachgewiesen werden, allerdings lagen die Gehalte unter 0,5 mg/kg TS. Im Trockensubstanzbereich zwischen 45% und 55 % waren nur 10% der Proben Roquefortin-C positiv, die Werte lagen im Bereich der Nachweisgrenze von 50 ng/kg TS. Bei Trockensubstanzgehalten über 55% konnte in keiner Probe mehr Roquefortin-C nachgewiesen werden.
Der **Gehalt an Hefen und Schimmelpilzen** wurde mit zunehmender Lagerungsdichte und höherer Folienlagenanzahl reduziert. Ab 6 Folienlagen waren alle Compaktrollen weitgehend unverschimmelt.
Die **Gärqualität** , eingeschätzt nach dem DLG-Bewertungsschlüssel von 1992 mit der Ergänzung von 1997, differierte stark in Anhängigkeit vom Trockensubstanzgehalt. In Bereichen unter 40% TS war das Gut nicht ausreichend angewelkt und es wurden Silagen schlechter Qualität (Noten fünf und vier) erzeugt. In Bereichen zwischen 45% und 50% TS wurden bei hohem Luftabschluss (6 Folienlagen, 300 kg TS/ m^3) nahezu buttersäurefreie Silagen mit niedrigen pH-Werten erzielt. Die an diesen Parametern gemessene sehr gute Qualität wurde wegen zu niedriger Essigsäuregehalte nach dem DLG-Schlüssel abgewertet, so dass diese Silagen nur die Noten zwei und drei erreichten. Die Gärqualität der Rundballen konnten nur mit der Note vier bewertet werden. In TS-Bereichen über 50% wurden generell buttersäurefreie Silagen erzeugt. Die Fermentation war bei diesen Trockensubstanzgehalten infolge der geringen Wasseraktivität gering, so dass hier hohe pH-Werte und geringe Essigsäuregehalte wieder zu Punktabzügen führten und diese Silagen nur mit den Noten drei und vier bewertet werden konnten.
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei ausreichend hoher Lagerungsdichte (ca. 300 kg TS/ m^3) und 6 Folienlagen im TS-Bereich zwischen 40% und 50% verfütterungswürdige Silagen aus Landschaftspflegegut erzeugt werden können. Die ermittelten Gehalte an Roquefortin-C sind bei der Verfütterung an Wiederkäuer als unkritisch einzuschätzen.

1) gefördert durch die Deutsche Stiftung Umwelt
Die Dissertation ist zu finden unter: http://dochost.rz.hu-berlin.de/listen/dissertationen/agrar-gesamt.html

Mycotoxine contamination in grain and animal food in Turkey

Haydar Özpınar, Tanay Bilal, Can Kutay, İsmail Abaş
Inst. f. Tierernährung und ernährungsbedingte Krankheiten der Vet. Med. Fak. Istanbul

In Turkey, mycotoxin contaminations, especially fusarium toxins, are major problem and there no enough studies about this problem. Animal and human health have been threaten by mycotoxins. So, it's result in decreasing the animal performance and economical losses.
In this study, we determined the mycotoxin contamination levels of many cereals and poultry feeds. In our study, 240 cereals and 80 poultry feeds samples were examined and the ELISA-test method was used for analysing of samples. In reaping season of year 1999 and 2000, high mycotoxin levels, especially fusariun toxins, ZEA, DON, were determined in samples (wheat, corn, barley, oats, soya and sunflower pulp). At the end of this study, it was determined that mycotoxin levels and contaminations of cereals and poultry feeds were variable according to rainfall regymes of reaping year.

Biodegradation of mycotoxins – survey of our experiments

[1]*J. Böhm,* [1]*E. Razzazi,* [2]*J. Grajewski,* [3]*I. Styriak*
[1] Institut für Ernährung / Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1 / A-1210 Wien / Josef.Boehm@vu-wien.ac.at
[2] Department für Biologie und Umweltschutz / Pädagogische Universität
Chodkiewicza 30 / 85-064 Bydgoszcz / Polen
[3] Institut für Tierphysiologie
Slowakische Akademie der Wissenschaften, Soltesovej 4-6, 04001 Kosice, Slowakei

Several biodegradation experiments were carried out using different microorganisms *in vitro*. Fumonisin B disappearance was found in cultures of *Fusarium moniliforme* when *Lactobacillaceae* strains were added. Several specific yeast types were able to degrade mycotoxins such as nivalenol, deoxynivalenol, zearalenone and fumonisin B *in vitro*. Zearalenone was degraded also by some *Lactobacillaceae* strains, however, the percentage biodegradation was not as high effected by yeast metabolites. Stomach and gut content of chickens degraded standard ochratoxin A *in vitro*. The addition of several probiotic feed additives (Polish) did not improve the efficiency of degradation. Moreover, some strains of *Lactobacillaceae* and yeasts were capable of preventing fumonisin production when they were present in the medium together with the *Fusarium moniliforme* strain.
There is a considerable interest in finding ways for the effective prevention of mycotoxins development and to find procedures to degrade mycotoxins by employing the use of natural occurring microbes and/or their enzymes. In our opinion, the best microbial candidates should be GRAS (general recognized as save) organisms such as the bacteria *Lactobacillaceae* or yeasts, i.g. *Saccharomyces cerevisiae,* which are commonly used in several probiotic preparations for humans as well as for animals. However, it is important to find strains which possess good biodegradation capacity. For these reasons we have concentrated investigations to microorganisms that have useful properties for animals, i.g. lactic acid or bacteriocins production, adherence to mucin and to cells of intestinal epithelium, etc., which would work in synergism with their mycotoxins degradation ability.
In this regard, it should be noted that the rumen presents another area of special interest. For example, there exists in the rumen an incredible production of potential microorganism which are potentially capable of converting mycotoxins to less toxic products. Feeding trials with sheep with sterigmatocystin have demonstrated the high detoxifying capacities of the rumen . With the use of an artificial rumen system i.g. RUSITEC (rumen simulation technique) it is possible to test mycotoxin degradation without the need of expensive animal feeding trials. As an example, trichothecene deoxynivalenol has been degraded more than nivalenol using RUSITEC technique.
It will be of considerable interest in the future, to specifically focus on biological agricultural farming techniques and procedures. A combination of natural feed additives, GRAS microorganism, enzymes and good farming practices should be of help in solving many mycotoxin problems.

Biodegradation von Ochratoxin A in vivo durch Fütterung von *Lactobacillus bulgaricus* in Kücken

J. Grajewski [1], J. Boehm[2], M. Twarużek [1], K. Szczepaniak [1], C. Rosenkranz [2], E. Razzazi [2]
[1]Institut für Biologie und Umweltschutz, Kazimierz Wielki – Bydgoszczer Akademii
Chodkiewicza-Str. 30, PL-85-064 Bydgoszcz
[2]Institut für Ernährung, Veterinärmedizinische Universität,
Veterinärplatz 1, A-1210 Wien

Ochratoxin A gehört zu den bekanntesten Vertretern der Mykotoxine und wird häufig in landwirtschaftlichen Rohstoffen und Erzeugnissen nachgewiesen. OTA weist eine ausgeprägte Nephrotoxizität auf. Besondere immunsuppressive Wirkung wurde beobachtet, wenn OTA gemeinsam mit Citrinin vorkommt. Die nephrotoxischen Eigenschaften von OTA wurden in mehreren Untersuchungen bestätigt. Eine kanzerogene Wirkung wird diskutiert. Eine ganze Reihe von Untersuchungen hatten gezeigt, dass OTA für junge Geflügel stark toxisch ist und sein „Cars Ober" eine Gefahr für die Menschen darstellt.
Die in den letzten Jahren durchgeführten Versuche mit Adsorptionspräparaten, die OTA binden können brachten keine positiven Ergebnisse. Eine alternative für die Detoxifikation des Toxins stellt die Biodegradation dar, welche in letzter Zeit an Bedeutung gewonnen hat. In „in vitro" Untersuchungen konnten wir feststellen, dass in Anwesenheit von *L. bulgaricus* 171/2, OTA zu 70 bis 90 % degradieren kann.
Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob *L. bulgaricus* 171/2 eine Reduktion von OTA im Verdauungstrakt der Küken bewirken kann. In einem Versuch mit männlichen Legemischlingen (Lohman Brown, 4 Gruppen von jeweils 10 Küken) wurden die Lebendmassezunahme, Menge der aufgenommenen Futtermittel und der ausgeschiedenen Exkremente festgestellt. Als Kontrollfuttermittel wurde Alleinfutter Kückenstarter mit und ohne einem Zusatz von Bakterien (*L. bulgaricus* 171/2) verwendet. Die erste Versuchsgruppe wurde mit einem 0,5 ppb OTA kontaminieten Futtermittel gefüttert und die zweite Versuchsgruppe erhielt das gleiche Futtermittel unter Zusatz der Milchsäurebakterien. Für die Rationszusammensetzung des natürlich kontaminierten Futtermittels wurde ein mit *P. verrucosum 140* befallener Weizen verwendet. Nach der Schlachtung aller Tiere, wurden Blutproben gesammelt und Körperorgane untersucht. Die Nieren wurden histopathologischen Untersuchungen unterzogen. Es wurde die OTA–Konzentration in verwendeten Futtermitteln, im Kot, in den Nieren, in der Leber und im Blutplasma bestimmt. Die Extraktion und die Ausarbeitung der Proben wurden mittels OchraPrep–Säulen (Rhone-Diagnostic) durchgeführt und OTA mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion bestimmt.
Die Ergebnisse in der kontaminierten Versuchsgruppe (OTA kontaminiert ohne *L. bulgaricus*) zeigten eindeutig toxische Effekte auf die Kücken. Eine Verbesserung der Nierenschädigung in der pathohistologischen Untersuchungen konnte in der Versuchsgruppe (OTA kontaminiert mit *L. bulgaricus*) beobachtet werden. Hingegen konnte kein Unterschied hinsichtlich der Lebendmassezunahmen, der Organe und „carry over" des Toxins in den Organen, Plasma und Ausscheidung im Kot festgestellt werden.

Deoxynivalenol in Teigwaren: Gehalte in rohen und gegarten Nudeln

I. Bockhorn, A. Bockhorn und S. Pohler
SOFIA GmbH, Rudower Chaussee 29, D-12524 Berlin

Der Gehalt an Deoxynivalenol (DON) wurde mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion sowie mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie in Proben aus dem Berliner Einzelhandel (gekauft im April und Mai 2001) bestimmt.

Um die Belastung des Verbrauchers mit DON beurteilen zu können, ist der DON-Gehalt der Rohware wenig hilfreich. Daher haben wir die deutlich belasteten Proben gegart und den Gehalt an DON in den anschließend getrockneten Proben bestimmt. Um Aussagen zum Verbleib des Mykotoxins treffen zu können, haben wir zusätzlich das Kochwasser untersucht.

Hierbei zeigte sich, dass in den gegarten, getrockneten Nudeln und im Kochwasser je etwa 20-40% des DON-Gehaltes der Rohware gefunden werden. Circa 20% des DON werden durch den Kochprozess offensichtlich abgebaut.

TEILNEHMER/INNEN

Dr. Adam, Gerhard: adam@evz2.boku.ac.at; BOKU, Zentrum f. Angewandte Genetik, Muthgasse 18/05/66 A-Wien

Dipl. Ing. Aichner, Heinz: aicher@stamag.at; STAMAG Stadlauer Malzfabrik GmbH, Smolagasse 1B A- Wien

Prof. Dr. Anklam, Elke : elke.anklam@jrc.it; European Commission, Dg Joint Research Centre, Inst. For Health and Consumer Protection, TP 260 I- Ispra

Dipl. Tzt Ashur, Namrud: -; , Rüdiger Str. 40 A-3380 Pöchlarn

Dr. Badegruber, : bodlak.hr@aon.at; Tierärzte-Team Dr. Bodlak & Dr. Badegruber, Willersdorf 16 A-5143 Feldkirchen/Matinghofen

Herr Bata, Arpad: drbataa@mail.matav.hu; Dr Bata LtD, H-2364 OCSA Pesti

Herr Bauer, Günther: guenther.bauer@lbp.bayern.de; Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, (LBP), Vöttinger Str. 38 D-85354 Freising

Dr. Behn, Christian: mehren@abimed.de; ABIMED Analysen-Technik GmbH, Raiffeisenstr. 3 D-40764 Langenfeld

Dipl. Ing. Besenhofer, Gottfried: gottfried.besenhofer@bfl.gv.at (bfl.at); BA und FZ f. Landwirtschaft, Inst. F. Phytomedizin, Spargelfeldstr. 191 A- Wien

Dr. Binder, Eva-Maria: eva-maria.binder@biomingti.com; Biomin GTI GmbH, Industriestr. 21 A-3130 Herzogenburg

Dr. Binder, Johann: hannes.binder@biomingti.com; Biomin GTI GmbH, Industriestr. 21 A-3130 Herzogenburg

Frau Birzele, Barbara: b.birzele@uni-bonn.de; Inst. f. Pflanzenkrankheiten, Abt. Landwirtschaftl. u.-Lebensmittelmikrobiologie, Meckenheimer Allee 168 D-53115 Bonn

Dr. Bockhorn, Inka: ibockhorn@sofia.fta-berlin.de; SOFIA GmbH, Rudower Chaussee 29 D-12489 Berlin

Dr. Bodlak, Herbert: bodlak.hr@aon.at; Tierärtzt-Team Dr. Bodlak & Dr. Badegruber, Willersdorf 16 A-5143 Feldkirchen/Matinghofen

Ing. Dr. Böhm, Josef: josef.boehm@vu-wien.ac.at; VUW, Institut für Ernährung, Veterinärplatz 1 A-1210 Wien

Dipl. Ing. Bonk, Christina: bonk@loel.hs-anhalt.de; Prof. Hellriegel - Institut e.V., Arbeitsgruppe Bioanalytik, Strenzfelder Allee 28 D-06406 Bernburg

Dr. Bracher-Schrödl, Karin: KarinBacherSchroedl@bwb.org; Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Berlin, Laborabt. II, Scharnhorststr. 14 D- Berlin

Herr Brockmeyer, Andreas: andreas.brockmeyer@clua.cvuatu.bwl.de; Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt, Hedinger Str. 2/1 D-72488 Sigmaringen

Ing. Brunner, Jutta: jutta_brunner@waters.com; Waters GesmbH, Hietzinger Hauptstr. 145 A-1130 Wien

Frau Bujara, Ingrid: ingrid_bujara@sgsgroup.com; SGC Natec Institut, Behringerstr. 154 D- Hamburg

Herr Busch, Bernhard: berndbusch@hotmail.com; BOKU, Zentrum für Angewandte Genetik, Muthgasse 18 A-1190 Wien

Mag. Cecon, Brigitte : -; VUW, Inst. für Ernährung, Veterinärplatz 1 A-1210 Wien

doc. Ing. Cermak, Bohuslav: cermak@zf.jcu.cz; University of South Bohemia, Faculty of Agriculture in Ceske Budejovice, Studentska 13 CZ-370 05 Ceske Budejovice

Dr. Christall, Birgit: birgit.christall@milupa.de; Central Laboratories Friedrichsdorf GmbH, Residue Division, Bahnstr. 14-30 D- Friedrichsdorf

Frau Collingro, Claudia: ergo.umwelt@t-online.de; ERGO Forschungsgesellschaft MBH, Geierstr. 1 D-22307 Hamburg

Dr. Curtui, Valeriu Gheorghe: vcurtui@yahoo.com (Valeriu.Curtui@vetmed.uni-giessen.de); Professur für Milchwissenschaften, Ludwigstr. 21 D-35390 Giessen

Prof. Czerwiecki, Ludwik: czerwiecki@ibprs.pl; Institute of Agricultural and Food Biotechnology, Dept.of Food Analysis, Rokwiecka 36 Pl-02 - 532 Warsaw

Dr. Dänicke, Sven: sven.daenicke@fal.de; FAL, Institut f. Tierernährung, Bundesallee 50 D-38116 Braunschweig

Prof. Dr. Degen, Gisela H.: degen@arb-phys.uni-dortmund.de; Inst. für Arbeitsphysiologie an der Univ. Dortmund, Ardeystr. 67 D- Dortmund

Frau Diehl, Yvonne: Transia@t-online.de; Transia GmbH, Abt. Qualitätssicherung, Dieselstr. 9A D- Ober-Mörten

Dr. Dietrich, Richard: r.dietrich@mh.vetmed.uni-muenchen.de; Lehrstuhl f. Hygiene und Technologie der Milch, LMU München, Veterinärstr. 13 D-80539 München

Frau Dillenburger, Tanja: Dillenbu@uni-hohenheim.de; Uni Hohenheim, Institut f. Tierernährung (450), Emil-Wolff-Str. 10 D-70599 Stuttgart

Herr Doko, Bruno: B.Doko@iaea.org; IAEA, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Wagramer Str. 5, P.O. Box 100 A-11400 Wien

Frau Döll, Susanne: Susanne.Doell@fal.de; Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierernährung, Bundesallee 50 D- Braunschweig

DI Doppelreiter, Franz: Doppelr@bfl.at; BA. U. FZ f. Landwirtschaft, Institut für Futtermittel, Spargelfeldstr. 191 A-1226 Wien

Frau Dorn, Eveline : ; Bundesamt für Lebensmitteluntersuchung und Lebensmittelforschung, Kinderspitalg. 15 A- Wien

Dr. Eggert-Bury, Kornelia: -; Zentrales Instut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr - Laborabteilung III, Kopperpahler-Allee120 D-24119 Kronshagen

Frau Ehrlich, Veronika: veronikaehrlich@hotmail.com; Institut f. Krebsforschung, Abt. Umwelttoxikologie, Barscgkeg. 8a A-1090 Wien

Frau Eisschiel, Helga: helga-eisschiel@baxter.com; VUW, II Med. Univ. - Klinik für Klauentiere, Veterinärplatz 1 A-1210 Wien

Dr. Ellner, Frank: f.ellner@bba.de; Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Königin - Luise - Str. 19 D-14195 Berlin

Dr. Engelhardt, Gabriele: gabriele.engelhardt@lfe.bayern.de; Bayerische Landesanstalt f. Ernährung, Menzinger Str. 54 D- München

Fr. Ewert, Marina: tllv.lsz@t-online.de; Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Tennstedter Str. 9 D-99947 Bad Langensalze

Herr Färber, Paul: paul.faerber@bfe.uni-karlsruhe.de; Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Inst. für Hygiene und Toxikologie, Haid- und - Neu - Str. 9 D-76131 Karlsruhe

Frau Faukal, Katharina: 9345103@bendomsrv.vu-wien.ac.at; -, Demergasse 3 A-2340 Mödling

Herr Fellinger, Alois: afellinger@noackgroup.com (office@noackwien.co.at); Noack & Co AG, Auhofstr. 190 A-1130 Wien

Dipl. Ing. Feriancova, Jana: propeka-trading@gtiner.sk; Propeka Trading s.r.o., Topolova 18 SK-811 04 Bratislava

Dr. Föllmann, Wolfram: foellmann@ifado.de; Institut f. Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund, Ardeystr. 67 D-44139 Dortmund

Dr. Fuchs, Elisabeth: efuchs@ifa-tulln.ac.at; Biomin GTI GmbH, Konrad Lorenz Str. 20 A- Tulln

Herr Gareeb, Khaled: -; VUW, Tierhaltung, Veterinärplatz 1 A-1210 Wien

Dir. U. Prof. Dr. Dr. Gareis, Manfred: gareis.baff@t-online.de; Institut für Mikobiologie und Toxikologie der Bundesanstalt für Fleischforschung, E.-C. -Baumannstr. 20 D-95326 Kulmbach

Prof. Dr. rer. nat. Gedek, Brigitte: wgedek@t-online.de; Sachverständige für Mikroökologie und Mykotoxinologie, Bergstr. 8 D-85737 Ismaning

Herr Geisen, Rolf: rolf.geisen@bfe.uni-karlsruhe.de; Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Haid - und - Neu Str. 9 D-76131 Karlsruhe

Prof. Dr. Gekle, Michael: michael.gekle@mail.uni-wuerzburg.de; Phsiologisches Institut der Universität Würzburg, Röntgenring 9 D-97070 Würzburg

Dr. sc. Göbel, Roswitha: IVPT-bernau@t-online.de; Inst. f. Veteriär-Pharmakologie und Toxikologie GmbH, Weißenseer Str. 36 D-16321 Bernau

Herr Goll, Michael: Michael.goll@cec.eu.int; Lebensmittel und Veterinäramt der Europäischen Kommision, Belfield Office Park, Beach Hill Road Ireland- Dublin

Minister Dr. Gomilanovic, Miodrag: Niroshi@magnet.at; Ministerium für Umweltschutz, "Vectra" YU-81000 Podgorica

Frau Goritschnig, Sandra: h9540383@edv1.boku.ac.at; BOKU, Zentrum f. Angewandte Genetik, Muthgasse 18/05/68 A- Wien

Dr. Grajewski, Jan: jangra@ab-byd.edu.pl; Akademia Bydgoska im. Kazimierza Wielkiego Instutut BiologII i Ochrony Srodowiska, ul Chodkiewicza 30 Pl-85 064 Bydgoszcz

Herr Grossmann, Werner: unipoint@swissonline.ch; unipoint ag, Langenmoos 9 CH-8467 Truttikon

Dr. Haas-Lauterbach, Sigrid: info@r-biopharm.de; R-Biopharm GmbH, Dolivostr. 10 D- Darmstadt

Ing. Haider, Michael R.: michael.haider@vu-wien.ac.at; VUW, Institut für Ernährung, Veterinärplatz 1 A-1210 Wien

Frau Hanschmann, Gudrun: Gudrun.Hanschmann@leipzig.lfl.smt.sachsen.de; Sächs. LA f. Landwirtschaft, FB 10, Gustav-Kühn-Str. 8 D-04159 Leipzig

Dr. Harbeck, Stefan: Stefan.harbeck@itmm.jrc.be; European Commission, Instut für Referenzmaterialien und Messungen, Rentieseweg B-2440 Geel

DI Heidler, Dian: heidler@ifa-tulln.ac.at; Biomin GTI GmbH, Konrad Lorenz Str. 20 A-3430 Tulln

Herr Heller, Martin: m.heller@bgvv.de; Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbrauerschutz und Veterinärmedizin, Nannburger Str. 96a D-07743 Jena

Dr. Hindorf, Holger: h.hindorf@uni-bonn.de; Universität Bonn, Institut f. Pflanzenkrankheiten, Nussallee 9 D-53115 Bonn

Dr. Hochsteiner, Werner: Werner.Hochsteiner@vu-wien.ac.at; UVW, II. Medizinische Klinik, Veterinärplatz 1 A-1210 Wien

Dr. Hüber, Marc: -; R-Biopharm GmbH, Dolivostr. 10 D- Darmstadt

Prof. Dr. Hulan, Bud: Regina.Kadi@vu-wien.ac.at; VUW, Institut für Ernährung, Veterinärplatz 1 A-1210 Wien

Dr. Idler, Christine: cidler@atb-potsdam.de; Inst. für Agrartechnik Bornim e.V., Abt. Bioverfahrenstechnik, Max - Erth - Allee 100 D- Potsdam

Vice Dean Dr. Ismail, Mohamed N.: ismail.mohamed@lycos.com; Faculty of Vet. Med. Qena, South Valley University, Egypt- Qena

Herr Janes, Wolfgang: janes@blt.bayern.de; Bayerische Landesanstalt f. Tierzucht, Prof. Dürrwaechterpl. 1 D- Poing-Grub

Frau Jenner, Katrin : SVLA_FFO@T-Online.de; Staatliches Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt , Ringstr. 1030 D- Frankfurt (Oder)

Mag. Jodlbauer, Justus: -; Universität Wien,Institut f. Analytische Chemie, Währinger Str. 38 A-1090 Wien

Dr. Jörissen, Urban: urban.Joerissen@wej.de; Dr. Wiertz, Dipl.- Chem. Eggert, Dr. Jörrisen GmbH, Stenzelring 14b D- Hamburg

Dr. Josephs, Rals: ralf.josephs@irmm.jrc.be; European Commission, Institute for Reference Materials and Measurements, Rentieseweg B-2440 Geel

Dipl. Biochemikerin Kabrodt, Kathrin: kabrodt@loel.hs-anhalt.de; Prof. Hellriegel - Institut e.V., Arbeitsgruppe Bioanalytik, Strenzfelder Allee 28 D-06406 Bernburg

Herr Kahlbacher, Hermann: hermann.kohlbacher@vu-wien.ac.at; VUW, II Med. Univ. - Klinik für Klauentiere, Veterinärplatz 1 A-1210 Wien

Mister Karlovsky, Petr: karlovpetr@phibred.com; Pioneer Wi-Bred, 7250 NW 62nd AVE USA-IA 50131-1552 Johnston

Dr Kastrup, Sebastian: sebastian.kastrup@wej.de; Dr. Wiertz, Dipl.- Chem. Eggert, Dr. Jörrisen GmbH, Stenzelring 14b D-21107 Hamburg

Frau Kleinova, Martina: a9401170@unet.univie.ac.at; Universität Wien, Institut f. Analytische Chemie, Währinger Str. 38 A-1090 Wien

Dr. Koeber, Robert: robert.koeber@irmm.jrc.be; European Commission, Institute for Reference Materials and Measurements, Rentieseweg B-2440 Geel

Dr. Kögler, Kurt: bestmix@nextra.at; Bestmix Tierernährung GmbH & Co KG, A- Hitzendorf 166/4

Dr. Köhler, Heike: h.koehler@bgvv.de; Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbrauerschutz und Veterinärmedizin, FB 4, Nannburger Str. 96a D-07743 Jena

Dr. Kombal, Ralph: ralph.kombal@lua-ol.wiedersachsen.de; Staatliches Lebensmitteluntersuchungsamt Oldenburg, Postfach 2462 D-26014 Oldenburg

Herr Kos, Gregor: gkos@IFA-Tulln.ac.at; IFA Tulln, Analytikzentrum, Konrad Lorenz Str. 20 A-3430 Tulln

Herr Kräft, Ronald: cmarquardt@alltech-bio.com; Alltech GmbH, Esmarchstr. 6 D-23795 Bad Segeberg

Dr. Kramer, Walter: kramer@lactosan.at; Lactosan Starterkulturen GesmbH, Industriestr. West 5 A- Kapfenberg

Dr. Kräutler, Oswald: kraeutl@baluf.gv.at; Bundesamt für Lebensmitteluntersuchung und Lebensmittelforschung, Kinderspitalg. 15 A- Wien

Univ.Prof.Dr. Krska, Rudolf: Krska@IFA-Tulln.ac.at; IFA-Tulln, Analytikzentrum, Konrad Lorenz Str. 20 A-3430 Tulln

Dr. Kruse, Sabine: sabine.kruse@bmvet.bund.de; BM für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, Rochusstr. 1 D-53 123 Bonn

Dr. Kühn, Imke: Imke.Kuehn@lah.de; Lohmann-Animal-Health GmbH & CoKG, Heinz-Lohmann-Str.4 D-27472 Cuxhaven

Dr. Kunz, Friedrich: office@stamag.at; STAMAG Stadlauer Malzfabrik GmbH, Smolagasse 1 A- Wien

Dr. Lackner, Oskar: lackner.dur@aon.at; Lackner Diagnostics & Ingredients, Weißes Kreuz-G. 19 A-2340 Mödling

Dr. Lassek, Eva: analytik.4@luas.bayern.de; Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheitswesen Südbayern, Veterinärstr. 2 D-85762 Oberschleißheim

Dr. Lauber, Uwe: lauber@uni-hohenheim.de; Uni Hohenheim, Institut f. Tierernährung (450), Emil-Wolff-Str. 10 D-70593 Stuttgart

Dr. Lebrun, Stefan: lebrun@ifado.de; Institut f. Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund, Ardeystr. 67 D-44139 Dortmund

Lehmann, H.: h.lehmann@bgvv.de; Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Thielallee 88-92 D- Berlin

Prof. Dr. Dr.h.c.mult. Leibetseder, Josef: josef.leibetseder@vu-wien.ac.at; VUW, Institut für Ernährung, Veterinärplatz 1 A-1210 Wien

Herr Leitner, Alexander: alchemist@netway.at; Universität Wien, Institut f. Analytische Chemie, Währinger Str. 38 A-1090 Wien

Dr. Leitner, Sonja: -; , Bahnhofstr. 27/1 A-4100 Ottensheim

Dr. Lepschy, Johann: Johann.Lepschy@lbp.bayem.de; Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Vöttinger Str. 38 D- Freising

Herr Lettner, Hans: lettner@lactosan.at; Lactosan GmbH, Industriestr. West 5 A- Kapfenberg

Dr. Lew, Hans: Lew@agrobio.bmlf.gv.at; BA für Agrarbiologie, Wieningerstr. 8 A-4020 Linz

Frau Lienemann, Kerstin : k.lienemann@uni-bonn.de; Universität Bonn, Institut f. Pflanzenkrankheiten, Nussallee 9 D-53115 Bonn

Dr. Lintschinger, Josef: balu.salzburg@aon.at; Bundesanstalt für Lebensmitteluntersuchung in Salzburg, Schopperstr. 13 A-5020 Salzburg

Herr Lobeck, Klaus: klaus.lobeck@coring.de; Corine Sytem Diagostix GmbH, Robert-Bunsen Str. 4 D-Gernsheim/Rhein

DI. Dr. Lückl, Johannes: balugraz@aon.at; BA für Lebensmitteluntersuchung Graz, Beethovenstr. 8 A-8010 Graz

Chemiedirektor Majerus, Paul: paul.majerus@cva-tr.rlp.de; Landesuntersuchungsamt, Inst. Für Lebensmittelchemie, Maximineracht 11a D- Trier

Dr. Malir, Frantisek: xeno-khs hrk@telecom.cz; Dept. of Xenochemistry, National Reference Laboratory for Biomarkers of Mykotoxins, Regional Hygiene Station, Hradec Kralov , Nezvalova 958 CZ-500 02 Hradec Kralove

Dr. Marino, Petracco: Marino.Petracco@illy.it; ILLYCAFFE' S.p.A., Via Flavia, 110 I- Trieste

Ing. Marinz, Brunhilde: post.lua@ktn.gv.at; Lebensmitteluntersuchungsamt Kärnten, Lastenstr. 40 A-9020 Klagenfurt

Herr Martin, Prüller: m.prueller@rwa.at; RWA-Raiffeisen Ware Austria, Wienerbergstr. 3 A-1100 Wien

Prof. Dr. Märtlbauer, Erwin: e.maertlbauer@mh.vetmed.uni-muenchen.de; Universität München, Lehrstuhl f. Hygiene und Technologie der Milch, Veterinärstr. 13 D- München

Prof. Dr. Matissek, R.: lci-koeln@lci-koeln.de; LCI des Bundesverband der Deutschen Süsswarenindustrie e.V., Adamstr. 52-54 D-51063 Köln

Dr. Matthiaschk, Gunther: g.matthiaschk@bgvv.de; Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Thielallee 88-92 D- Berlin

Dr. Matthies, Anette: annette.matthies@basf-ag.de; Agrarzentrum derBASF-AG, Carl-Bosch-Str. 64 D-67117 Limburgerhof

Fr. Matthies, Inge: matthies@uni-hohenheim.de; Institut f. Phytomedizin, Universität Hohenheim, Otto-Sander-Str. 5 D-70593 Stuttgart

Dr. Mazelle, Eduard: dr.mazelle.gmbh@lion.cc / unipoint@swissonline.ch; unipoint ag, Langenmoos 9 CH-Truttikon

Frau Meier, Anja : a.meier@uni-bonn.de; Universität Bonn, Institut f. Pflanzenkrankheiten, Nussallee 9 D-53226 (?53115) Bonn

Fr. Meindl, Tanja: T.meindl@manner.com; Josef MANNER u. Comp. AG, Wilhelminenstr. 6 A-1170 Wien

Frau Meister, Ute: u_meister@igv-gmbh.de; IGV GmbH, Arthur-Scheuner-Allee 40/41 D-14558 Bergholz-Rehbrücke

Dr. Meyer, Karsten: karsten.meyer@flg.tum.de; TU München, Lehrstuhl für Tierhygiene, Weihenstephaner Berg 3 D-85350 Freising

Dipl. Spec. Tox. Chem. Misurovic, Ana: juceti@cg.yu; PI-Centers for Ecotoxicological Research of the Republic of Montenegro, Put Radomira Ivanovica 2 YU-81000 Podgorica

Dipl. Ing. Müller, Birgit: mueller@lctech.de; LCTECH GmbH, Bahnweg 41 D- Dorfen

Dr. Müller, Marina: mmueller@zalf.de; ZALF Müncheberg, Institut für Primärproduktion und Mikrobielle Ökologie, Gutshof 7 D- Paulinenaue

Fr. Nadubinska, Miriam: mnadu@ifa-tulln.ac.at; IFA-Tulln, Analytikzentrum, Konrad Lorenz Str. 20 A-3430 Tulln

Herr Nikolic, Rodoljub: Niroshi@magnet.at; Niroshi GmbH, Salztorgasse 8 A-1010 Wien

Frau Nitsch, Sabine: sabine.nitsch@biomingti.com; Biomin GTI GmbH, Industriestr. 21 A-3130 Herzogenburg

Herr Noviandi, Cuk Tri: noviandi@eudoramail.com; Department of Animal Nutrition and Feed Science, Faculty of Animal Science, Gadjah Mada University, Jl. Agro, Karangmalang Indonesien-55281 Yogyakarta

Dr. Oldenburg, Elisabeth: elisabeth.oldenburg@fal.de; FAL, Institut für Pflanzenbau und Grünlandwirtschaft, Bundesallee 50 D-38116 Braunschweig

Omondi, Chrispine: ; Coffee Research Fondation (CRF), Kenya- Ruiru

D.V.M., PhD. Ostry, Vladimir: ostry@chpr.szu.cz; National Institute of Public Health, Centre for Hygiene of Food Chains, Palackeho 1-3 CZ-612 42 Brno

Prof. Dr. Özpinar, Haydar: hozpinar@istanbul.edv.tr; Universität Istanbul, Institut für Tierernährung und ernährungsbedingte Krankheiten, Zootekni ve Hayvan Besleme Bölümü TR-34851 Avcilar/Istanbul

Frau Pallaroni, Lea: lea.pallaroni.jrc.it; European Commission, Inst. For Health and Consumer Protection - FPU, Fermi I- Ispra

Hr. Pammer, Hans Peter: hans.peter.pammer@eu.effem.com; Master Foods Austria GmbH, TR - Istanbul A-2460 Bruck/Leitha

Herr Papadopoulou-Bouraoui, Andri: andri.papadopoulou@jrc.it; European Commission, Dg Joint Research Centre, Inst. For Health and Consumer Protection, Via Enrico Fermi I- Ispra

Dr. Pechanek, Udo: up@lva.co.at; Zeitschrift "Ernährung/Nutrition", Blaasstr. 29 A- Wien

Frau Pelger, Christine: Azteam@hipp.de; Hipp - Werk Georg Hipp, Georg-Hipp-Str. 7 D-85276 Pfaffenhofen

Frau Persy, Ute: Ute.Persy@Milupa.de; Central Laboratories Friedrichsdorf GmbH, Bahnstr. 14-30 D-Friedrichsdorf

Dr. Perz, Ingrid: -; Fa. Schitnhofer, Kaindorf, A-8262 Ilz Nr. 57

Prof. Dr. Petzinger, Ernst: ernst.petzinger@vetmed.uni-giessen.de; Justus-Leipzig-Universität, Institut f. Pharmakologie & Toxikologie, Frankfurter Str. 107 D-35398 Gießen

Dr. Pichler, Harald: pichler@ifa-tulln.ac.at; Biomin GTI GmbH, Konrad Lorenz Str. 20 A-3430 Tulln

Herr Pieczonka, Klaus: Klaus.Pieczonka@erdinger.de; Privatbrauerei Erdinger Weißbräu, Franz - Bombach - Str. 1 D- Erding

Dr. Pietsch, Manfred: mpietsch@alltech-bio.com; Alltech GmbH, Esmarchstr. 6 D-23795 Bad Segeberg

Dipl. Ing. Poppenberger, Brigitte: h9240373@edv1.boku.ac.at; BOKU, Zentrum f. Angewandte Genetik, Muthgasse 18/05/68 A- Wien

Postupolski, Jacek: jpostupolski@pzh.gov.pl; National Institut of Hygiene, Department of Food Research, Uholimska 24 Pl-00 - 791 Warsaw

Herr Prange, Alexander: a.prange@gmx.de; Universität Bonn, Institut f. Pflanzenkrankheiten, Meckenheimer Allee 168 D-53115 Bonn

Dipl. Ing. Preining, Franz: Franz.preining@aon.at; Allg. Beeid. U. Ger. Zertif. Sachverständiger, Hörzingerstr. 58/12 A-4020 Linz

Dipl.-Chem. Prelevic, Danijela: Juceti@cg.yu; PI-Centers for Ecotoxicological Research of the Republic of Montenegro, Put Radomira Ivanovica 2 YU-81000 Podgorica

Mag. Pühringer, Sandra: sandrapuehringer@t-online.at; , Hauptplatz 33A A-4910 Ried i. I.

Mag. Rabus, Birgit: vetservice@vetservice.at; Biomin GTI GmbH, Industriestr. 21 A-3130 Herzogenburg

Dr. Rattenberger, Ernst: ernst.rattenberger@tgd.bayern.de; Tiergesundheitsdienst Bayern e.V., Senator-Gerauer-Str. 23 D-85586 Poing

Dr. Razzazi, Ebrahim: ebrahim.razzazi@vu-wien.ac.at; VUW, Institut für Ernährung, Veterinärplatz 1 A-1210 Wien

Herr Reisenbichler, Herbert: juergen.fetzer@tecan.com; TECAN Deutschland GmbH, Theodor-Storm-Str. 17 D-74564 Crailsheim

Dr. Reutter, Matthias: reutter@lufa-itl.de; LUFA-ITL, Gutenbergstr. 75-77 D- Kiel

Dr. Richter, Wolfgang: wolfgang.richter@blt.bayern.de; BLT. Grub SG 4.3, Prof. Dürrwachter-Platz 1 D-85586 Poing

Herr Ritscher, Martin: martin.ritscher@lua.sms.sachsen.de; Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen, Reichenbachstr. 71/73 D-01217 Dresden

Dr. Rosenkranz, Christine: chris.rosenkranz@vu-wien.ac.at; UVW, Inst. F. Histologie und Embryologie, Veterinärplatz 1 A- Wien

Dr. Rosner, Heino: Heino.rosner@bmvel.bund.de; BM f. Verbraucherschutz, Ernnährung und Landwirtschaft, Am Probsthof 78A D- Bonn

Dr. Roßlenbroich, Hans-Jürgen: hans-juergen.rosslenbroich.hr@bayer-ag.de; Bayer AG, Geschäftsbereich Pflanzenschutz, Landwirtschaftszentrum Monheim D- Leverkusen

Frau Ruttmann, Dieta: klaus-ruttmann@t-online.de; Klaus Ruttmann GmbH, European Sales Manager für VICAM, Rupertistr. 54 D-22609 Hamburg

Herr Ruttmann, Klaus: klaus-ruttmann@t-online.de; Klaus Ruttmann GmbH, European Sales Manager für VICAM, Rupertistr. 54 D-22609 Hamburg

DI Safer, Christina: csafer@rwa.at; RWA-Saatgut/Innovation u. Sortenentwicklung, Wienerbergstr. 3 A-1100 Wien

Dr. Saggau, Elke: u51421@ffm.ble.bund400.de; BA für Landwirtschaft und Ernährung, Adickesallee 40 D-60 322 Frankfurt / Main

Dr. Salem, Diefy A.: ; University of Assuit, Eqypt- Assuit

Dr. Sauvant, Christoph: christoph.sauvant@mail.uni-wuerzburg.de; Physiol. Inst. Der Univ. Würzburg, Röntgenring 9 D-97070 Würzburg

DI Schatzmayr, Gerd: schatzmayr@ifa-tulln.ac.at; Biomin GTI GmbH, Konrad Lorenz Str. 20 A- Tulln

Prof. Dr. rer. nat. Schellenberg, Ingo: schellenberg@loel.hs-anhalt.de; Prof. Hellriegel - Institut e.V., Arbeitsgruppe Bioanalytik, Strenzfelder Allee 28 D-06406 Bernburg

Herr Schmidt, Stefan: stefan.schmidt@clua.cvuatu.bwl.de; Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt, Hedinger Str. 2/1 D-72488 Sigmaringen

Herr Schneeberger, Eduard: Schneeberger@schaumann.at; H.W. Schaumann GmbH, Jakob-Fuchs-G. 25-27 A- Brunn am Gebirge

Dr. Schneider, Elisabeth: Elisabeth.Schneider@vetmed.uni-giessen.de; Justus-Leipzig-Universität, Proffessur für Milchwissenschaften, Ludwigstr. 21B D-35390 Giessen

Dr. Schneider, Jörg: Joerg.Schneider@rap.admin.ch; Eidgen. Forschungsanstalt f. Nutztiere, Rte de la Tioleyre 4 CH- Posieux

Dr. Schneweis, Isabell : Schneweis@gmx.de; TU München, Lehrstuhl f. Tierhygiene, Weihenstephaner Berg 3 D-85354 Freising

Dipl. Ing. Schreiner, Matthias: h8840822@edv1boku.ac.at; VUW, Institut für Ernährung, Veterinärplatz 1 A-1210 Wien

O. Univ. Prof. Dr. Schuh, Maximilian: Maximilian.Schuh@vu-wien.ac.at; UVW, II. Medizinische Klinik, Veterinärplatz 1 A-1210 Wien

Herr Schulz, Torsten: torteschu@gmx.de; Medizinische Universität Lübeck, Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene, Ratzeburger Allee 160 D-233538 Lübeck

Dr. Schuster, Manfred: manfred.schuster@blt.bayern.de; Bayerische Landesanstalt für Tierzucht, Prof. Dürrwaechter Pl. 1 D-85586 Poing

Dr. Schwerdt, Gerald: gerald.schwerdt@mail.uni-wuerzburg.de; Physiologisches Institut der Universität Würzburg, Röntgenring 9 D-97070 Würzburg

Frau Sebald, Renate: Azteam@hipp.de; Hipp - Werk Georg Hipp, Georg-Hipp-Str. 7 D-85276 Pfaffenhofen

Prof. Dr. Seddek, A. Sh.: ; University of Assuit, Eqypt- Quena

Ing. Sedy, Herbert: hsedy@vki.or.at; Verein für Konsumenteninformation, Linke Wienzeile 18 A-1061 Wien

Frau Seefelder, Walburga: seefeld@pzlc.uni-wuerzburg.de; Universität Würzburg, Inst. f. Pharmazie Lebensmittelchemie, Am Hubland D- Würzburg

Dr. Semar, Martin: martin.semar@central-europe.basf.org; BASF, Carl-Bosch-Str. 64 D- Limburgerhof

Dr. Senkpiel, Klaus: Klaus.Senkpiel@hygiene.ukl.mu-luebeck.de; Medizinische Universität Lübeck, Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene, Ratzeburger Allee 160 D-233538 Lübeck

Dr. Seresinho, Thakshala: seres@sltnet.lk; Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Ruhuna, Sri Lanka- Kamburupitiya

Dr. Siboe, George M.: siboe@yahoo.com; University of Nairobi, Department of Botany, P.O. Box 30197 Kenya-Nairobi

Dr. Siegl, Harald: Harald.siegl@vlr.gv.at (lmua@voradelberg.at); Lebensmitteluntersuchungsanstalt des Landes Vorarlberg, Montfortstrasse 4 A-6901 Bregenz

Simmler-Hübenthal, : h.simmler-huebenthal@sued-chemie.de; Süd Chemie AG, Abt. DA/RT-2, Ostenriederstr. 15 D-85368 Moosburg

Dr. Speakman, John-Bryan: john-bryan.speakman@basf-ag.de; BASF - AG, Agrarzentrum, APR/RF- Li 470, Carl- Bosch - Str. 64 D- Limburgerhof

Dr. Stamenitis, Stamatis: stamatis.stamentis@de.nestle.com; Nestle Deutschland AG, Werk Weiding - Labor, Menninger Str. 1 D-84570 Polling

Dr. Steinkellner, Siegrid: steinkel@edv1.boku.ac.at; BOKU, Inst. f. Pflanzenschutz, Peter Jordanstr. 82 A- Wien

Dr. Steinmüller, Rolf: steinmüller.rolf@bag-germany.com; BAG - Biologische Analysensystem GmbH, Amtsgerichtstr. 1-5 D-35423 Lich

Dr. Stocker, Stefan: -; Landesagenrur für Umwelt und Arbeitsschutz, Labor f. Lebensmittelanalysen, Ambi - Alagi - Str. 5 I-39100 Bozen

Herr Stroka, Jörg: joerg.stroka@jrc.it; European Commission, Dg Joint Research Centre, Inst. For Health and Consumer Protection, via Enrico Fermin, TP 260 I- Ispra

Dr. Styriak, Igor: styriak@mail2.saske.sk; Slovak Academy of Sciences, Institut of Animal Physiology, Soltesovej 4-6 SK-040 01 Kosice

Dipl. -Phys. Chem. Sukovic, Danijela: juceti@cg.yu; PI-Centers for Ecotoxicological Research of the Republic of Montenegro, Put Radomira Ivanovica 2 YU-81000 Podgorica

Dr. Swaczyna, Hubert: hubert.swaczynal@bags.hamburg.de; Hygiene Institut Hamburg, Abt. H 1/3, Marckmann Str. 129a D-20539 Hamburg

Dr. Taschan, Hassan: Taschan@T-Online.de; Staatliches Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Mittelhessen, Marburger Str. 54 D-35898 Gießen

Dr. Thalmann, Alfred: alfred.thalmann@lufa.bwl.de; Staatl. Landw. Untersuchungs- und Forschungsanstalt Augustenberg, Neßlerstr. 23 D- Karlsruhe

Fr. Thamhesl, Michaela: thamhesl@ifa-tulln.ac.at; IFA-Tulln, UT, Konrad Lorenz Str. 20 A-3430 Tulln

Dr. Theisen, Simone: sth@uni-hohenheim; Universität Hohenheim, Institut für Phytomedizin, Otto-Sander-Str. 5 D-70599 Stuttgart

Dr. Thielert, Gerhard: Thielert@clua.cvuatu.bwl.de; Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt, Hedingerstr. 1 D-72488 Sigmaringen

Dr. Thimm, Nina: Nina.Thimm@biomingti.com; Biomin GTI GmbH, Industriestr. 21 D- Herzogenburg

Frau Thum, Verena: thum@ifa-tulln.ac.at; IFA-Tulln, Abt. Umweltbiotechnologie, Konrad Lorenz Str. 20 A- Tulln

Ing. Topitschnig, Ernst: topitschnig@phibred.com; Pioneer Saaten GmbH, Pioneerstr., Industriegelände A-Parndorf

Mgv Twaruzek, Magdalena: twarmag@ab-byd.edu.pl; Akademia Bydgoska im. Kazimierza Wielkiego Instutut BiologII i Ochrony Srodowiska, ul Chodkiewicza 30 Pl-85 064 Bydgoszcz

Prof. Dr. Usleber, Ewald: Ewald.usleber@vetmed.uni-giessen.de; Justus-Leipzig-Universität, Professur für Milchwissenschaften, Ludwigstr. 21B D-35391 Giessen

Dr. Valenta, Hana: hana.valenta@FAL.de; FAL, Institut für Tierernährung, Bundesallee 50 D-38116 Braunschweig

Dr. Vojir, Franz: fvojir@baluf.gv.at; BA für Lebensmitteluntersuchung und -forschung, Kinderspitalg. 15 A- Wien

Dr. Volckens, Klaus v.: agrencoKV@t-online.de; Vicam, Bei der Etzkate D-24321 Stöfs

Frau Wackernah, Kirsten: Wackernah@clua.couaka.bwl.de; Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt, Weißenburger Str. 3 D-76187 Karlsruhe

Dr. Weber, Rudolf: r.weber@bgvv.de; Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Thielallee 88-92 D-14195 Berlin

Dipl. Ing. Weber-Eichinger, Bernadette: bwebereichinger@rwa.at; RWA-Raiffeisen Ware Austria/Labor Korneuburg, Johann Pamerstr. 1 A-2100 Korneuburg

Wei, Gu: guwei@biomin.com.sg; Biomin Laboratory Singapure, 10 Science Park Road, #02-11, The Alpha, Singapore Science Park II SG-11 7684 Singapore

Dipl. Ing. Weiss, Robert: roweiss@mail.zserv.tuwien.ac.at; TU , Institut für Analytische Chemie, Getreidemarkt 9/151 A-1060 Wien

Dr. Werner-Tutschku, Martin: wt@merlin.at; Tierärtzliche Praxisgemeinschaft Ried, A-4551 Ried/Traunkreis 20

Frau Wiedemann, Gerda: -; Bundesamt für Lebensmitteluntersuchung und Lebensmittelforschung, Kinderspitalg. 15 A- Wien

Dr. Ing. Wilkens, Jochen: jw@tchibo.de; TCHIBO Frisch-Röst-Kaffee-GmbH, F&E, Süderstr. 293 D-20537 Hamburg

Frau Woese, Katrin : woese@lvluahal.ml.lsa-net.de; LVLUA Sachsen-Anhalt, Freiimfelder Str. 66-68 D-06112 Halle/Saale

Dr. Wolf, Hanna: LVLMV@t-online.de; Landesveterinär- u. Lebensmitteluntersuchungsamt Mecklenburg-Vorpommern, Postfach 200101 D-17013 Neubrandenburg

Dr. Wolff, Joachim: wolff.bagkf@t-online.de; BA f. Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung, Schützenberg 12 D-32756 Detmond

HR Doz. Dr. Würzner, Herbert: herbert.wuerzner@relay.bfl.at; BA. U. FZ f. Landwirtschaft, Spargelfeldstr. 191 A-1226 Wien

Fr. Zabe, Nancy: techservice@vicam.com; Vicam, Technical Service Manager, 313 Pleasant Street USA-MA 02472 Watertown

Ing. Zederbauer, Reinhart: reinhart.zederbauer@relay.bfl.at; BA und FZ fürLandwirtschaft, Spargelfeldstr. 191 A-1226 Wien

Frau Zimmer, Irene: irenezimmer@hotmail.com; Institut für Hygiene und Technologie und Hygiene der Milch, Veterinärstr. 13 D-80539 München

Frau Zimmermann, Christel: c.zimmermann@bgvv.de; Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Thielallee 88-92 D-14195 Berlin

Dipl.-Ing. Zivkovic, Vladimir: juceti@cg.yu; PI-Centers for Ecotoxicological Research of the Republic of Montenegro, Put Radomira Ivanovica 2 YU-81000 Podgorica

Dr. Zoller, Otmar: otmar.zoller@bag.admin.ch; Bundesamt für Gesundheit, Abt. Lebensmittelwissenschaften, Postfach CH-3003 Bernburg

Dr. Zöllner, Peter: PEZO@olivin.anc.univie.ac.at; Institut für Analytische Chemie, Universität Wien, Währinger Str. 38 A- Wien

Für die Unterstützung danken wir den Ausstellern und/oder Sponsoren

Veterinärmedizinische Universität Wien

Institut für Ernährung

ABIMED Analysen-Technik GmbH

BASF AG

Biologische Analysensysteme BAG

Dr. Wiertz – Dipl.-Chem. Eggert – Dr.Jörrison GmbH

Lackner / Romer Labs / Rhone Diagnostics

Masterfoods Austria

Noack / R-Biopharm GmbH

Pioneer Hi-Bred International, Inc. - A DuPont Business

Ruttmann / VICAM

Separtis GesmbH

TECAN Austria

unipoint ag

Waters GesmbH

Layout und Logo

A. Fellinger