Gesellschaft für Mykotoxinforschung e. V.

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Institut für Pflanzenkrankheiten

---

22. Mykotoxin-Workshop
Bonn
5.-7. Juni 2000

Programm

Abstracts der Vorträge und Poster

Teilnehmerverzeichnis

22. Mykotoxin - Workshop

Universitätsclub, Konviktstr. 9, 53113 Bonn

5. – 7. Juni 2000

Programm

Montag, 5.6.2000

9:00- 9:30 Begrüßung — Prof. Dr. R. Galensa, Dekan, Landwirtschaftliche Fakultät
Prof. Dr. M. Gareis, Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V.
Prof. Dr. H.-W. Dehne/Dr. H. Hindorf, Institut für Pflanzenkrankheiten

Epidemiologie und Mykotoxinbildung bei *Fusarium*-Arten

9:30– 9:50 Buchenauer, H. und Z. Kang (Stuttgart): Histologische Untersuchungen zum Infektionsverlauf von *Fusarium* spp. in Weizenähren

9:50–10:10 Matthies, Annette; Flatter, A. und M. Semar (Limburgerhof): *Fusarium* in Weizen: Bedeutung und Toxinbildung im Feld – Möglichkeiten und Grenzen fungizider Maßnahmen

10:10–10:30 Suty, Anne und Astrid Mauler-Machnik (Leverkusen): Aktueller Stand der internationalen Forschung zur Bekämpfung von Ährenfusariosen in Weizen

10:30–10:50 Meier, Anja; Birzele, Barbara; Oerke, E.-C.; Krämer, J. und H.-W. Dehne (Bonn): Bedeutung verschiedener Faktoren für das Auftreten von *Fusarium* spp. und die Mykotoxingehalte von Weizen

10:50–11:20 **Kaffeepause** mit Firmenvorführung

11:20–11:40 Obst, A.; Lepschy, J. und R. Beck (München): Das Toxinrisiko durch *Fusarium graminearum* bei Weizen – Wechselwirkungen zwischen Witterung und pflanzenbaulichen Risikofaktoren

11:40–12:00 Ellner, F. M. (Berlin): Vorkommen von *Fusarium*-Toxinen im Getreide der Ernte 1999

12:00–12:20 Taschan, H. (Gießen): Deoxynivalenol in Getreide und Getreideerzeugnissen

12:20–12:40 Usleber, E.; Lepschy, J. und E. Märtlbauer (München): Deoxynivalenol in Mehlproben des Jahres 1999 aus dem Einzelhandel

12:40 – 13:40 **Mittagspause** (Imbiß im Club)

Dienstag, 6.6.2000

Weitere Fusarien-Toxine

8:20- 8:40 Zocher, R. (Berlin): Biosynthese der Depsipeptid-Mykotoxine in *Fusarium* spp.

8:40- 9:00 Hornbogen, T. (Berlin): Chromosomale Analyse Enniatin-produzierender *Fusarium* spp.

Mykotoxin-Produktion weiterer Schimmelpilze

9:00–9:20 Sassenberg, D.; Senkpiel, K.; Keller, R. und H. Ohgke (Lübeck): Mykotoxinnachweis in Pilzsporen von Schimmelpilz-belasteten Wohn- und Aufenthaltsräumen

9:20– 9:40 Fischer, G. (Aachen): Mykotoxine von *Aspergillus fumigatus* aus Reinkulturen und des natürlichen Bioaerosols aus Kompostierungsanlagen

9:40–10:10 **Kaffeepause** mit Firmenvorführung

10:10–10:30 Ostenfeld Larsen, T. (Lyngby, Dänemark): Chemische Charakterisierung von Käsepilzen

10:30–10:50 Jarvis, B. (College Park, USA): Stachybotrys: an unusual mold associated with water-damaged buildings

10:50-11:10 Nielsen, K.F. (Lyngby, Dänemark): Mycotoxins from mould infested Building Materials

Ochratoxin-Forschung

11:10–11:30 Degen, Gisela (Dortmund): Toxikologische Bewertung von Ochratoxin A: Offene Fragen und Forschungsbedarf

11:30–11:50 Föllmann, W.; Lebrun, S.; Kullik, B.; Koch, M. und H. M. Bolt (Dortmund): Zytotoxizität von Ochratoxin A und Citrinin in verschiedenen Zelltypen *in vitro*

11:50–12:10 Gareis, M. (Kulmbach): Vorkommen von Ochratoxinen in Getreide- und Malzstäuben

12:10–12:30 Otteneder, H. (Trier): Ochratoxin A in Kaffee, bundesweite Auswertung von Daten der Lebensmittelüberwachung der Jahre 1995 – 1999

12:30 – 13:30 **Mittagspause** (Imbiß im Club)

9:20– 9:40 Petzinger, E. und A. Weidenbach (Gießen): TNF_{α} -Freisetzung aus der Leber durch Mykotoxine

9:40–10:00 Dänicke, S. (Braunschweig): Untersuchungen zum Metabolismus von Zearalenon beim Broiler

10:00–10:30 **Kaffeepause** mit Firmenvorführung

Analytik

10:30-10:50 Krska, R. (Tulln): Trichothecene und Zearalenon: Stand der Analytik in Europa

10:50-11:10 Josephs, R. (Tulln): Laborvergleichstest für die Verbesserung der Zearalenon-Analytik in Europa

11:10-11:30 Göbel, Roswitha; Bohm, D. und Marlis Grunow (Bernau): Zur simultanen Bestimmung von Aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2, Ochratoxin A und Zearalenon

11:30–11:50 Köhler, Heike und G. Müller (Jena): Wirkungen von Mykotoxinen auf das Immunsystem – gibt es den Prüfparameter

11:50–12:10 Razzazi, E. (Wien): Empfindlicher und selektiver Nachweis der A-Trichothecene in Weizen mittels HPLC-APCI-MS

12:10 – 12:20 Knoll, Sandra (Freising): Anwendung eines PCR-Nachweises für Trichothecen-bildende *Fusarium*-Arten an praxisrelevanten Weizenproben

12:20 – 12:40 Geisen, R. (Karlsruhe): Quantifizierung von Mykotoxinbildnern mittels Real-Time-PCR

12:40-13:30 Abschlußdiskussion

Vorträge

Epidemiologie und Mykotoxinbildung bei *Fusarium*-Arten

Poster zu diesem Thema:

P 1: Untersuchungen zum Fusarientoxingehalt von ökologisch und konventionell angebautem Getreide aus Thüringen. Valenta, Hana (Braunschweig):

P1a: Schadwirkung und Mykotoxinbildung von *Fusarium culmorum*. Schade-Schütze (Bonn)

P 2: Untersuchung von sächsicher Herkunpft auf Fusarien und die Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA). Hanschmann, Gudrun (Leipzig)

Vorträge zu diesem Thema:

Infection mechanism of *Fusarium culmorum* in wheat spike

Zhensheng Kang and Heinrich Buchenauer
Institut für Phytomedizin, Universität Hohenheim, D-70593 Stuttgart

Fusarium head blight of wheat, predominantly caused by *Fusarium graminearum* and *F. culmorum*, not only results in a significant yield reduction, but also contaminites grains with mycotoxins. Because of its economic importance, much research has been carried out worldwide. However, detailed informations on the infection processes and spreading mechanism of the pathogen in wheat heads are very limited. In the present studies, the infection process and spreading of *F. culmorum* in wheat spikes were examined with light and electron microscopy, and the *Fusarium* toxins as well as the components of host cell wall in infected tissues such as cellulose, xylan and pectin were detected with immunogold and enzyme-gold labelling.

Infection and spreading processes: Although the macroconidia of the pathogen are able to germinate on all host surfaces, the formation of hyphal networks and the penetration of host tissues normally occurr on the inner surfaces of the lemma, glume and palea, as well as the ovary. The pathogen moves downward to the rachilla and rachis node by inter- and intracellular growth from the glume, lemma, palea and ovary. The pathogen also invades into the rachilla when hyphae on the inner surfaces reach the junctures between the rachilla and lemma, palea or glume. When hyphae of the pathogen arrive in the rachis from the rachis node they extend upward and downward by inter- and intracellular growth inside and outside of the vascular bundles in the rachis.

Detection of *Fusarium* toxins: Two antisera against deoxynivalenol and 3-acetyldeoxynivalenol were used in the present studies. Immunogold labelling revealed that the hyphae of the pathogen already produced the toxins when growing on the inner surfaces of the lemma and the ovary as early as 36 hours after inoculation. At this time the toxins were also found in the host cells. When continuing growth in the host tissues more toxins were detected, especially in the cells attached to the hyphae. The toxin accumulation showed a very close relationship to pathogenic changes in host cells, symptom appearance and colonization of host tissues with hyphae, which suggests that toxins might play an important role in the disease development.

Fusarium in Weizen: Bedeutung und Toxinbildung im Feld – Möglichkeiten und Grenzen fungizider Maßnahmen

Matthies, A.; Flatter, A.; Semar, M.; Bleiholder, H.
BASF-AG Agrarzentrum Limburgerhof

In den Jahren 1998 und 1999 wurden auf verschiedenen Standorten in Deutschland Versuchsserien zum Einfluß von Strobilurin-haltigen Fungiziden (reine Strobilurine sowie Mischungen von Strobilurin und Azol) und reinen Azolen auf den Toxingehalt im Erntegut durchgeführt. Die Weizenproben wurden dabei auf ein Spektrum von 6 Trichothecenen (Deoxynivalenol DON, Nivalenol NIV, 3- und 15-Acetyl-Deoxynivalenol 3ADON und 15ADON, Diacetoxyscirpenol DAS und T2-Toxin untersucht (1998). DON war in allen Proben enthalten, während die übrigen Metabolite (NIV, 3- und 15ADON) nur in Proben mit hohen DON-Gehalten vorkamen oder wie DAS und T2-Toxin in keiner Probe nachweisbar waren. Daher beschränkte sich die Analyse im Erntejahr 1999 auf die Metabolite DON und NIV. Allgemein zeichnete sich das Erntejahr 1999 im Vergleich zum Vorjahr durch niedrigere Gehalte an DON aus. Der Median für den DON-Wert 1999 lag bei 0,4 mg/kg (n = 280 Weizenproben aus unbehandelten Kontrollparzellen [mit natürlicher Infektion sowie mit Haferkorn- und Maisstroh-Inokulation]) und damit eindeutig unter dem diskutierten Grenzwert von 1 mg/kg. Im Jahr 1998 hingegen ergab sich ein deutlich höherer Median von 1,4 mg DON/kg Korn (n = 144 Weizenproben aus unbehandelten Kontrollparzellen).

Die Ergebnisse zeigen, dass der Standort und die dort vorherrschende Witterung einen sehr starken Einfluß auf die Höhe der Toxinkontamination im Erntegut haben. Durch die Applikation von Fungiziden wurde der DON-Gehalt im Erntegut unabhängig von der Wirkstoffgruppe (Strobilurin-haltig oder Azol) und unabhängig von der Höhe der Toxinkontamination gesenkt. Dabei zeigte sich aber auch, dass die verschiedenen Strobilurin-Fungizide hinsichtlich der Toxinreduktion klar zu differenzieren sind. Strobilurin ist nicht gleich Strobilurin. Der Wirkungsgrad der Fungizide auf den DON-Gehalt war stark an den Applikationszeitpunkt gekoppelt, wobei die Strobilurin-haltigen Präparate über den Zeitpunkt Beginn Blüte bis Ende Blüte die gleiche Flexibilität wie das Vergleichsazol zeigten.

Aktueller Stand der internationalen Forschung zur Bekämpfung von Ährenfusariosen in Weizen

Suty, Anne; Mauler-Machnik, Astrid
Bayer AG, Geschäftsbereich Pflanzenschutz – Biologische Forschung Fungizide –
Landwirtschaftszentrum Monheim – Alfred Nobel Straße 50 – D-51368 Leverkusen

Ährenfusariosen treten weltweit auf und werden durch verschiedene Pilze der Gattungen *Fusarium* und *Microdochium* hervorgerufen. Dieser Komplex von Erregern erschwert die Untersuchung sowie die Bekämpfbarkeit dieser Krankheit.

Untersuchungen zur Verbreitung der Ährenfusariosen haben gezeigt, daß von den allgemein wichtigen *Fusarium*-Arten, *Fusarium graminearum* weltweit am häufigsten auftritt.

Ährenfusariosen beeinträchtigen nicht nur den Ertrag, sondern vermindern ebenfalls die Qualität des Ernteproduktes: Die Zerstörung des Embryos bzw. des Mehlkörpers führt zu einer Beeinträchtigung der Saatgut- bzw. Backqualität. Durch Produktion von Mykotoxinen wird die Futterqualität stark vermindert. Im Brauereigewerbe ist das Problem des „Gushing" bekannt.

In den USA werden die Verluste in Weizen durch Ährenfusariosen zwischen 1991 und 1996 in der Höhe von 4 Milliarden DM geschätzt. Forschungsprojekte im Bereich der konventionellen und gentechnischen Züchtung in Höhe von ca. 3 Millionen $ jährlich wurden 1998 genehmigt. Insgesamt werden jährlich über 5 Millionen $ für den *Fusarium*-Forschung investiert. Um die Auswirkungen von Ährenfusariosen zu mindern, wurde bereits 1998 eine Sonder-Genehmigung (Section 18) für das gut wirksame Fungizid Tebuconazole erteilt. Zur Zeit werden Untersuchungen zur weiteren Optimierung der Spritzapplikation durchgeführt.

In Kanada wurde 1999 ebenfalls ein „emergency permit" für Tebuconazole erteilt, um die Verluste durch Ährenfusariosen (68 Millionen in 1996) sowie die Mykotoxin-Belastung des Weizens zu reduzieren.

Daten zur Auswirkung von Ährenfusariosen in China sind nur bedingt vorhanden. Li Zhenqi schätzte 1996 jedoch, daß 6,7 Millionen Hektar Weizen durch Ährenfusariosen befallen waren, verbunden mit einem Ernteverlust von 1 Mio Tonnen Weizen pro Jahr. Neben dem Einsatz von chemischen Präparaten wurden verschiedene Forschungsaktivitäten im Bereich der Züchtung durchgeführt. Einige Weizensorten mit Teilresistenz gegenüber Ährenfusariosen sollen bereits vorhanden sein.

In Europa ist keine Verluststatistik für Ährenfusariosen vorhanden. Untersuchungen zur Verbreitung und Auftreten von *Fusarium*-Arten zeigen jedoch, daß 1998 der Befall von Weizen durch Ährenfusariosen europaweit sehr stark war. In Nord-Frankreich wurden Deoxynivalenol-Belastungen bis zu 40 ppm aus unbehandelten Praxis-Schlägen nachgewiesen. Die Ergebnisse langjähriger Studien zur Biologie und Epidemiologie der *Fusarium*-Arten, Wirkung und Terminierung des Fungizidseinsatzes und Optimierung der Spritzapplikation werden präsentiert.

In Ungarn wurden wesentliche Forschungsarbeiten in der Weizenzüchtung (verbesserte Resistenz gegen Fusarium und verminderte Mykotoxin-Bildung) durchgeführt.

Weltweit gibt es derzeit keine Einzellösung gegen Ährenfusariosen. Landwirte, Pflanzenzüchter, chemische – und verarbeitende Industrie sind gleichermaßen gefordert, mögliche Maßnahmen zur Verminderung des *Fusarium*-Risiko und Sicherung einer hohen Qualität zu ergreifen.

Das Toxinrisiko durch *Fusarium graminearum* bei Weizen – Wechselwirkungen zwischen Witterung und pflanzenbaulichen Risikofaktoren

Obst, A., Lepschy, J., Beck, R., Bauer, G. und A. Bechtel,
Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, München und Freising

1989 wurde in Bayern ein *Fusarium*-Monitoring eingeleitet, bei dem allein für Weizen aus der Praxis alljährlich etwa 250-300 Zufallsproben u. a. auf ihren Gehalt an dem Leittoxin Deoxynivalenol (DON) untersucht werden. Die Erzeugungsbedingungen für diese Weizenproben werden vom Landwirt über Probenbegleitscheine abgefragt; Auskunft über die jeweiligen Witterungsbedingungen geben 120 agrarmeteorologische Messstationen. Das Risiko für einen erhöhten Befall mit *F. graminearum* und höhere DON-Werte wird derzeit über insgesamt 5 Faktoren ermittelt, die alle nur in einer zweistufigen Ausprägung (ja oder nein) erfasst sind. Diese Faktoren sind 1. Maisvorfrucht, 2. nicht-wendende Bodenbearbeitung nach Mais, 3. mittel oder stark anfällige Weizensorten, 4. Anwendung der Strobilurinfungizide Juwel, Juwel Top oder Amistar und 5. die Ähreninfektion begünstigenden Witterungsbedingungen zur Blütezeit des Weizens. Bei einem Zusammentreffen mehrerer Risikofaktoren kommt es nicht zu einer Addition, sondern einer Multiplikation ihrer Wirkungen.

Im Jahr 1999 konnte ein auf SO-Bayern konzentriertes *F. graminearum*-Auftreten mit dem bis zu dieser Zeit vorliegenden Witterungs-Befalls-Modell – warmfeucht für eine Ascosporeninfektion – nicht erklärt werden. Das Einsetzen nasskalter Witterung ab Beginn des Ährenschiebens schloss danach nämlich einen Ährenbefall aus. Durch eine Ergänzung des Aspekts nasskalte Witterung zur Bildung einer zweiten Sporengeneration in unser Modell ließ sich dann das Toxingeschehen im Jahre 1999 gut nachvollziehen, und auch für die weiteren geprüften Jahre ergab sich z. T. eine Verbesserung der Aussagen. Die Basis dafür waren Erkenntnisse von ADOLF (1998), dass die verbreitetsten *Fusarium*-Arten auf oberen Blättern ohne Symptome eine weitere Konidiosporengeneration bilden können. 1999 waren nach diesem Modell 70 % aller Ähreninfektionen allein auf Konidiosporen, in den Jahren 1993-98 nur 7-38 % auf diesen Infektionsweg zurückzuführen.

Die luftbürtigen Ascosporen können mit dem Wind auch über kurze Entfernungen verdriftet werden (FERNANDO et al., 1997), die regenspritzerverbreiteten Konidiosporen sind weniger mobil. Mit den DON-Daten aus dem Monitoring 1993-99 wird gezeigt, dass bei Nicht-Mais-Vorfrucht das Toxinrisiko bei Konidiosporeninfektionen geringer ist als bei Ascosporeninfektionen, bei Mais-Vorfrucht gibt es kaum Unterschiede.

Deoxynivalenol in Mehlproben des Jahres 1999 aus dem Einzelhandel

E. Usleber[1], J. Lepschy[2] und E. Märtlbauer[1]

[1], Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstr. 13, D-80539 München
[2], Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Vöttinger Str. 38, D-85354 Freising

Zur Untersuchung der Belastung von Handelsmehlen mit Deoxynivalenol (DON) wurden 1999 zu drei Zeitpunkten (April, Juni, November) in Münchner Lebensmittelgeschäften insgesamt 131 Proben gekauft. Es handelte sich um Weizenmehl der Typen *405* (n=42), *550* (n=9), *1050* (n=11), *Brotbackmischungen* (n=14), *Vollkornmehl* (n=20), *Körner-Weizen* (n=8), *Weizenkleie* (n=20) sowie *Roggenmehl* bzw. *-körner* (n=7). Die Untersuchung auf DON erfolgte mit Enzymimmuntest (EIA). Insgesamt 78 Proben wurden in einem Methodenvergleich zusätzlich mit HPLC untersucht. Es zeigte sich eine gute Übereinstimmung beider Methoden ($r^2 = 0.952$), wobei mittels HPLC tendenziell um ca. 10-15% höhere DON-Gehalte gefunden wurden. Aufgrund der niedrigeren Nachweisgrenze der HPLC (ca. 20 ng/g) im Vergleich zum EIA (111 ng/g) wurde mit ersterer Methode in fast allen Proben (74 von 78) DON nachgewiesen, der mittlere Gehalt für EIA-negative Proben (n=26) lag bei 63 ng/g.

Die Gesamtauswertung der 131 Proben (EIA-Messwerte) ergab für die verschiedenen Produkte Kontaminationshäufigkeiten von 65%-91%, lediglich Weizenmehl Typ *550* (33%) und *Roggen* (29%) wiesen eine geringere DON-Häufigkeit auf. In Verbindung mit den mittleren DON-Gehalten positiver Proben in Mehl der Typen *405* (200 ng/g), *550* (410 ng/g), *1050* (370 ng/g), *Brotbackmischungen* (210 ng/g), *Vollkornmehl* (300 ng/g), *Körnerweizen* (280 ng/g), *Weizenkleie* (830 ng/g) und *Roggen* (120 ng/g) zeigt dies, dass der Verbraucher durch Weizenprodukte einer hohen DON-Aufnahme ausgesetzt ist. Die Maximalwerte lagen jeweils bei ca. dem zweifachen des Mittelwerts. Es konnte kein nennenswerter Unterschied zwischen April, Juni und November festgestellt werden. Jüngste Untersuchungen vom Mai 2000 an Mehlproben vom Typ *405* (n=16, 69% positiv, Mittelwert 270 ng/g) bestätigen, dass es sich offensichtlich um eine Dauerbelastung handelt. Stichprobenartige Untersuchungen DON-positiver Proben auf Zearalenon ergaben in fast allen Fällen ein negatives (<5 ng/g) Ergebnis. Ein Vergleich zwischen Proben aus konventionellem und aus ökologischem Anbau (Packungsangaben) ergab für *Vollkornmehl*, *Körnerweizen* und *Weizenkleie* aus ökologischem Anbau eine geringere Kontaminationshäufigkeit sowie niedrigere mittlere DON-Gehalte, für Weizenmehle der Typen *550* und *1050* konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Zwischen Produkten, die den Erntejahren 1998 und 1999 entsprechen, scheint in Bezug auf DON kein Unterschied vorzuliegen. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass bei Einzelhandelsware das Herkunftsland in aller Regel unbekannt ist. Die mittlere Belastung von Weizenprodukten liegt somit seit längerem ziemlich konstant bei 200-300 □g/kg. Legt man die von der EU empfohlene (temporäre) Höchstaufnahme für DON (tTDI) von 1 □g/kg Körpergewicht zugrunde, so wird diese bei einem Erwachsenen bei einem täglichen Verzehr von 200-300 g erreicht, bei Kindern jedoch bereits bei einem Verzehr von einigen zehn Gramm. Zur Senkung der DON-Aufnahme ist daher eine Routinekontrolle von für den menschlichen Verzehr bestimmten Weizen auf DON und eine entsprechende Selektion der Ware dringend erforderlich.

Trichothecenproduktion durch *Fusarium*-Arten

Poster zu diesem Thema:

P 3: Fusarientoxine (DON, ZEA) in Lebensmitteln. Thielert, G. (Sigmaringen)

Vorträge zu diesem Thema:

Entwicklung der Deoxynivalenol-Gehalte in Bezug zum PCR-Nachweis potentieller Trichothecenbildner im Verlauf der Lagerung von Weizen

Barbara Birzele[1], Alexander Prange[2], Jutta Schönling[3] und Johannes Krämer[1]
[1]Landwirtschaftliche und Lebensmittel-Mikrobiologie, Institut für Pflanzenkrankheiten, Universität Bonn, Meckenheimer Allee 168, D-53115 Bonn
[2]Institut für Mikrobiologie & Biotechnologie, Universität Bonn, Meckenheimer Allee 168, D-53115 Bonn
[3]GEN-IAL, Institut für Angewandte Laboranalysen GmbH, Mühlheimer Straße, Tor 3, D-53840 Troisdorf

Die Kontamination von Getreide mit Mykotoxinen vermindert die Getreidequalität und stellt für den Verbraucher eine Gesundheitsgefahr dar. Während der Lagerung unter unsachgemäßen Bedingungen ist ein weiterer Mykotoxinanstieg möglich. Dies betrifft insbesondere die Kontamination mit den Toxinen sogenannter Lagerpilze, wie die der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde überprüft, ob von einem geringen Besatz mit Feldpilzen der Gattung *Fusarium* unter suboptimalen Lagerbedingungen eine Gefahr hinsichtlich der Bildung von Deoxynivalenol (DON) ausgeht. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Lagerung auf die relative DNA-Masse potentieller DON-Bildner ermittelt.

Winterweizen aus Organischem Landbau wurde über einen Zeitraum von 3 Monaten bei einer Temperatur von 20°C gelagert. Die Proben wurden auf eine Feuchte von 17 und 20% eingestellt, als Kontrolle wurden unbefeuchtete Proben (Feuchte 10%) mitgeführt. Die Lagerung erfolgte in Klimaschränken (Rubarth) mit der Möglichkeit zur Regulation von Feuchte und Temperatur. Darin wurden die Proben in sterilen Tüten ($SacO_2$, Belgien) gelagert, die mit Filtern versehen waren, so dass zwar der Gasaustausch möglich war, aber der Sporenaustritt verhindert wurde. Die im Abstand von 2 Wochen gezogenen Proben wurden auf ihren Gehalt an Deoxynivalenol mittels ELISA (R-Biopharm®) untersucht. Die Tox5-PCR [1] wurde zur Detektion potentieller Trichothecenbildner und zur Abschätzung ihrer relativen DNA-Masse über den Verlauf der Lagerung eingesetzt. Da mit der Tox5-PCR gleichzeitig *Fusarium*-Arten erfasst werden, die nicht zu den Trichothecen-Bildnern gehören, wurde zusätzlich mittels PCR-Nachweis des *goaA*-Gens aus *Fusarium graminearum* [2] spezifisch auf das Vorhandensein dieses DON-Bildners untersucht. Die Konzentration der *F. graminearum*-DNA über den Lagerungsverlauf wurde im Light Cycler™ (LightCycler – Fast Start DNA Master SYBR Green I) semiquantitativ erfasst. Die DON-Konzentration nahm im Verlauf der Lagerung bei den bei 17% Feuchte gelagerten Proben nur leicht, bei den bei 20% Feuchte gelagerten Proben stärker zu. Im Vergleich dazu war bei der Tox5-PCR über den Lagerungsverlauf eine Abnahme in der Intensität der PCR-Signale feststellbar. Mit dem semiquantitativen PCR-Nachweis des *goaA*-Gens wurde *F. graminearum* in jeder Probe nachgewiesen, ebenfalls mit tendenziell abnehmender Konzentration zum Ende der Lagerung.

Literatur:

[1] Niessen, M. L. und Vogel, R. F. (1998) *System. Appl. Microbiol.* **21**: 618-631
[2] Niessen, M. L. und Vogel, R. F. (1997) *System. Appl. Microbiol.* **20**: 111-113

Characterisation of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates by mycotoxin production and aggressiveness to wheat

J. W. Muthomi[1], H.-W. Dehne[2], E.-C. Oerke[2], E. W. Mutitu[1] and H. Hindorf[2]
[1] Dept. of Crop Protection, University of Nairobi, P. O. Box 30197 Nairobi, Kenya
[2] Inst. f. Pflanzenkrankheiten, Universität Bonn, Nussallee 9, D-53115 Bonn, Germany

A total of 27 *Fusarium culmorum* isolates from Germany and 41 *F. graminearum* isolates from Kenya were investigated for aggressiveness and mycotoxin production on wheat ears. In addition, ergosterol content of the kernels from ears inoculated with *F. graminearum* was determined and the *F. culmorum* isolates were tested for mycotoxin production *in vitro*. For both pathogens, isolates differed in aggressiveness. 59% and 37% of the *F. culmorum* isolates produced NIV and DON, respectively, *in vivo* and *in vitro*. The DON-producing isolates also produced 3-acDON *in vitro*. The more aggressive isolates produced mainly DON while the less aggressive isolates produced mainly NIV. 12% and 85% of the *F. graminearum* isolates produced NIV and DON, respectively. The highly aggressive isolates produced higher amounts of DON, aggressiveness being highly correlated to DON content in the kernels. The NIV-producing isolates were less aggressive. Ergosterol content of the kernels was moderately correlated to aggressiveness but ergosterol was highly correlated to DON content. Disease severity was associated with kernel weight reduction.

Vorkommen der Fusarientoxine Desoxynivalenol und Zearalenon in österreichischen Futtermitteln im Zeitraum von 1995 bis 1999

Dr. Werner Hochsteiner, Univ. Prof. Dr. Maximilian Schuh, II. Medizinische Universitätsklinik für Klauentiere der Veterinärmedizinischen Universität, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien.

In den letzten Jahren wird zunehmend über Mykotoxine als Krankheitsursache bei Mensch und Tier berichtet. Eine Vielzahl von primär pflanzenpathogenen Pilzarten sind in der Lage, im Rahmen ihres Sekundärstoffwechsels giftige Stoffe, sogenannte Mykotoxine, zu bilden. Während relativ hohe Dosen akute Vergiftungen bewirken, die im Tierversuch reproduzierbar sind, sind unter Praxisverhältnissen mehr chronischen Intoxikationen infolge längerfristiger Aufnahmen relativ niedriger Konzentrationen zu beobachten. Die Fusarientoxine Desoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) sind von besonderer Bedeutung, da sie sowohl bei Tieren als auch beim Menschen gesundheitliche Schäden verursachen können. In Mitteleuropa ist DON, verglichen mit anderen Mykotoxinen, am häufigsten nachzuweisen. DON wird auch als Gastrointestinaltoxin bezeichnet, weil es, abhängig von der Konzentration, zu Erbrechen, Futterverweigerung, Schleimhautentzündungen bis zur Nekrose und blutiger Enteritis führen kann. Infolge veränderter Proteinsynthese führt DON zu einer Immunsuppression. Das Fusarientoxin ZON weist chemisch eine ähnliche Konfiguration wie Östradiol auf, ist an Zytorezeptoren der Uterusschleimhaut gebunden und verursacht östrogenartige Wirkungen sowie abnormen Östrus. Im Zeitraum von 1995 bis 1999 wurden im Mykotoxinlabor der II. Medizinischen Universitätsklinik für Klauentiere an 3970 Futtermittelproben Untersuchungen auf ihren Fusarientoxingehalt durchgeführt. Von den untersuchten Proben wiesen 95 % der gesamten Futtermittel einen fusarientoxinpositiven Befund auf. Der Befallsgrad variierte entsprechend der Herkunft und Art der Proben. Der quantitative Nachweis von DON und ZON erfolgte mittels Enzymimmunoassay der Fa. Noack. BÖHM u. LEIBETSEDER (1987) konnten in Untersuchungen im Zeitraum von 1979 bis 1987 in 62 % von 2494 analysierten Futterproben unterschiedlich hohe DON-Konzentrationen feststellen. Aus den Ergebnissen des klinikeigenen Labors ist ersichtlich, daß DON in einem viel höheren Ausmaß (95 %) der untersuchten Proben nachzuweisen ist als bei den oben genannten Autoren. Die DON-Konzentration war bei entspelzten Getreidekörnern um 45 % niedriger als bei jenen mit Spelzen. Untersuchungen von LEIBETSEDER und LEXER (1993) über das Vorkommen von ZON in heimischen Futtermitteln zeigten, daß in Österreich von 231 ZON-untersuchten Futterproben (Mais, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen und Silagen) 28,7 % positiv waren. Bei unseren Untersuchungen konnten in 662 Proben (53,7 %) ZON nachgewiesen werden. Da es auch hierbei zu einer prozentuellen Zunahme bei den mit ZON kontaminierten Futtermitteln kam, kann gesagt werden, daß die feuchten Sommermonate günstige Voraussetzungen für diese beiden Fusarienmykotoxinbildner schufen. Bei den heimischen Futtermitteln erbrachten Mais, Weizen und Hafer die höchsten Fusarientoxinkonzentrationen. Hierbei wurden in Maisproben DON-Konzentrationen von 134 bis 8261 µg/kg und ZON-Konzentrationen von 0 bis 145 µg/kg; in Weizenproben DON-Konzentrationen von 454 bis 4152 µg/kg und ZON-Konzentrationen von 0 bis 8 µg/kg; sowie in Haferproben DON-Konzentrationen von 113 bis 9586 µg/kg Futter und ZON-Konzentrationen von 0 - 218 µg/kg festgestellt. Abschließend wird von den Autoren festgehalten, daß die große Bedeutung von DON und ZON in österreichischen Futtermitteln weiterhin besteht und in den letzten Jahren sogar zunahm. Dies könnte aber auch regional auf die große Anzahl von Biobetrieben in Österreich zurückzuführen sein, da biologischer Landbau auf Grund seiner Richtlinien auf chemische Bekämpfungsmaßnahmen verzichtet.

BÖHM, J., LEIBETSEDER, J. (1987): Mycotoxins and Phycotoxins. Proc. 38th Ann. Meeting of the EAAP, Lissabon, S. 24-31.

LEIBETSEDER, J., LEXER, W. (1993): Probiotics in fattening bulls. Proc. 2nd Sci. Cong., Egyptian Society for Cattle Diseases, Assiut, p. 1-20. -

Trichothecenabbau bei *Fusarium*-Arten

Vorträge zu diesem Thema:

Die Fähigkeit von Lactobacillen zur Reduzierung des Wachstums von *F. culmorum* während der Mälzung von Getreide

Rüdiger B. Liske*, Ludwig Niessen, Rudi F. Vogel

Technische Universität München, Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, Weihenstephaner Steig 16, 85350 Freising

Fusarium-Arten sind weltweit verbreitete Bodenpilze. Neben ihrer saprophytischen Lebensweise können einige Arten jedoch auch durch die Besiedelung von Halm und Ähre direkten Einfluss auf den Ertrag und die Qualität von Getreide haben. Der Ährenbefall durch Fusarien wird in Südeuropa und Skandinavien für die ökonomisch wichtigste Krankheitsgruppe von Weizen und Gerste gehalten [Müller, 1997].

In Malz und Bier verursachen Fusarien große Probleme durch Mykotoxine und das sogenannte Gushing (spontanes Überschäumen) des Bieres. Hinweise auf die toxikologische Wirksamkeit von Fusariumtoxinen verdichten sich in jüngster Vergangenheit immer mehr. Der Zusammenhang zwischen Fusarien und Gushing wurde in mehreren Arbeiten wiederholt experimentell belegt [Schwarz, 1996; Niessen, 1992].

Im Rahmen unserer Arbeiten wurden getreideassoziierte Lactobacillen und andere Mikroorganismen als natürliche Antagonisten während der Mälzung getestet um das Wachstum von *F. culmorum* zu verhindern. Die Testorganismen wurden dem Weichwasser in der Getreidemälzung zugesetzt. Als Versuchsmaterial diente feldinfizierter Weizen und Gerste. Beide Getreidesorten zeigten hohe Befallswerte von *F. culmorum*.

Für mikrobiologische Untersuchungen und quantitativer PCR wurden Proben nach der Mälzung und Darre des Malzes entnommen. Die Biomasse von *F. culmorum* wurde mittels gruppenspezifischer PCR für Trichothecen bildende Pilze bestimmt [Niessen, 1998]. Die Quantifizierung des amplifizierten DNA-Fragmentes erfolgte durch eine Endpunktmessung mit dem Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen in Mikrotiterplatten. Zur Erstellung der Eichkurve wurde Kalbsthymus DNA verwendet.

Bei 12 von 25 getesteten Mikroorganismen konnte eine Reduzierung der gemessenen Menge an *F. culmorum*-DNA gegenüber der unbehandelten Kontrolle festgestellt werden. In einigen Malzproben wurde eine sehr starke Verminderung des Befalls von *F. culmorum* beobachtet. Von den nicht antagonistisch wirksamen Isolaten verstärkten einige den Befall von *F. culmorum*.

Müller, H-M, Reimann, J, Schumacher, U, Schwadorf, K (1997) Natural occurrence of *Fusarium* toxins in barley harvested during five years in an area of southwest Germany, Mycopathologia, 137 (3): 185-192

Niessen M.L., Vogel R.F. (1998) Group specific PCR-detection of potential trichothecene producing *Fusarium*-species in pure cultures and cereal samples, Systematic and Applied Microbiology, 21: 618-631

Niessen et al. (1992) Mykologische Untersuchungen an Cerealien und Malzen im Zusammenhang mit dem Wildwerden (Gushing) des Bieres, Brauwelt, 16: 702-714

Schwarz, P.B. (1996) Relationship Between *Fusarium* infestation of Barley and the Gushing Potential of Malt, J. Inst. Brew., 102: 93-96

Charakterisierung von Metaboliten nach dem bakteriellen Abbau von A- und B-Trichothecenen durch BBSH797

E.Fuchs[1], E.M.Binder[2], D.Heidler[2], R.Krska[1]

[1] Interuniversitäres Forschungsinstitut für Agrarbiotechnologie (IFA-Tulln), Konrad Lorenzstrasse 20, A-3430 Tulln
[2] Biomin GTI, Industriestrasse 21, A-3130 Herzogenburg

Das Vorkommen von Trichothecenen, insbesondere von Desoxynivalenol in Futtermitteln, führt aufgrund ihrer immunsuppressiven Wirkung in der Tierzucht zu großen Leistungseinbrüchen in der Futterverwertung und Fertilität.

Die Gruppe der Trichothecene zeichnet sich durch verschiedene Strukturmerkmale aus, von denen einige besonders wichtig für ihre toxische Wirkung in Säugerzellen sind. Einerseits ist das die Epoxidgruppe zwischen C12 und C13 am Trichothecenkern, andererseits die Struktur und Position von Seitenketten.

Eine Entgiftung kann zuallererst durch eine Umwandlung der Epoxidgruppe in eine Doppelbindung aber auch durch Änderungen an den Seitenketten erreicht werden.

Ein neuer Weg, die chemische Struktur der Trichothecene zu ändern und damit ihre biologische Unschädlichkeit zu erreichen, ist der mikrobielle Abbau dieser wichtigen Gruppe der Fusarientoxine. So wurde bereits ein Bakterienstamm (BBSH797) gefunden, der fähig ist, eine Degradation von Mykotoxinen der Trichothecengruppe durchzuführen. Er wandelt zum Beispiel Deoxynivalenol (DON) in seinen Metaboliten DOM-1, das Deepoxid von DON, um und führt so zu einer Entgiftung.

In Analogie zum mikrobiellen Abbau von DON durch den Bakterienstamm BBSH797 wurde auch die mikrobielle Transformation anderer Trichothecene untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden die dabei entstehenden Mykotoxinmetaboliten der B-Trichothecene mittels HPLC-PB-MS Kopplung und ^{1}H-NMR charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß 3-Acetyldeoxynivalenol über DON zu DOM-1 metabolisiert wird, während Fusarenon-X zu Nivalenol und dessen Metaboliten Nivalenoldeepoxid abgebaut wird.

Zusätzlich zu den B-Trichothecenen wurden auch verschiedene Vertreter der Gruppe der A-Trichothecene metabolisiert und ihre Abbauprodukte charakterisiert. Die Strukturaufklärung erfolgte hier nach der Derivatisierung mit TRI-SIL®TBT mittels GC-MS. Die erhaltenen Spektren waren sehr aussagekräftig, es konnten verschiedene Metabolismuswege aufgezeigt werden. So wurde zum Beispiel Scirpentriol durch BBSH797 vollständig zu Scirpentrioldeepoxid umgesetzt. Andere A-Trichothecene zeigten einen komplizierteren Metabolismus, so wurde T-2 Triol einerseits sofort zum T-2 Triol Deepoxid umgesetzt, andererseits fand aber auch eine Hydrolyse zum T-2 Tetraol statt, das anschließend ebenfalls zum T-2 Tetraol Deepoxid deepoxidiert wurde.

Die vorliegende Forschungsarbeit beweist, daß der Bakterienstamm BBSH797 nicht nur DON sondern auch andere Trichothecene entgiften kann und daß die Entgiftung immer dem gleichen Schema folgt: Im ersten Schritt erfolgt die Hydrolyse einer Estergruppe, oder einer Acetylgruppe, im zweiten Schritt wird dann die Epoxidgruppe des Moleküls in eine Doppelbindung umgewandelt.

Diese Arbeit zeigt in einem einfachen Modell das Entgiftungspotential des Bakterienstammes BBSH797, das auch schon im Fütterungsversuch gezeigt werden konnte.

Abbau von Trichothecenen (DON, NIV, DAS und T2) und Ochratoxin A durch probiotische Futtermittelzusatzstoffe

J. Böhm[1], J. Grajewski[2], E. Razzazi[1], Katarzyna Szczepaniak[2], Birgit Rabus[1], Beata Skladanowska[2], Brigitte Cecon[1]

[1] Institut für Ernährung / Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1 / A-1210 Wien / Josef.Boehm@vu-wien.ac.at

[2] Pedagogical University in Bydgoszcz
Department of Biology and Environment Protection / Animal Physiology Laboratory
Chodkiewicza 30 / 85-064 Bydgoszcz / Polen

Probiotische Mikroorganismen wie Hefen und Bakterien haben als Futtermittelzusatzstoffe in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Als generell für unbedenklich befundene Zusatzstoffe (general recognised as save GRAS) besitzen sie ein großes Potential an sanfter chemischer Abbau-, Umbau- und Aufbauleistung. Diese Hefe- und Bakterienkulturen werden auch als Hilfsmittel in verschiedenen Fermentationsprozessen wie Silagebereitung oder Brauvorgänge eingesetzt. Ihre Wirkung im Magendarmtrakt ist nicht ganz geklärt, doch ist allgemein mit der Herstellung einer Eubiose der Darmflora zu rechnen.

In vitro konnten einzelne Stämme der Hefen *Saccharomyces, Kluyveromyces* und *Rhodotorula* Trichothecene (TCT) wie DON, NIV, Zearalenon, OTA und Fumonisin (FUM) abbauen. Aus dem Schweinedarm isolierte Laktobaziellenstämme waren ebenso imstande, eine FUM-Produktion in Fusarienkulturen in vitro zu hemmen.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war die abbauende Wirkung von manchen probiotischen Bierhefestämmen (*Saccharomyces cerevisiae*) und Milchsäurebakterien (*Lactobacillus* spp.) gegen die Standardtoxine OTA, NIV, DON, DAS und T-2 Toxin unter anaeroben Bedingungen zu bestimmen. OTA wurde in der Nährlösung zu 50 ppb, DON/NIV zu je 1 ppm, DAS und T2-Toxin zu je 0,5 ppm als Standard dem Kulturmedium zugesetzt. Die Bestimmung der A- und B-TCT wurde eine HPLC/MS Methode eingesetzt. OTA wurde mit einer HPLC/Fluoreszenz Methode nach vorheriger Anreicherung mittels Immunaffinitätschromatographie bestimmt. Keimzahlen wurden vor und nach der gesamten Untersuchung erhoben.

B-TCT DON/NIV wurden wie die A-TCT DAS/T-2 Toxin nicht abgebaut. Im Gegensatz wurden bei den mit OTA versetzten Kulturen eine Biodegradation beobachtet. *Lactobac. bulgaricus* konnte OTA zu 94% degradieren. Die Hefestämme degradierten OTA zwischen 8 und 38 %.

B-TCT und OTA hatten keinen Einfluss auf die Keimzahlen der Hefen, hingegen senkten die A-TCT die Keimzahlen über mehrere Größenordnungen.

Hinsichtlich der TCT verliefen die Abbauversuchsergebnisse entgegen den bisherigen als wenig zufriedenstellend. OTA wurde Milchsäurebakterienstämmen ausreichend degradiert. Hefestämme zeigten ein geringeres Abbauvermögen für OTA. Besonders A-TCT wie DAS und T2-Toxin hemmten vereinzelt erheblich die Milchsäurebakterienkulturen.

Fumonisinproduktion bei *Fusarium*-Arten

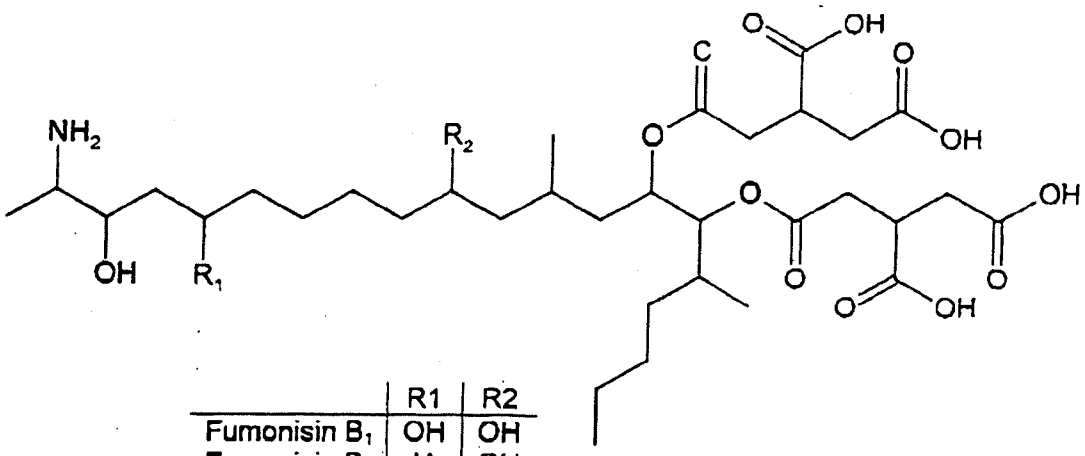
Vorträge zu diesem Thema:

Bestimmung von Fumonisinen in komplexen Lebensmittelmatrices mittels ASE

H.St. Klaffke[1], P. Majerus[2], E. Märtlbauer[3], H.J. Stan[4], R.Tiebach[1], E. Usleber[3], R. Weber[1]

[1] Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin / Thielallee 88-92 / 14195 Berlin
[2] Chemisches Untersuchungsamt Trier / Maximinerachtstr. 11a / 54295 Trier
[3] Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München / Veterinärstr. 13 / 80539 München
[4] Institut für Lebensmittelchemie der TU-Berlin / Gustav-Meyer-Allee 25 / 13355 Berlin

Fumonisine (Abbildung 1) sind sekundäre Stoffwechselmetaboliten des Schimmelpilzes *Fusarium moniliforme (F. verticillioides)* und zählen somit zu den Mykotoxinen. Im Tierversuch wurde für Fumonisin B_1, dem Hauptvertreter dieser Toxingruppe, eine kanzerogene Wirkung bei Ratten und Mäusen festgestellt. Daneben besitzen Fumonisine bei verschiedenen Tierarten neuro-, nephro- und pneumotoxische Eigenschaften. Es wird weiterhin vermutet, dass Fumonisine im Zusammenhang mit regional gehäuften Auftreten von Speiseröhrenkrebs beim Menschen (z.B. Transkei/Südafrika) eine Rolle spielen.



	R1	R2
Fumonisin B_1	OH	OH
Fumonisin B_2	H	OH
Fumonisin B_3	OH	H
Fumonisin B_4	H	H

Abbildung 1 : Struktur der Fumonisine der B-Gruppe

Um eine Belastung des Verbrauchers durch Fumonisine zu minimieren, ist ihr Nachweis im Lebensmittel besonders wichtig,.
Analytisch erfassen lassen sich diese Mykotoxine mittels immunchemischer und physikalisch-chemischer Verfahren (TLC, GC, HPLC und HPLC-MS)[1].
Wichtigster Abschnitt der Analyse ist dabei die Probenvorbereitung mit der Extraktion der Fumonisine aus der Lebensmittelmatrix.
Für Lebensmittelmatrizes wie z.B. Maismehl und -grieß sind meist einfache Extraktion mittels Methanol/Wasser oder Acetonitril/Wasser mit anschließender Isolierung an starken Anionenaustauschern mehrfach beschrieben [2,3], bzw. methodisch in internationalen Ringversuchen abgesichert[4].

Von verschiedenen Autoren wurde beobachtet, daß die Extraktionen anscheinend nicht immer vollständig sind, und so zu Unterbefunde führen würden.
Selim et al. [5] stellten einen Vergleich zwischen der herkömmliche Einfachextraktion und der Extraktion mittels SFE (Supercritical Fluid Extraction) an. Die Ergebnisse zeigten, daß mit der SFE im direkten Vergleich sehr viel höhere Gehalte ermittelt werden konnten als mit der Einfachextraktion.

Für herkömmliche Untersuchungen läßt sich aber die SFE nicht einsetzen, da das maximal mögliche Probevolumen auf 2,5ml (≙0,5 g Probeneinwaage) begrenzt ist, und repräsentative Ergebnisse für die Gesamtprobenmenge nur schwer erzielt werden können.
Als Alternative zur SFE wird seit einigen Jahren für die Extraktion von Analyten aus selbst komplexen Matrices die ASE (Accelerated Solvent Extraction) eingesetzt[6], die ein wesentlich größeres Extraktionszellvolumen aufweist und somit eine höhere Probeneinwaage ermöglicht.
Es werden anhand herkömmlicher und komplexerer Lebensmittelmatrices (wie z.B. Instantpolenta) die Einsatzmöglichkeit der ASE im Vergleich zu bestehender Verfahren beschrieben und die Ergebnisse betreffend der Extraktions- und Reinigungseffizienz dargestellt.

Literatur:

[1] G.S. Shephard, J. Chrom. A,815(1998), 31
[2] E.W.Sydenham, G.S. Shephard, P.G. Thiel, J. AOAC Int, 75 (1992),313
[3] K. Duncan, S. Kruger, N. Zabe, B. Kohn, R. Prioli, J. Chrom. A, 815(1998), 41
[4] P.G.Thiel, E.C. Sydenham, G.S. Shephard, D.J. van Schalwyk, J. AOAC Int, 76 (1993),361
[5] M.I.Selim, S.H.El-Sharkawy, W.J.Popendorf, J.Agric. Food Chem., 44 (1996), 3224
[6] F.Höfler, J.Ezzell, B.Richter, LaborPraxis, 3(1995)

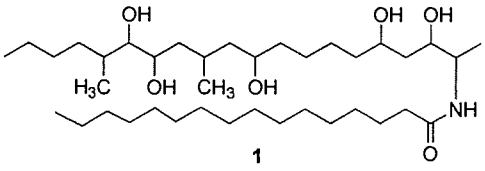
(Bestandteil der vom Bundesministerium für Gesundheit geförderten Studie "Fumonisine - Aufnahme des deutschen Verbrauchers".)

Die Fumonisine im 'brine shrimp'-Bioassay: Ein schneller Weg zur Abschätzung ihres toxikologischen Potenzials

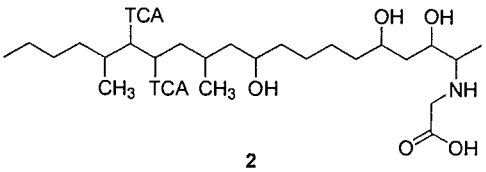
Michaela Hartl und Hans-Ulrich Humpf
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Universität Würzburg, Am Hubland, 97074 Würzburg

Während sich die Arbeiten auf dem Gebiet der Fumonisine in den vergangenen Jahren schwerpunktmässig mit ihrer Analytik und einem intensiven Lebensmittelscreening beschäftigt hatte, rücken in jüngerer Zeit ihre toxikologischen Eigenschaften immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung. Von der IARC sind die Fumonisine bereits 1993 in die Gruppe 2B der 'möglicherweise kanzerogenen Substanzen' eingestuft worden. Bislang die ausführlichsten toxikologischen Untersuchungen gibt es zum Fumonisin B_1, dem mengenmäßig bedeutendsten Isomer, dessen kanzerogenes Potential nun in einer aktuellen NTP-Langzeitstudie eindeutig nachgewiesen werden konnte. Bezüglich des Wirkungsmechanismus weiss man, dass FB_1 die Ceramidsynthase inhibiert und damit in den Sphingolipidmetabolismus eingreift; dies gilt nach bisherigen Erkenntnissen als der Schlüsselschritt der Toxikogenese der Fumonisine.

Wir haben verschiedene Fumonisinisomere, -abbau- und -folgeprodukte im 'brine shrimp'-Bioassay eingesetzt, um über die LC_{50}-Werte ihre Wirkungsstärken untereinander und relativ zum FB_1 vergleichen zu können. Der Bioassay mit *Artemia salina* eignet sich deshalb besonders, weil er sich ohne grosse Vorkenntnisse und spezielle Laborausrüstungen relativ unkompliziert etablieren lässt und schnell durchführbar ist. Es hat sich gezeigt, dass der Test unter konstanten Bedingungen reproduzierbare Ergebnisse liefert. Die Benutzung von Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen ermöglichte es, für jede einzelne Substanz sechs Konzentrationsstufen mit jeweils acht Wiederholungen pro Assay durchzuführen. Ferner wurden bei jedem Ansatz Positiv- und Negativkontrollen mit eingeschlossen und für jede Testsubstanz erfolgte eine Dreifachbestimmung. Die beobachtete prozentuale Sterberate wurde nach Korrektur um die natürliche Sterblichkeit mittels Probit-Transformation linearisiert, über dem Logarithmus der Konzentrationen aufgetragen und daraus die LC_{50}-Werte bestimmt.



1



2

Getestet wurden die Fumonisine FB_1 und FB_2, ihre Hauptabbauprodukte HFB_1 und HFB_2 und die Folgeprodukte N-Palmitoyl-HFB_1 (**1**) - ein bei der Acetylierung von HFB_1 durch die Ceramidsynthase gebildeter Metabolit - und N-Carboxymethyl-FB_1 (**2**), das Reaktionsprodukt von FB_1 mit reduzierenden Zuckern. Die stärkste Wirksamkeit zeigten dabei die intakten Fumonisine, während die Toxizität bei den hydrolysierten Analoga HFB_1 und HFB_2 um das sechs- bzw. dreifache reduziert war. N-Palmitoyl-HFB_1 hatte einen höheren LC_{50}-Wert als sein Vorläufer HFB_1 und liegt damit im Bereich von FB_1 und FB_2. Bemerkenswert war das Ergebnis für N-Carboxymethyl-FB_1; es war im Vergleich zur Ausgangssubstanz FB_1 um den Faktor 100 weniger toxisch. Es hat sich ausserdem gezeigt, dass die Empfindlichkeit der 'brine shrimp' gegenüber den verschiedenen Fumonisinisomeren bzw. -derivaten mit deren Potenzial, die Ceramidsynthase zu inhibieren, korreliert. Der Test ermöglicht also eine schnelle erste Abschätzung der Wirkungsstärke von Fumonisinen und stellt daher eine wertvolle Ergänzung bei der Beurteilung des toxischen Potenzials von neu entdeckten Fumonisinisomeren oder -abbauprodukten dar.

Weitere Fusarien-Toxine

Vorträge zu diesem Thema:

Biosynthese der Depsipeptid-Mykotoxine in *Fusarium* spp.

Rainer Zocher , Max-Volmer-Institut für Biophysikalische Chemie und Biochemie, Abt. Biochemie und Molekulare Biologie, Technische Universität Berlin, Franklinstraße 29, 10 587 Berlin.

Ennatine sind Cyclodepsipeptide, die von Fusarien produziert werden. Sie bestehen aus 3 Molekülen D-Hydroxyisovaleriansäure und 3 Molekülen einer verzweigtkettigen N-Methylaminosäure, die alternierend miteinander verknüpft sind. Im homologen Beauvericin ist die Aminosäure durch N-Methyl-Phenynlalanin ersetzt. Depsipeptide des Enniatintyps werden von einem spezifischen Mutienzymen synthetisiert, welches ein Hybrid aus einer Peptidsynthetase und einer N-Methyltransferase darstellt. Die Synthese der Depsipeptide erfolgt unter ATP-Verbrauch in einem sog. Thioltemplate-Mechanismus aus ihren Bestandteilen D-Hydroxysäure und L-Aminosäure In diesem Prozeß werden die Substrate durch enzymgebundenes Phosphopantethein als Thioester aktiviert. Der N-Methylierungsschritt erfolgt vor Ausbildung der Peptidbindung, wobei S-Adenosyl-L-Methionin als Methyldonor fungiert. Der Mechanismus der Enniatin- und Beauvericinsynthese verläuft iterativ. Enniatin Synthetase besitzt 2 Bindungsstellen (eine für die D-Hydroxysäure und eine für die L-Aminosäure). Durch Interaktion der Bindugsstellen entsteht eine Dipepidolgrundeinheit, die auf eine Thiolwartefunktion übertragen wird. Diese Thiolgruppe dient weiter als Akzeptor der wachsenden Peptidkette (Kondensation von Dipeptidoleinheiten). Der Prozeß stoppt mit der Cyclisierungsreaktion unter Bildung des Cyclohexadepsipeptids. Enniatin Synthetasen aus verschiedenen Fusarien können, bedingt durch Mutationen in der Aminosäurebindungsstelle, unterschiedlche Substratspezifitäten aufweisen, was zur Bildung verschiedener Enniatine, bis hin zum Beauvericin führt.

Molekulare Struktur und Funktion der Enniatinsynthetase

Till Hornbogen , Max-Volmer-Institut für Biophysikalische Chemie und Biochemie, Abt. Biochemie und Molekulare Biologie, Technische Universität Berlin, Franklinstraße 29, 10 587 Berlin.

Die Enniatinsynthetase aus Fusarien wird durch einen OLR (*esyn*1) von 9393 bp Größe codiert. Dies entspricht einer Polypeptidkette von 3131Aminosäuren (347 kDa). Das Gen besteht aus zwei unterschiedlichen Modulen von je ca. 420 Aminosäuren, dem Modul **EA** und dem Modul **EB** mit einer integrierten N-Methyltransferase Domäne M von 434 Aminosäuren. Modul EA ist für die Aktivierung und Bindung der D-Hydroxyisovaleriansäure, **EB** für die L-Aminosäure Aktivierung zuständig. Die *N*-Methylierung der Aminosäure erfolgt in der Domäne **M** des Moduls EB mit Hilfe des Cofaktors S-Adenosyl Methionin. Eine Sequenzanalyse des *esyn*1 Gens ergab eine hohen Grad an identischen Aminosäuren der Module untereinander, zu anderen Peptidsynthetasen und anderen Adenylat bildenden Enzymen wie der Feuerfliege-Luciferase. Weiter konnte gezeigt werden, daß beide Module C-terminal einen Phosphopantethein-Rest tragen. In Anschluß an Modul EB wurde noch ein weiterer Pantethein-Rest gefunden, der als Warteposition in der Synthese dient.

Nach Unterbrechung des Enniatinsynthetase kodierenden Gens aus *F. avenaceum* durch homologe Rekombination konnte keine Biosynthese von Enniatinen mehr nachgewiesen werden. Außerdem war die Pathogenität verschiedener Disruptionsmutanten auf Kartoffelknollenscheiben signifikant herabgesetzt, was auf eine Mitwirkung des Enniatins bei der Virulenz von *F.avenaceum* schließen läßt.

Mykotoxin-Produktion weiterer Schimmelpilze

Poster zu diesem Thema:

P4: Hausstaub, ein unterschätztes Problem? Rolle-Kampzcyk, Ulrike (Leipzig)

P5: Mycotoxins of airborne fungi and their relevance for occupational and environmental hygiene. Thißen, R. (Aachen)

Vorträge zu diesem Thema:

Mykotoxinnachweis in Pilzsporen von Schimmelpilz-belasteten Wohn- und Aufenthaltsräumen

Sassenberg, D., Senkpiel,K., Keller, R., Ohgke, H.
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Universität zu Lübeck

Eine Vielzahl von Veröffentlichungen über Schimmelpilzbefall in feuchtebelasteten Gebäuden berichten über Sensibilisierungen/Alergisierungen bei vorliegender Prädisposition und in selteren Fällen bei Immundefizienz über Infektionen (Aspergillose). Unter bestimmten Umweltbedigungen (1-3) können mykotoxinogene Schimmelpilze über luftgetrage Pilzsporen gesundheitliche Gefährdungen verursachen.
Daher wurden Wildstammisolate aus feuchte- und pilzbelasteten Wohnungen (Aspergillus fumigatus Wildstamm I und II, Aspergillus flavus, Aspergillus ochraceus, Aspergillus niger, Paecilomyces variotii, Cladosporium cladosporioides, Stachybotrys chartarum) auf den Mykotoxingehalt ihrer Pilzsporen (Gliotoxin, Aflatoxin B1, Aflatoxin G1, Ochratoxin A, Satratoxin H, Patulin und Fumagillin) hin untersucht. Die Schimmelpilzwildstämme wurden aus Proben, die bei Hausbegehungen durch Luftkeimansaugungen und Materialprobenentnahmen gewonnen und isoliert.
Der Aufschluß der Pilzsporen - Wildstammisolate erfolgte unter Zuhilfenahme zweier Aufschluß-verfahren. Zum einen mit dem Glashomogenisator unter Quarzsandzusatz und zum anderen mit Hilfe einer Kugelmühle mit Glasschrotzusatz. Die Anzucht der Kulturen erfolgte unter mesophilen Wachstumsbedingungen für 14 Tage bei 20°C ± 2°C im Brutschrank. Parallel dazu wurden die obigen Wildstammisolate 14 Tage im Exsikkator über destilliertem Wasser bei Raumtemperatur angezüchtet, um bei maximalem a_w-Wert die Mykotoxinbildung anzuregen.
Für den Nachweis von Mykotoxinen in Pilzsporen kam die HPLC und in Einzelfällen ein Enzymimmunoassay bzw. GC/MC-Analytik zur Anwendung.

Von den insgesamt 8 Wildstammisolaten konnten in 4 Fällen in ihren Konidiosporen Mykotoxine nachgewiesen werden. Die ermittelte Mykotoxinkonzentration in den Konidiosporen von Wildstammisolaten lag zwischen 0,004 bis 10,3 µg bei einer Sporenkonzentration von 10^7 bzw. 10^8.

Pilzsporen-Mykotoxingehalt aus Wildstammisolaten schimmelpilzbelasteter Wohnräumen

Lf.Nr.	***Schimmelpilzspecies***	**Nachweismethode/ Aufschlußart**	***Mykotoxinart***	***Mykotoxingehalt***
1	Aspergillus fumigatus (Wildstamm II)	HPLC Glashomogenisator/Quarzsand	Gliotoxin	0,11 µg/10^8 Sporen
2	Aspergillus flavus	HPLC Glashomogenisator/Quarzsand	Aflatoxin B1 Aflatoxin G1	10,3 µg/10^8 Sporen 4,4 µg/10^8 Sporen
3	Aspergillus ochraceus	Enzymimmunoassay Kugelmühle/Glasschrot	Ochratoxin A	3,98 ng/10^8 Sporen
4	Stachybotrys chartarum	HPLC Kugelmühle/Glasschrot GC/MS Kugelmühle/Glasschrot	Satratoxin H Satratoxin H	2,2 µg/10^7 Sporen 2,05 µg/10^7 Sporen

Die ermittelten Mykotoxinkonzentrationen liegen in ähnlicher Größenordnung wie die von LAND et al.(3) beschriebenen. Auf Grund der ermittelten Mykotoxinkonzentrationen ist eine akute Intoxikation in den untersuchten Schimmelpilz-belasteten Wohnräumen nicht zu befürchten.

Literatur

1.)Johanning, E.: Allergene und giftige Schimmelpilze in Innenräumen, In: Ökologische Bauen und Sanieren (Hrsg.: W.Feist, H.-U. Krieg, W.Linden) pp. 154-163, C.F. Müller Verlag, Heidelberg (1998)

2.)Yang, C.S., Johanning, E.: Airborne Fungi and Mycotoxins. In: Manual of Environmental Microbiology (ed. C.J. Hurst, G.R. Knudsen, M.J. Mclnerney, L.D. Stetzenbach, M.V.Walter, ASM Press, pp. 651-660, Washington (1997)

3.)Land, C.J., Rask-Andersen, A., Lundström, H., Werner, S., Bardage, S.: Tremorgenic Mycotoxins in Conidia of Aspergillus fumigatus, In: Health Implications of Fungi in Indoor Environments, (ed. R.A.Samson, B. Flannigan, M.E. Flannigan, A.P.Verhoeff, O.C.G. Adan, E.S. Hoekstra), Air Quality Monographs Vol. 2, pp.307-315, Elsevier (1994)

Mycotoxins of compost-derived airborne fungi in pure culture and in native bioaerosols from compost facilities

Fischer, G., Müller, T., Thißen, R., Schwalbe, R., Ostrowski, R., and Dott, W.

Institut für Hygiene und Umweltmedizin, Universitätsklinikum Aachen, Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen

Exposure to secondary metabolites of airborne fungi in waste handling facilities is discussed in regard to potential toxic impacts on human health. The relevance of mycotoxins has been intensely studied in connection with contamination of food and feed. Toxic secondary metabolites are expected to be present in airborne spores, but exposure to mycotoxins in bioaerosols has not been studied sufficiently.

The potential to produce mycotoxins was investigated for freshly isolated strains of airborne fungi. The spectra of metabolites in conidial extracts and culture extracts were compared for some relevant species. Furthermore, their potential to produce mycotoxins on different semi-natural media (compost extract agar) was investigated. Finally, airborne dust and bioaerosols derived from composting plants were tested for the presence of mycotoxins.

Aspergillus fumigatus is one of the most frequent species in the air of compost plants. A wide range of secondary metabolites was found in pure cultures of freshly isolated strains of *A. fumigatus*. Tryptoquivaline, a compound with tremorgenic properties, and trypacidin, for which no toxic properties are described, were found in native bioaerosols in a compost facility. The highly toxic metabolites gliotoxin and verruculogen were not found in native bioaerosols, although they were produced by some strains in pure culture.

An inventory of microbial metabolites in addition to fungal propagules will lead to a more detailed identification of potential health hazards at the working place. In addition to the pathogenic and allergological relevance, airborne fungi thus seem to be of toxicological concern.

Chemische Charakterisierung von Käsepilzen

Thomas Ostenfeld Larsen, Arbeitsgruppe für Mykologie, Fachbereich Biotechnologie, Technische Universität von Dänemark, DK-2800 Lyngby

Unsere jüngsten Arbeiten zeigten, dass hauptsächlich *Penicillium commune*, *P. nalgiovense*, *P. solitum*, *P. discolor*, *P. roqueforti*, *P. crustosum*, *P. nordicum* und *Aspergillus versicolor* verschiedene Käsesorten kontaminieren. Eine neue Art, *P. caseifulvum*, wurde jetzt als Oberflächenkontamination entdeckt.

Mykotoxine und andere sekundäre Stoffwechselprodukte wurden mit Hilfe von Mikroextraktionsmethoden vorbereitet und mit TLC, HPLC-DAD, LC-MS und GC-MS analysiert. Unbekannte Stoffwechselprodukte wurden mit Hilfe von präparativer Chromatographie isoliert. Reine Stoffe wurden durch spektrometrische Methoden charakterisiert (NMR, MS, IR, UV and X-ray). Eine Vielzahl bekannter und unbekannter Stoffwechselprodukte wurden sowohl in synthetischem Medium als auch in Käseproben gefunden.

Basierend auf taxonomischen Untersuchungen fand unser Labor heraus, dass *P. roqueforti* in drei Arten unterteilt werden sollte: *P. roqueforti* (Käse), *P. carneum* (Fleisch) and *P. paneum* (Brot). Gleichermassen sollte *P. verrucosum* in *P. verrucosum* (Getreide) und in *P. nordicum* (Käse- und Fleischprodukte) unterteilt werden. Beide Arten produzieren Ochratoxine. Allerdings wird Citrinin nur von *P. verrucosum* produziert.

Stachybotrys: an unusual mold associated with water-damaged buildings

Bruce B. Jarvis, Department of Chemistry and Biochemistry, University of Maryland, College :Park, MD 20742, USA
Kristian F. Nielsen, Department of Biotechnology, Danish Technical University, DK-2800 Lyngby, DENMARK

There is increasing evidence of health risks associated with damp buildings and homes in which high levels of microbes are found. Although traditionally, concerns have centered on microbial pathogens and allergenic effects, recent work has suggested that fungi pose the more serious risk. Evidence is accumulating that certain toxigenic molds are particularly a risk for human health through exposure, via inhalation, of fungal spores. Many of these fungi produce toxins (mycotoxins) some of which have been shown to cause animal and human intoxications, usually in an agricultural setting. The fungus, *Stachybotrys chartarum* (*S. atra*) is considered to be one of the more serious threats to people living and working in water-damaged buildings. This mold has a long history of being responsible for animal toxicoses, and in recent years, being associated with infant pulmonary hemosiderosis (bleeding in the lungs) of infants exposed to spores of this fungus in their homes. *S. atra* produces a variety of potent toxins (e. g. macrocyclic trichothecenes) and immunosuppressant agents (spirocyclic drimanes and cyclosporins). A novel class of diterpenes (atranones) of unusual structure is also produced by this fungus.

We find that *S. chartarum* has two chemotypes: producers of the potent cytotoxic macrocyclic trichothecenes (e. g. satratoxins) and those that produce the atranones and the simple trichothecenes, trichodermol and trichodermin. All isolates of *S. chartarum* produce the spirocyclic drimanes. The trichodermol and trichodermin simple trichothecenes are considerably less cytotoxic than are the macrocyclic trichothecenes.

Mycotoxins from mould infested Building Materials

Kristian Fog Nielsen[1,2]
[1]Department of Biotechnology, Technical University of Denmark, Building 221, DK-2800 Lyngby, Denmark.
[2]Energy and Indoor Climate Division, Danish Building Research Institute, Dr. Neergaards Vej 15, DK-2970 Hørsholm, Denmark

Only limited documentation of non-allergenic – especially toxic reactions after inhalation of microfungal spores in water damaged buildings exists. Recently attention has been drawn to the mycotoxins as causal compounds, as some the dominating genera found in buildings are well known mycotoxin producers. Some mycotoxins are consistently produced whereas some are produced only under very special conditions. This imply, that one should be very careful when selecting the media when screening for toxic or other biological active metabolites from moulds, as the metabolites might not be produced on the chosen substrate. Thus building materials are recommended to be used as substrate for production of fungal biomass for *in vivo* and *in vitro* studies as well as for chemical analyses for mycotoxins.

The most frequently isolated species in Danish buildings, *Penicillium chrysogenum* usually produces: chrysogin, meleagrin, penicillin G, ω-hydroxyemodine, 2-pyrovoylamino-benzamide and the neurotoxic roquefortine C on laboratory substrates, but on building materials only the non-toxic chrysogin or meleagrin have been detected.

P. brevicompactum produces mycophenolic acid and some isolates of *P. polonicum* produced 3-methoxy-viridicatin, verrucosidin, and verrucofortine when inoculated on building materials at high water activities.

Aspergillus versicolor almost consistently produces the carcinogenic sterigmatocystins on laboratory substrates, but on building materials either high quantities of biomass and sterigmatocystin (up to 1% of biomass) or high number of spores and almost no sterigmatocystin (if $a_w > 0.9$-0.99) are produced.

A. ustus isolates from water damaged buildings produce very different and unknown metabolites when growing on building materials and laboratory substrates. *A. niger* produced several naphtho-γ-pyrones and tetra-cyclic compounds.

Most recent studies have dealt with *Stachybotrys chartarum* (*S. atra*), who consistently produces the complement inhibiting spiriocyclic compounds. Isolates from water damaged Finnish, Danish and US buildings can be divided in to 3 groups:

- 30-40% capable of producing the highly cytotoxic macro-cyclic trichothecenes on most solid substrates inclusive building materials if $a_w > 0.95$.
- 50-60% who produces atranones and low quantities of the simple trichothecenes, trichodermol and trichodermin.
- Approx. 5-10% belonging to a different species, *S. albipes*, having significant smaller colony diameters on most solid substrates, but being chemically very close to the atranone producers.

Isolates of *Memnoniella echinata (*closely related to *Stachybotrys)* have also been isolated in water damaged buildings, these isolates also produce trichodermol and trichodermin on building materials as well as several grisofulvins.

Chaetomium globosum seems to sporulate much more heavily on building materials than on laboratory substrates, but the production of the chaetoglobosin mycotoxins seems to be constant, although they seem to be converted to more polar compounds over time.

Most isolates of *Alternaria* isolated in mouldy buildings seems to belong to the *A. tenuissima*-group and *Alt. arborescens*-group, both producing alternariol and alternariol monomethyl ether when growing on building materials.

Many investigated mouldy building materials contain many unknown secondary metabolites on the building materials, some probably being break down products of the materials.

Ochratoxin-Forschung

Poster zu diesem Thema:

P6: Adsorption of Ochratoxin A, Deoxynivalenol and Zearalenon in vitro at different p_H and adsorbents. Abd El-Hafez, S.; Richter, W.; Schuster, M.; Scholz, W. and M. S. Nowar (Poing)

P7: Untersuchungen von Traubensaft und Wein auf Ochratoxin A. Woese, Katrin (Halle)

Vorträge zu diesem Thema:

Toxikologische Bewertung von Ochratoxin A: Offene Fragen und Forschungsbedarf

Gisela H. Degen

Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund, Ardeystrasse 67,
D-44139 Dortmund, Germany

Derzeit werden in der EU und national zum Schutz der Verbraucher Höchstmengen für Ochratoxin A (OTA) in Lebensmitteln festgesetzt. Vor diesem Hintergrund wird die Datenlage in Hinblick auf wesentliche Elemente der Risikoabschätzung referiert, wie – Art und Schweregrad unerwünschter Wirkungen von OTA und – seine Toxikokinetik in verschiedenen Spezies sowie – die OTA-Exposition des Menschen durch Nahrungsmittel. Diese recht gut untersuchten Aspekte gestatten es, unter Berücksichtigung von (grossen) Sicherheitsfaktoren vorläufige tolerierbare tägliche Aufnahmemengen für OTA zu berechnen (PTDI im Bereich einiger ng / kg Körpergewicht), die gesund-heitliche Risiken für den Menschen ausschliessen und nur bei bestimmten Expositionsszenarien überschritten werden dürften [1].

Dennoch wird weiterer Forschungsbedarf zu folgenden Punkten gesehen:

– Die Frage nach dem Wirkungsmechanismus von OTA und möglichen "Schwellendosen", zumal auch in anderen regulatorischen Kontexten inzwischen Gesichtspunkte wie Wirkungsstärke und Wirkungsmechanismus stärker berücksichtigt werden.

– Die Bedeutung von Kombinationseffekten bei Einwirkung von Mykotoxin-gemischen; Studien hierzu sollten sich möglichst an "realen" Expositionen orientieren; in Hinblick auf eine Deutung von Befunden können sich Unter-suchungen *in vivo, ex vivo* und *in vitro* u.U. sinnvoll ergänzen.

– Der Aspekt der individuellen und/oder situativen Vulnerabilität, also die Frage nach besonders gefährdeten (empfindlicheren ? höher belasteten ?) Personengruppen. Dies wird in der aktuellen Diskussion teilweise berück-sichtigt, z.B. mit der Forderung nach niedrigeren OTA-Höchstmengen in Kleinkindernahrung [2]. Unklar ist noch, inwieweit Angehörige bestimmter Berufsgruppen u.U. auch durch inhalative Exposition gegen OTA höher belastet sind als die Allgemeinbevölkerung.

Zytotoxizität von Ochratoxin A und Citrinin in verschiedenen Zelltypen *in vitro*

Wolfram Föllmann, Stefan Lebrun, Brigitte Kullik, Martina Koch, und Hermann M. Bolt

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

Die Mykotoxine Ochratoxin A und Citrinin treten häufig simultan als Kontaminationen von Lebens- und Futtermitteln auf. In verschiedenen *in vivo* Studien wurden synergistische oder additive adverse Effekte beschrieben. Da für beide Substanzen kanzerogene Wirkungen in Nagern gezeigt wurden (u.a. Nierentumore in Ratten und Mäusen), ist auch ein Effekt auf den Menschen nicht auszuschließen.

In verschiedenen *in vivo*- und *in vitro*-Testsystemen konnte ein genotoxisches Potential von Ochratoxin A nachgewiesen werden, mutagenes Potential war bisher aber weder in bakteriellen noch in eukaryontischen Testsytemen eindeutig nachweisbar. Für Citrinin ist die Datenlage weitaus schlechter; hier liegen kontroverse Ergebnisse zur Genotoxizität vor und bisher keine Hinweise auf ein mutagenes Potential.

In der vorliegenden Studie wurden die beiden Mykotoxine hinsichtlich ihres zytotoxischen, genotoxischen und mutagenen Potentials sowie hinsichtlich additiver oder synergistischer Effekte an verschiedenen Zellkultursystemen *in vitro* getestet. Durch den Vergleich von Zellinen (V79-Zellen) mit gut charakterisierten Primärzellen aus einem Zielgewebe (Schweineharnblasen-Epithelzellen (PUBEC)) sollte zudem untersucht werden, ob die Sensitivität gegenüber den Mykotoxinen abhängig vom verwendeten Zelltyp sein kann.

Zusammenfassend zeigte sich, daß beide Mykotoxine genotoxisches Potential besitzen, aber additive oder synergistische Effekte in den verwendeten Systemen *in vitro* nicht auftraten (DNA-Reparatur (UDS-Assay), Induktion von Schwester-chromatidaustauschen). Mutagene Wirkungen konnten für beide Mykotoxine nicht nachgewiesen werden (HPRT-Mutagenitätsassay).

Ochratoxin A zeigte in beiden Zellkultursystemen deutlich ausgeprägtere zytotoxische Effekte als Citrinin. Bei einer gleichzeitigen Anwendung beider Mykotoxine beruhten die zytotoxische Wirkungen fast ausschließlich auf der Wirkung von Ochratoxin A. Die primäre Zellkulturen eines Zielorgans (hier Harnblasenepithel) reagierten deutlich empfindlicher als die verwendete Zellinie. Bei der Interpretation von Studien an Zellkultursystemen, insbesondere an Zellinien, sollten diese Ergebnisse daher berücksichtigt werden.

Vorkommen von Ochratoxinen in Getreide und Malzstäuben

M. Gareis[1] und F. Meussdoerffer[2]

[1]Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, Bundesanstalt für Fleischforschung, [2]Schlehdornstr. 2, Kulmbach

Um die Belastung von Getreide- und Malzstäuben mit Ochratoxin A (OTA) zu ermitteln, wurden Braugetreide- und Malzproben aus Mälzereien und Brauereien analysiert. Parallel dazu wurden korrespondierende Staubproben, die während der Reinigung des Getreides vor der Weiterverarbeitung zu Malz gewonnen wurden, sowie entsprechende Malzstäube auf OTA untersucht.

Im Unterschied zum gereinigten Getreide (23 untersucht/3 positive) wurde OTA in 80% der Stäube (25/20) nachgewiesen. Die Konzentrationen lagen hierbei im Bereich zwischen 0,05–21,0 µg/kg. In den Malzproben (9/8) lagen die Konzentrationen zwischen 0,01–0,14 µg/kg, in den entsprechenden Staubproben (12/12) dagegen zwischen 0,05–3,75 µg/kg.

Da die Entsorgung des Getreideausputzes und der Stäube i.d.R. dadurch erfolgt, dass diese den proteinreichen Malzkeimen zugesetzt werden und dann in Form von Pellets oder Mehlen als Futter verwendet werden, wurden im Rahmen der Studie zudem kommerzielle Malzkeimchargen (in Form von Pellets und Mehlen) analysiert. Alle der 12 untersuchten Proben erwiesen sich als positiv mit Ochratoxin A-Werten zwischen 0,12 – 6,01 µg/kg.

Die Ergebnisse der Studie belegen, dass bei Stäuben mit einer deutlich höheren OTA–Belastung als in den Ausgangsmaterialien gerechnet werden muss und die übliche Entsorgung via Verfütterung mit Risiken bei der Tierproduktion verbunden sein kann.

Da neben der oralen Aufnahme von Ochratoxinen über die Nahrung die Inhalation von kontaminierten Stäuben eine weitere mögliche Expositionsquelle für den Menschen darstellt, wurden Blutserumproben von 7 Mitarbeitern einer Mälzerei im Abstand von 3 Monaten entnommen und analysiert. Sämtliche Serumproben erwiesen sich als positiv mit Medianwerten von 0.34 ng/ml und 0.58 ng/ml. Diese liegen über dem Medianwert der lokalen Bevölkerung (n=70, 0,21 ng/ml).

Obwohl die Anzahl der Proben nicht repräsentativ ist, kann als mögliche Ursache für die erhöhte Belastung der Serumproben die aerogene Exposition gegenüber kontaminierten Stäuben aus dem Arbeitsumfeld der Arbeiter in Betracht gezogen werden.

Ochratoxin A in Kaffee: Bundesweite Auswertung von Daten der Lebensmittelüberwachung der Jahre 1995 bis 1999

Herbert Otteneder und Paul Majerus

Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz
Institut für Lebensmittelchemie Trier
Maximineracht 11a, D-54295 Trier

Ausgewertet wurden Daten, die von Laboratorien der amtlichen Lebensmittelüberwachung in den Jahren 1995 bis 1999 erhoben wurden. Zur Auswertung kamen insgesamt 613 Proben, bei deren Untersuchung mindestens eine Nachweisgrenze von 0,6 µg/kg erreicht wurde. Mit Hilfe der statistischen Prozessanalyse wurden die Medianwerte für Rohkaffee (0,4 µg/kg), für Röstkaffee (0,6 µg/kg), für Röstkaffee entkoffeiniert bzw. entkoffeiniert und säurearm (0,4 µg/kg) und für Kaffeeextrakte (0,7 µg/kg) ermittelt. Daraus errechnet sich je Verbraucher eine mittlere Gesamtaufnahme von 14 ng OTA pro Tag.

Die von uns ausgewerteten bundesweiten Daten stammen von 16 Untersuchungsinstituten, die ihre Ergebnisse der Arbeitgruppe lebensmittelchemischer Sachverständiger der Länder und des BgVV (ALS) zur Verfügung stellten. Sinn und Zweck dieser Datensammlung war es, den derzeitigen Belastungszustand zu beschreiben. Weiterhin kann das repräsentative Datenmaterial bei Grenzwertregelungen Entscheidungshilfe leisten und als Ausgangswert für die Beobachtung zeitlicher Trends dienen. In die Gesamtauswertung wurden nur Datengruppen einbezogen, bei denen eine Nachweisgrenze von 0,6 µg/kg erreicht worden war.

Tabelle 1: **Ochratoxin A in Kaffee, bundesweite Daten, 1995-1999**

Warenbezeichnung	N	N >NWG	Mittel-wert[1] (µg/kg)	Median-wert[2] (µg/kg)	Min[3] (µg/kg)	Max (µg/kg)
Rohkaffee	82	22 (27 %)	1,29	0,43	<0,23	24,5
Röstkaffee	419	191 (46 %)	0,99	0,57	0,21	12,1
Röstkaffee, entkoffeiniert/ entkoffeiniert und säure-arm	71	26 (37 %)	0,49	0,36	0,15	2,7
Kaffeeextrakte	41	29 (71 %)	1,00	0,71	<0,28	4,8

[1] Berechnung des Mittelwertes mit halber Nachweisgrenze
[2] Graphische Ermittlung des Medianwertes aus Quantil-Quantil-Plot (Uerkvitz)
[3] Gewogenes harmonisches Mittel der Nachweisgrenzen

Aflatoxin- und Roquefortinforschung

Poster zu diesem Thema:

P 8: Aflatoxicosis in rabbits: Effectiveness of Egyptian raw bentonite in prevention or diminution the detrimental effects of naturally aflatoxin-contaminated diets on reproductive, blood biochemistry and digestibility in rabbits. Nowar, M. S.; M. I. Add El-Rahim; M. N. El- Gaafary; M. I. Tawfeek, Zenate A. Ibrahim and Fatma R. Abdallah (Zagazig/Egypt)

P 9: Aflatoxins B_1 in animal feeding stuff - results of an international validation study. Stroka, J. and Elke Anklam (Ispra)

P10: Aflatoxins B_1 in baby food – results of an international validation study. Stroka, J. and Elke Anklam (Ispra)

P11: Aflatoxins in various food matrices – results of an international validation study. Stroka, J. and Elke Anklam (Ispra)

P12: Aflatoxine in Verarbeitungserzeugnissen von Pistazien. Burgmaier-Thielert, Elisabeth (Sigmaringen)

P13: HPLC based method for the measurement of the reduction of aflatoxin B_1 by bacterial cultures isolated from different African. Färber, P. (Karlsruhe)

Vorträge zu diesem Thema:

Aflatoxin Analytik auf dem heutigen Stand der Technik – Bewältigung von Problemen

J. Stroka[1], C. von-Holst[1], E. Anklam[1], M. Petz[2]
[1] Europäische Kommission, Gemeinsame Forschungsstelle, Institut für Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung: Lebensmittel und Verbrauchsgüter, I-21020 Ispra, Italien
[2] Bergische Universität, Gesamthochschule Wuppertal, Gaußstrasse 20, D-42097 Wuppertal

Die Entwicklung neuer Analysenmethoden erfordert neben der Implementierung moderner Techniken auch die Beachtung zukünftiger rechtlicher Rahmenbedingungen (z.B. Grenzwerte). Für eine spatere Akzeptanz sind Anwenderfreundlichkeit, Robustheit der Methode und umweltfreundliche Lösungsmittel ebenfalls wichtige Kriterien. Soll die Methode darüberhinaus in einem Ringversuch validiert werden, muss sie sich an den jeweils gestellten statistischen Mindestanforderungen messen lassen.

Der technische Fortschritt im Bereich der Analytik erlaubt die Messung von immer geringeren Mengen von Aflatoxinen in Lebensmitteln, wobei die Gesetzgeber in vielen Ländern diesem Umstand nachkommen und entsprechende Gesetze oder Verordnungen erlassen. Hieraus erwächst der Bedarf an validierten Methoden (möglichst auf internationaler Ebene), um Analysenergebnisse ggf. aussagekräftig beschreiben oder verfechten zu koennen.

In Anbetracht dieser Umstände wurden verschiedene Methoden zur Bestimmung von Aflatoxinen in einer Auswahl von Lebensmitteln und in einem Tierfuttermittel entwickelt. Diese Methoden berücksichtigen die Implementierung moderner Techniken und sind das Resultat ausgiebiger Zusammenarbeit und Kommunikation verschiedener Arbeitgruppen innerhalb Europas.

Aus dieser Arbeit entwickelten sich anwenderfreundliche und analytisch robuste Methoden unter der Berücksichtigung von Umweltfreundlichkeit sowie ökonomischer Aspekte.

Folgende analytischen Aspekten wurden besonders berücksichtigt:

- Wahl verschiedener Extraktionsmethoden für die einzelnen Matrizes
- Robustheit und Effiziens der Aufreinigung mit Hilfe von Immuno-affinitaetssäulen
- Handhabung von Aliquoten und Injektionsmengen
- Vergleich verschiedener Derivatisierungsmethoden

In einem abschliessend auf internationaler Ebene durchgeführten Ringversuch erwiesen sich die Methoden als überaus zufriedendstellend und wurden von internationalen Organisationen wie z.B. CEN und AOAC anerkannt.

Verhinderung des *Penicillium roqueforti*-induzierten Verderbs von Maissilage durch ausgewählte Silierzusätze

Horst Auerbach[1], Elisabeth Oldenburg[2] und Günter Pahlow[2]
[1] Wolfgang Röthel GmbH, Schwänheit 10, 34281 Gudensberg
[2] Institut für Pflanzenbau und Grünlandwirtschaft, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Bundesallee 50, 38116 Braunschweig

Penicillium roqueforti gilt als einer der Hauptverursacher von pilzlichem Verderb in Silagen, der mit der Bildung von Mykotoxinen einhergehen kann. Basierend auf mehrjährigen Voruntersuchungen wurde ein technologisches Lösungskonzept entwickelt, welches darauf abzielt, das Wachstum von *P. roqueforti* während des Silierprozesses und der sich anschließenden Entnahmephase mit Hilfe von Siliermitteln zu unterdrücken.

Dazu wurden insgesamt 21 Modellsilierversuche im Labormaßstab mit verschiedenen Silomaissorten, angebaut am Standort der FAL, durchgeführt. Die Ernte der Maissorten erfolgte zu unterschiedlichen Reifestadien, so dass die Trockenmasse-Gehalte der Ernteprodukte im Bereich von 22-39 % schwankten. Der gehäckselte Silomais wurde mit *P. roqueforti*-Isolaten, die aus Maissilagen der landwirtschaftlichen Praxis stammten, inokuliert. Anschießend wurden pro Maissorte verschiedene chemische und biologische Silierzusätze bzw. Kombinationspäparate zugegeben und das Häckselgut in Laborsiliergefäße gefüllt. Eine unbehandelte Charge diente jeweils als Kontrolle. Die Siliergefässe wurden überwiegend anaerob über eine Dauer von 8 Wochen bei 25°C gelagert. Um einen *P. roqueforti*-bedingten Verderb zu provozieren, wurde in dieser Zeit, in Anlehnung an ein DLG-Schema für die Prüfung von Siliermitteln, mehrmals kurzfristig Luft zugeführt. Nach Abschluss der anaeroben Lagerungsphase wurden die Silos über einen Zeitraum von 3 Wochen unter Luftzutritt gelagert, um die aerobe Stabilität der Silagen einzuschätzen.

Am Ende der anaeroben Lagerungsphase wurden Proben entnommen und umfangreiche chemische und mikrobiologische Anaysen durchgeführt, um die hygienische Qualität der erzeugten Silagen beurteilen zu können. Während der aeroben Lagerung erfolgte eine zeitlich gestaffelte Untersuchung auf Pilzbefall durch eine optische Bonitur.

Die Prüfung der verschiedenen biologischen und chemischen Silierzusätze in den Modellsilierversuchen ergab, dass eine Zugabe von 0,2 % Benzoesäure zu frisch geerntetem, gehäckselten und mit toxinogenen Stämmen von *P. roqueforti* beimpften Silomais das Wachstum dieses Schimmelpilzes auch unter suboptimalen Silierbedingungen und bei aerober Lagerung über 7 Tage zuverlässig verhindert. Gleichzeitig können durch dieses Siliermittel auch die von Clostridien verursachten Fehlgärungen (Buttersäurebildung) vermieden werden. Durch die kombinierte Anwendung von 0,2 % Benzoesäure und heterofermentativen Milchsäurebakterien (diese bilden außer Milchsäure auch Essigsäure) lässt sich die Gärqualität von Maissilage über höhere Gehalte an Gärsäuren zusätzlich verbessern.

Tiergesundheit

Poster zu diesem Thema:

P14: Die Wirkung von niedriger und hoher Ochratoxin A Belastung im Futter auf die Kükenaufzucht. Böhm, J. und J. Grajewski (Wien/Bydgoszcz)

P15: Wirkung von Deoxynivalenol auf den Magen-Darm-Trakt männlicher Läuferschweine. Dillenburger, Tanja (Stuttgart)

P16: Beeinflussung der Zytokinsekretion von Maus-Thymom-Zellen (EL-4) durch Ochratoxin A. Heller, M. (Jena)

P17: Apoptose in humanen Nierenzellen durch Ochratoxin A. Schwerdt, G. (Würzburg)

P18: Citrinin in the diet of young and healthy persons living in Balkan Endemic Nephropathy areas. Vrabcheva, T.; Usleber, E.; Petkova-Bocharova, T.; Nikolov, I.; Chemozemsky, I.; Dietrich, R. and E. Märtlbauer (Sofia/München)

P19: Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratoxin A - Qualität von Futtergetreide. Janes, W. (Poing)

P20: Determination of Zearalenone and its Metabolites in Urine and Tissue Samples of Pig and Cow by LC-MS/MS. Justus Jodlbauer, Peter Zöllner, Wolfgang Lindner

Zum Einfluß der Mykotoxine Ochratoxin A, Deoxynivalenol und Zearalenon bei kombinierter Gabe auf die Tiergesundheit und Rückstände (Zusammenfassung der Ergebnisse)

Klaus Lusky[1], Roswitha Göbel[1], Doris Tesch[1], K.-D. Doberschütz[1], Klaudia Lusky[1] und W. Haider[2]

1 Institut für Veterinär-Pharmakologie und Toxikologie GmbH, Weißenseer Straße 36, 16321 Bernau
2 Tierarztpraxis für Pathologie, Berlin

In 4 Teilversuchen wurde der Einfluss der Verfütterung der Mykotoxine OTA, ZEA und DON jeweils allein bzw. in Kombination auf die Tiergesundheit und das Rückstandsverhalten von Schweinen ab ca. 50 - 60 kg Lebendmasse über 90 Tage geprüft.
Die Gabe von 1000 µg DON/kg Futter bzw. 250 µg ZEA/kg Futter allein bzw. in Kombination mit anderen Mykotoxinen führt aufgrund der schnellen Metabolisierung nicht zu nachweisbaren Rückständen dieser Mykotoxine in Organen und Geweben. Damit dürften diese Mykotoxine für den Verbraucher nicht relevant sein.
Die OTA-Metabolisierung bzw. -Ausscheidung wird durch die gleichzeitige Gabe von ZEA bzw. DON beeinflußt. OTA ist rückstandstoxikologisch relevant.
Im Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen kann festgestellt werden, dass die genannten Dosierungen vom gesunden Tier über 90 Tage gut vertragen werden. Die Verabreichung der Mykotoxine an Schweine ab 50 kg Lebendmasse führt nicht zu äußerlich sichtbaren klinischen Auffälligkeiten.
Beobachtungen wie eine Verringerung der Lebendmassezunahmen, der Hämatokrit- und Hämoglobinwerte, der Erythrozytenzahlen, eine Erhöhung der Gesamtbilirubinwerte, Veränderungen in der Sauerstoffradikalbildung, verminderte IgA-Konzentration haben sich nur vorübergehend nach Versuchsbeginn vereinzelt gezeigt, sie sind reversibel.

Einfluß von *Epicoccum nigrum*, *Alternaria alternata*, *Mucor racemosus* und *Ulocladium chartarum* auf die Protozoenpopulation im Pansen des *Rindes (in vitro)*

A. Höhling[1], M. Höltershinken[1], P. Hoffmann[2], D. Brunklaus[1] u. H. Scholz[1]

[1] Klinik für Rinderkrankheiten der Tierärztlichen Hochschule Hannover,
Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover, Deutschland
[2] Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,
Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Deutschland

Protozoen beteiligen sich am ruminalen Kohlenhydrat-, Lipid- und Stickstoff-Stoffwechsel: So fördern sie die Futterverdaulichkeit (insbesondere die schwer verdaulichen Zellwandbestandteile), stabilisieren die Fermentation und somit den intraruminalen pH-Wert (durch Aufnahme von Futterpartikeln und deren kontinuierlich langsamen Abbau), sättigen die Fettsäuren und begünstigen das Vorkommen verzweigter und ungesättigter Fettsäuren. Schließlich kompensieren sie Proteinverluste aus dem Futter bei gleichzeitig erhöhtem Angebot essentieller Aminosäuren wie Histidin, Leuzin, Isoleuzin und Valin an das Wirtstier.

Pansenprotozoen beeinflussen durch ihre metabolischen Aktivitäten die Gesundheit des Wirtstieres: Sie fördern einerseits die schaumige Gärung, setzen aber andererseits die Diarrhoe-Anfälligkeit von Kälbern herab. Sie begünstigen das Wollwachstum, wirken antiazidotisch, reduzieren Nitrat zu Nitrit, bauen Zearalenon ab und wirken einer Kupferakkumulation entgegen.

Darüber hinaus werden Pansenprotozoen durch die Gabe verschiedener Stoffe (z. B. Stärke, Zucker, Lipide, Proteine, Hormone, Vitamine, Spurenelemente, Antibiotika, Ionophore, Myko- und Phytotoxine) gefördert oder gehemmt.

Insgesamt reagieren Protozoen auf Veränderungen im Pansen, so daß sie sich als Gesundheitsindikatoren oder zur Abschätzung des Schweregrads seiner Erkrankung anbieten. In in-vitro-Versuchen wurden sie daher bereits als Biosensoren für „bioassays" eingesetzt.

In eigenen Untersuchungen wurde in einem in-vitro-Pansenmodell (RUSITEC) die Reaktion der Protozoenpoplation auf mit Alternaria alternaria, Epicoccum nigrum, Mucor racemosus bzw. Ulocladium chartarum verschimmeltem Heu jeweils mit und ohne Zusatz von Thiamin überprüft. Dabei wurden drei Protozoenfraktionen untersucht:

a) Normaler Anteil der kleinen Protozoen an der Gesamtpopulation : 81 – 93 %
b) Normaler Anteil der mittelgroßen Protozoen an der Gesamtpopulation : 6 – 18 %
c) Normaler Anteil der großen Protozoen an der Gesamtpopulation : 0 – 3 %

Die Verwendung von havariertem Futter brachte folgende Ergebnisse:

Auswirkungen von Schadfutter mit und ohne Thiaminzulage auf die Überlebensfähigkeit der Pansenprotozoen (% der Kontrolle)

Einflüsse	Protozoenart	klein	mittelgroß	groß
Alternaria alternata	ohne Thiamin		- 16	
	mit Thiamin			
Epicoccum oryzae	ohne Thiamin		- 27	
	mit Thiamin			
Mucor racemosus	ohne Thiamin		- 9	
	mit Thiamin		Stabilisierung	
Ulocladium chartarum	ohne Thiamin		+ 2	
	mit Thiamin		+ 26	

Schadfuttermittel beeinflußte die mittelgroße Protozoenfraktion in unterschiedlichem Ausmaß.
Die zusätzliche Zulage von Thiamin zeigte keine einheitlichen Effekte.

Einfluß von *Epicoccum nigrum* und *Alternaria alternata* auf die Pansenfermentation des Rindes (in vitro).

Martin Höltershinken[1], Andrea Höhling[1], Dieter Brunklaus[1], Peter Hoffmann[2] und Henner Scholz[1]

[1] Klinik für Rinderkrankheiten der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Bischofsholer Damm15, 30173 Hannover, Deutschland
[2] Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Deutschland

Epicoccum nigrum (EPIN) und Alternaria alternata (ALAL) wurden aus Schadfuttermitteln isoliert, nach deren Aufnahme Rinder an zentralnervösen Erscheinungen (Cerebrocorticalnekrose - CCN) erkrankten.

CCN wird durch einen Mangel an Vitamin B 1 ausgelöst, das physiologischerweise das Rind bis zu 95 % in seinem Pansen mit Hilfe der dort vorkommenden Bakterien synthetisiert.

Im künstlichen Pansen (RUSITEC, semikontinuierliches Langzeitsystem, 6 Fermenter) wurde der Einfluß von Epicoccum nigrum sowie Alternaria alternata auf die Pansenfermen-tation und den Vitamin B 1 Gehalt überprüft.

Sechs Versuchsläufe (Dauer 25 Tage) gliederten sich in 6 Tage Vorlauf, 3 Tage Kontrollphase, 5 Tage Zulagephase I (nur verpilztes Heu VHE), 5 Tage Zulagephase II (VHE + 0,3 mg Thiamin/Fermenter/Tag) und 5 Tage Nachlauf (2 Fermenter Kontrolle - KF; 2 Fermenter EPIN; 2 Fermenter ALAL).

Veränderungen durch EPIN bzw. ALAL sind in folgender Übersicht (prozentualer Maximaleinfluss) zusammengefasst:

Parameter	Zulagephase I EPIN	Zulagephase II EPIN + Vit. B 1	Zulagephase I ALAL	Zulagephase II LAL + Vit. B 1
pH-Wert	+ 0,1	+ 0,1	+ 0,6	+ 0,9
Gasproduktion	- 2,5	+ 4,7	unverändert	
Methananteil an der Gesamtgasfraktion	- 1,0	- 1,0	unverändert	
Proteingehalt der Bakterienfraktion	- 1,0	+ 11,5	- 5,3	+ 5,7
sFVA	+ 1,5	- 3,9	- 5,7	- 3,4
Vitamin B 1				
- im Überstand	+ 5,2	+ 4,4	- 5,1	+ 10,3
- im Fermenter	+ 8,0	+ 2,2	- 6,6	+ 8,4

Mit Epicoccum verschimmeltes Heu bewirkte im Gegensatz zu Alternaria alternata erniedrigte Gasproduktionen sowie herabgesetzte Methangehalte. Unter Vitamin B 1 Zulage stiegen Bakterienmasse und -stoffwechselaktivität an.

Eine deutliche thiaminolytische Wirkung konnte bei beiden Schimmelpilzen nicht beobachtet werden. Insgesamt reichen die erkennbaren Wirkungen auf Fermentationvorgänge und Thiamin-haushalt nicht aus, um sie für die Auslösung einer CCN verantwortlich machen zu können.

Einfluss von *Mucor racemosus* und *Ulocladium chartarum* auf die Pansenfermentation des Rindes (in vitro)

Brunklaus, D.[1], M. Höltershinken[1], C. Wulff[1], P. Krause[1], P. Hoffmann[2], A. Höhling[1] u. H. Scholz[1]

1. Klinik für Rinderkrankheiten, Tierärztliche Hochschule Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover,
2. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen u. Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig

Nachdem der Einfluss eines gesamtheitlich verpilzten Heus auf die intraruminale Fermentation beim Rind bereits eingehend untersucht wurde (Plitt 1995), sollte nunmehr der Einfluss der isolierten Schimmelpilze *Mucor racemosus* und *Ulocladium chartarum* mit Hilfe des Langzeitzeitinkubationssystems RUSITEC (RUmen SImulation TEChnic) überprüft werden.

Beim RUSITEC (Czerkawski und Breckenridge 1977) handelt sich um ein Pansensimulationsmodell vom Typ des geschlossenen semikontinuierlichen Durchflusssystems mit parallel laufenden, voneinander unabhängigen Fermentern. Mit ihnen können Studien über mehrere Wochen durchgeführt werden, die Rückschlüsse auf die in-vivo-Verhältnisse der Pansenfermentation bei ruminierenden Wiederkäuern erlauben.

Insgesamt wurden sechs Versuchsläufe mit einer Dauer von jeweils 24 Tagen durchgeführt. Nach sechstägigemVorlauf und dreitägiger Kontrollphase mit Zulage von normalbeschaffenem Heu folgte eine fünftägige Versuchsphase I (VFI), in der die beiden Kontrollfermenter (KF) mit autoklaviertem Heu und die Versuchsfermenter (MF und UF) mit verpilztem Heu (*Mucor racemosus* bzw. *Ulocladium chartarum*) beschickt wurden. An den fünf folgenden Tagen (VFII) wurde allen Fermentern täglich zusätzlich 0,3 mg Thiamin zugelegt und in einer fünftägigen Nachlaufphase alle Fermenter erneut mit normalem Heu beladen. Die Verwendung von verpilztem Futter hatte folgende Auswirkungen:

Auswirkungen von *Mucor racemosus* und *Ulocladium chartarum* auf wesentliche Fermentationsparameter (Abweichungen zwischen Versuchsfermentern mit und ohne Thiaminzulage und Kontrollen in Prozent)

	Ulocladium		*Mucor*	
		plus Thiamin		plus Thiamin
pH-Wert	bis +0,6%	bis +0,9%	bis +0,5%	bis +0,7%
Protein (Fermenter)	bis -14,6%	bis -16,4%	bis -8,0%	bis -12,3%
Cellulaseaktivität	-	bis +62,1%	bis +9,0%	bis +46.7%
flüchtige Fettsäuren (Überstand)	bis -6,3%	bis -7,5%	bis -3,1%	bis -5,2%
Essigsäure (Überstand)	bis -6,7%	bis -8,3%	bis -4,0%	bis -4,2%
Propionsäure (Überstand)	bis -11,1%	bis -11,1%	bis -9,4%	bis -12,2%
Gesamtthiamin (Überstand)	-	bis -8,1%	-	bis -11,0%
Gesamtthiamin (Fermenter)	-	bis -12,3%	-	-

Die Zulage von verpilztem Heu bewirkte unabhängig von einer zusätzlichen Thiaminzulage eine deutliche Abnahme der Proteinkonzentration, einen leichten Rückgang der Produktion von flüchtigen Fettsäuren sowie einen geringen Anstieg der pH-Werte. Bei zusätzlicher Thiaminzulage stieg die Cellulaseaktivität stark an und die Gesamtthiaminproduktion fiel geringfügig ab.

Untersuchungen zum Carry over von Zearalenon und Deoxynivalenol beim Schwein.

J. Bauer[1], E. Usleber[2], E. Märtlbauer[2], M. Ritzmann[3] und W. Gränzer[1]

[1]Lehrstuhl für Tierhygiene, Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau, Technische Universität München, Weihenstephanerberg 3, D-85354 Freising;
[2] Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians- Universität München, Veterinärstr. 13, D-80539 München;
[3]Lehrstuhl für Krankheiten des Schweines, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians- Universität München, Veterinärstr. 13, D-80539 München.

Zearalenon und Deoxynivalenol gehören mit zu den am häufigsten in Futtermitteln nachweisbaren Mykotoxinen. In einem Fütterungsversuch mit Schweinen wurde geprüft inwieweit diese aus dem Futter in Gewebe und Körperflüssigkeiten übergehen können.

Zum Einsatz kam eine natürlich kontaminierte Futtermischung mit Gehalten von 0,18 mg/kg Zearalenon und 3,5 mg/kg Deoxynivalenol. Jeweils 6 Schweine wurden in Gewichtsabschnitten 8 bis 30 kg, 30 bis 60 kg und 30 bis 90 kg mit "toxinhaltigem" bzw. "toxinfreiem" Futter versorgt. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde mittels klinischer, klinisch-chemischer und hämatologischer Verfahren dokumentiert. Darüber hinaus wurden die Gewichtsentwicklung der Tier und der Futterverzehr aufgezeichnet. Zur Bestimmung von Zearalenon-, α- und β-Zearalenol-Rückständen sowie von Deoxynivalenol-Rückständen in Galle, Leber und Skelettmuskulatur wurden Probenaliquote homogenisiert, mit β-Glucuronidase inkubiert, mit Ethylacetat extrahiert und die Extrakte mittels HPLC-fraktioniert. Zum Nachweis der jeweiligen Verbindung wurden die entsprechende HPLC-Fraktionen mit Hilfe eines EIA untersucht.

Die Gewichtszunahmen und die Futterverwertung waren erwartungsgemäß bei den jüngeren Tieren am stärksten beeinträchtigt. Vereinzelt waren bei klinisch-chemischen und hämatologischen Parametern geringe Differenzen zwischen den Werten der Versuchs- und Kontrolltiere feststellbar. Die höchsten Gehalte an Zearalenon, α- und β-Zearalenol sowie von Deoxynivalenol wurden in den Gallen der Tiere festgestellt. Deutlich niedriger waren die Mykotoxin-Konzentrationen in der Leber, während in den Skelettmuskulaturproben nur vereinzelt knapp über der Nachweisgrenze liegende Gehalte festgestellt werden konnten.

Wirkung von Deoxynivalenol (DON) auf männliche Läuferschweine in Abhängigkeit der Darreichungsform

Tanja Dillenburger und Uwe Lauber

Institut für Tierernährung (450), Universität Hohenheim, Emil-Wolff-Strasse 10, 70599 Stuttgart

In der Literatur sind bereits mehrfach Versuche über die Wirkung von Deoxynivalenol (DON) in der Schweinefütterung beschrieben. Hierbei wurde sowohl natürlich kontaminiertes Material verfüttert, als auch reines DON zu einem vermeintlich toxinfreien Grundfutter zugesetzt. Die verabreichten Grundfutter enthielten jedoch ausnahmslos Komponenten, bei denen ein Befall mit *Fusarium*-Arten nicht ausgeschlossen werden kann.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Ermittlung derjenigen Toxin-Konzentration, ab der erstmals, ausschließlich auf DON zurückzuführende Leistungseinbußen (u.a. verminderte Futteraufnahme, geringere Zuwachsraten) beobachtet werden können.

Zu diesem Zweck wurde eine Diät auf Kartoffelbasis einer Getreideration (50% Weizen) gegenübergestellt.

Die Toxinkonzentrationen in den Rationen wurden auf 4000 und 6000 µg DON/kg Futter eingestellt. Basierend auf bisherigen Untersuchungen war davon auszugehen, daß bei diesen Gehalten in beiden Futtervarianten toxinbedingte Effekte auftreten sollten.

Definierte Toxingehalte wurden in der Weizenration durch Verschneiden unterschiedlich belasteter Weizenchargen, in der getreidefreien Ration durch Zusatz des reinen Toxins in Ethanol erreicht.

Die Tiere wurden als Absetzferkel von einem der Universität Hohenheim angegliederten Ferkelerzeuger bezogen. Somit stand einheitliches Tiermaterial aus einem kontrollierbaren Bestand zur Verfügung.

Der Versuchszeitraum erstreckte sich jeweils über vier Wochen, dem eine dreiwöchige Eingewöhnungszeit voranging.

Die aufgenommene Futtermenge wurde täglich, das Gewicht wöchentlich erfaßt. Während des Versuches wurde dreimal (14-tägiger Abstand) Blut aus der Vena cava cranialis gewonnen und Nieren- und Leberparameter sowie Parameter zur Beurteilung des allgemeinen Gesundheitszustandes untersucht.

Für Inkubationsversuche (DON-Metabolisierung durch Darmflora) wurde wöchentlich frischer Kot entnommen.

Zu Versuchsende wurden die Tiere getötet und Organproben für histologische und enzymatische Untersuchungen entnommen.

Die derzeit vorliegenden Ergebnisse werden vorgestellt und diskutiert.

Transformation von Deoxynivalenol durch die Darmflora des Schweines - In-vitro Untersuchungen zur Adaptation in Abhängigkeit der Darreichungsform

Uwe Lauber und Tanja Dillenburger

Institut für Tierernährung (450), Universität Hohenheim, Emil-Wolff-Strasse 10, 70599 Stuttgart

In der Literatur wurden eine Reihe von Untersuchungen zur Wirkung von Deoxynivalenol auf die Leistungsfähigkeit von Schweinen beschrieben.
Versuche mit natürlich kontaminiertem Getreide, die in unterschiedlichen Institutionen durchgeführt wurden (vergleichbare Toxingehalte), ergaben z.T. deutlich voneinander abweichende Ergebnisse. Darüberhinaus wurde festgestellt, daß der Diät zugesetztes synthetisches DON niemals dieselbe Wirkung induzierte wie natürlich kontaminiertes Futter (selbe DON-Konzentration).
Somit muß davon ausgegangen werden, daß eine beobachtete Wirkung nicht nur von der eingesetzten Toxinkonzentration abhängig ist. Die bisher alleinig auf DON basierenden Dosis-Wirkungsbeziehungen wären dann nur bedingt richtig.

Unabhängig vom gemessenen DON-Gehalt im Futter könnten "maskiert" vorliegende Toxine und/oder synergistisch wirkende Substanzen (z.B. Fusarinsäure) in natürlich kontaminiertem Material eine Rolle spielen.
Eine weitere Theorie wäre, daß DON sozusagen als "Türöffner" für andere Substanzen dient und somit selbst nur <u>indirekt</u> für die beobachteten Wirkungen verantwortlich ist. (z.B. Störungen der Darmintegrität in Verbindung mit Endotoxinen). Solche möglichen Einflußfaktoren wurden bisher kaum berücksichtigt.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde Kot unterschiedlich belasteter Tiere (DON-Konzentration, Darreichungsform) in einem in-vitro-System mit reinem DON inkubiert. Mittels eines HPLC-Verfahrens wurde derjenige Anteil an DON ermittelt, der nach der Inkubation in Deepoxy-DON umgewandelt wurde. Die für diese Reaktion vermutlich notwendige "Adaptation" der Mikroflora könnte beispielsweise für eine spätere Erholung der Tiere verantwortlich sein. Es sollte geprüft werden, ob eine solche Adaptation stattfindet bzw. von welchen Einflüssen diese abhängt.

Die beschriebenen Untersuchungen sollen einen Beitrag leisten die unterschiedliche Wirksamkeit von natürlich kontaminiertem Getreide und einer getreidefreien Diät mit Zusatz von synthetischem DON besser zu verstehen. Letztendlich soll damit versucht werden die komplexen Wirkmechanismen dieses Toxins im Organismus (Schwein) weiter aufzuklären.

TNFα- Freisetzung aus der Leber durch Mykotoxine

A. Weidenbach, K. Schuh und E. Petzinger
Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen
Frankfurterstraße 107, 35392 Gießen

Mykotoxine wie Trichothecene und Ochratoxin A (OTA) wirken immunsuppressiv und beeinflussen die Bildung von Cytokinen.

Nach ihrer Resorption aus dem Darm gelangen Mykotoxine über die Portalvene in die Leber. Dort werden inflammatorische Cytokine insbesondere von den Kupfferschen Sternzellen, Endothelzellen und Leberparenchymzellen gebildet und in das Sinusoidalblut der Leber abgegeben. An der isolierten und bei 37°C mit Krebs- Henseleit Puffer (mit 2% Dextran) perfundierten Rattenleber wurde die TNFα Abgabe aus der Leber in die Perfusionslösung nach Zusatz verschiedener Mykotoxine gemessen und mit der Freisetzung durch *E. coli* Lipopolysacharid (LPS), einem bakteriellen Endotoxin, verglichen.

Toxin	LPS	OTA	Citrinin	3-Ac-DON	XAN
TNFα	+++	+++	-	-	-

Ochratoxin A und LPS führen zur Freisetzung vergleichbarer Mengen TNFα aus der Leber, zeigen jedoch bei gleichzeitiger Anwesenheit keinen additiven Effekt. 3-Acetyl-Deoxynivalenol (3-Ac-DON) und Xanthomegnin (XAN) induzieren selbst keine, blockieren jedoch die OTA-vermittelte TNFα- Freisetzung. Im Gegensatz dazu hat Citrinin hierauf keine Hemmwirkung. 3-Ac-DON blockiert auch die Freisetzung von TNFα durch LPS. In Abwesenheit von Ca^{2+} Ionen sowie in Anwesenheit des Phosphodiesterase III Inhibitors Rolipram wird die TNFα- Freisetzung durch LPS und OTA deutlich herabgesetzt. Oligonukleotide, die in die Transkription von Cytokinen eingreifen, unterdrücken die OTA-vermittelte TNFα- Freisetzung. Da im Perfusionspuffer kein Anstieg der Lactatdehydrogenase (LDH) auftrat, konnte eine Schädigung der Leberparenchymzellen durch die toxinvermittelte TNFα- Freisetzung ausgeschlossen werden.

Die Befunde zeigen, daß neben den lange bekannten bakteriellen Endotoxinen (LPS) auch das Schimmelpilztoxin Ochratoxin A Cytokine aus der Leber freisetzt und das Interaktionen zwischen verschiedenen Mykotoxinen hierbei auftreten können.

Untersuchungen zum Metabolismus von Zearalenon beim Broiler

S. Dänicke, K.-H. Ueberschär, I. Halle, H. Valenta
Institut für Tierernährung, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) Braunschweig, Bundesallee 50, 38116 Braunschweig

Zur Absorptions- und Ausscheidungskinetik des von verschiedenen Fusarienarten gebildeten Mykotoxins Zearalenon (ZON) beim Geflügel liegen in der Literatur häufig nur Untersuchungen vor, die auf Radioaktivitätsmessungen von Geweben oder Ausscheidungsprodukten nach Verabreichung von radioaktiv markiertem und isoliertem ZON beruhen. Die Bioverfügbarkeit von ZON hängt darüber hinaus auch von der Freisetzung des Toxins aus der Futtermatrix während der Ingestapassage durch den Verdauungstrakt ab.

Um Informationen zur Absorptions- und Ausscheidungskinetik von ZON aus natürlich kontaminiertem Weizen zu erhalten, wurden 2 Versuche an wachsenden Broilern durchgeführt. Die Tiere erhielten eine einmalige orale Gabe einer Futtermischung, die 66 % kontaminierten Weizen (406 µg ZON/kg Weizen) enthielt. Die Tiere eines jeden Versuches wurden in 2 Gruppen eingeteilt, von denen eine das Versuchsfutter ohne und die andere mit Zusatz eines Detoxifikationsmittels erhielt. Im Versuch 1 enthielt das Futter zusätzlich Chromoxid als unverdaulichen Marker. Die Exkremente wurden bis 48 h nach Beendigung der ZON-Gabe zu verschiedenen Zeitpunkten quantitativ gesammelt. Im Versuch 2 erfolgte während des gleichen Zeitraumes zu verschiedenen Meßpunkten die Gewinnung venösen Blutes sowie von Gallenflüssigkeit.

In Blutplasma, Gallenflüssigkeit sowie in den gefriergetrockneten Exkrementen erfolgte die Untersuchung auf ZON (NG 10 ng/g) sowie die Metaboliten alpha-Zearalenol (NG 5 ng/g), beta-Zearalenol (NG 18 ng/g), Zeralanon (NG 180 ng/g), alpha-Zearalanol (NG 180 ng/g) sowie beta-Zearalanol (NG 360 ng/g) nach der vom VDLUFA herausgegebenen Methode (Methodenbuch III). In den verschiedenen Proben konnten nur ZON und alpha-Zearalenol (alpha-ZOL) nachgewiesen werden.

Aus den kumulativen Markerausscheidungskurven wurde eine mittlere Verweildauer der Ingesta im Verdauungstrakt von 5 h abgeleitet. Ein Einfluss des Detoxifikationsmittels war nicht feststellbar. Der Zeitpunkt der maximalen Markerausscheidungsrate war nach ca. 2 h erreicht. Für die Ausscheidung von ZON und alpha-ZOL (als Summe) wurde dieser Zeitpunkt nach 6,5 h festgestellt, wobei auch hier kein Einfluss des Detoxifikationsmittels vorlag. Die kumulative Ausscheidung des Markers betrug nach 48-stündiger Versuchsdauer unabhängig von der Behandlung 99 % der Markeraufnahme, während die von ZON und alpha-ZOL (als Summe) 61 % und 55 % der ZON-Aufnahme in der unsupplementierten bzw. in der supplementierten Gruppe ausmachte. Aus der regressiven Auswertung dieser Daten ließ sich weiterhin ableiten, dass 50 % der maximalen Ausscheidung in einem Zeitraum bis 14 h bzw. 15 h erfolgte, während nach 26 h bzw. 36 h 50 % der aufgenommenen ZON-Menge als ZON und alpha-ZOL ausgeschieden wurden. Die kumulative Ausscheidung an alpha-ZOL wurde mit 15 % und 14 % der ZON-Aufnahme in der unsupplementierten bzw. der supplementierten Gruppe festgestellt.

Weder für Plasma noch für Gallenflüssigkeit wurde ein Einfluss des Detoxifikationsmittels nachgewiesen. Im Plasma wurden ZON und alpha-ZOL ab 3,5 h nach Beendigung der ZON-Aufnahme festgestellt. Ein Zeit-Konzentrationsverlauf war nicht feststellbar. In der Gallenflüssigkeit wurde bereits nach 2 h ein deutlicher Konzentrationsanstieg registriert. Die Maximalkonzentrationen traten im Zeitraum von 4 h bis 7 h nach Beendigung der ZON-Gabe auf. Nach 48-stündiger Versuchsdauer war die Konzentration erreicht, die zu Beginn der Untersuchung festgestellt wurde.

Aus den Untersuchungen kann geschlußfolgert werden, dass ZON aus natürlich kontaminiertem Weizen beim Broiler rasch absorbiert sowie biliär, faecal und renal eliminiert wird. Ein Einfluß des Detoxifikationsmittels wurde auf die kumulative 48-stündige Ausscheidung von ZON und alpha-ZOL nachgewiesen.

Analytik

Poster zu diesem Thema:

P21: Entwicklung eines immunchemischen Schnelltestverfahrens zum Multimykotoxinnachweis. Mayer, B.; Schneider, Elisabeth; Usleber, E.; Dietrich, R.; Bürk, C. und E. Märtlbauer (München)

P22: Fumonisingehalt von extrudiertem Mais und Cornflakes – untersucht mit verschiedenen analytischen Methoden. Meister, Ute (Bergholz-Rehbrücke):

P23: Fast method for screening of trichothecenes in fungal cultures- using GC-MS/MS . Nielsen, K. Fog (Lyngby, Dänemark)

Trichothecene und Zearalenon: Stand der Analytik in Europa

Rudolf Krska
Interuniversitäres Forschungsinstitut für Agrarbiotechnologie (IFA-Tulln), Abteilung Analytikzentrum, Konrad-Lorenzstraße 20, A-3430 Tulln, Österreich

Aufgrund der wirtschaftlichen Verluste, die von *Fusarium* Mykotoxinen in Getreide ausgehen und dem zunehmenden Problembewußtsein der Konsumenten für Kontaminanten in Getreideprodukten, kommt auch der Analytik von *Fusarium* Mykotoxinen und der Qualitätssicherung in diesem Bereich eine immer größere Bedeutung zu. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung von Lebens- und Futtermitteln und der damit verbundenen arbeitsaufwendigen Probenvorbereitung wurden neue, schnelle Methoden zur Probenaufreinigung in der Mykotoxinanalytik entwickelt und eine Reihe von externen Qualitätssicherungsmaßnahmen auf EU-Ebene ins Leben gerufen.

Zur sensitiven Bestimmung von DON (µg/kg-Bereich) kommen hauptsächlich gaschromatographische (GC) Methoden mit Elektroneneinfangdetektor (ECD) oder massenspektrometrischer Detektion (MS) zum Einsatz. In vielen Labors kommen jedoch auch Reversed-Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) mit Diodenarraydetektoren (DAD) zur Anwendung. Klassische Clean-up-Methoden, wie z.B.: Säulenchromatographie und flüssig/flüssig Extraktion sind sehr zeit- und arbeitsintensiv. Daher wurden große Anstrengungen unternommen neue, einfachere und selektivere Clean-up-Techniken zu entwickeln. Dazu gehören die sogenannten Mycosep oder multifunktionalen Säulen für die Mykotoxinanalytik sowie die Immunoaffinitätssäulen, die für eine breite Palette von biogenen und anthropogenen Kontaminanten entwickelt wurden.

Gerade auf dem Gebiet der Mykotoxinanalytik herrscht enormer Nachholbedarf an externen Qualitätssicherungsmaßnahmen, wie z.B. die Veranstaltung von Laborvergleichstest oder die Verfügbarkeit von zertifizierten Referenzmaterialien. Die bisherigen wenigen Vergleichsstudien für Fusarientoxine innerhalb der EU ergaben zum Teil gewaltige Streuungen der Analysenresultate zwischen den Labors (z.B. 180 - 1100 µg DON / kg Weizen nach Eliminierung von Ausreißern).

Die Ergebnisse, die in bisherigen Ringversuchen erhalten wurden, zeigen klar die Notwendigkeit weiterer Laborvergleichstests im Bereich der DON- und ZON-Analytik auf, um die Qualität der Analysendaten zu verbessern. Aufgrund deren Relevanz für die Landwirtschaft wurde das Problem der DON- und ZON-Analytik bereits in mehreren Forschungsprojekten der Europäischen Kommission aufgegriffen und sowohl Initiativen zur Herstellung von zertifizierten Referenzmaterialien als auch zur Entwicklung von genauen Methoden zur Bestimmung dieser Fusarientoxine gestartet. Auch darüber soll im Vortrag berichtet werden.

Im Bereich der analytischen Methodenentwicklung ist aufgrund der immer größer werdenden Probenanzahl in Zukunft mit einer intensiven Weiterentwicklung und Anwendung von Immunoassays zu rechnen. In den letzten Jahren ist auch ein Trend in Richtung LC-MS-Kopplungen beobachtbar, wo versucht wird mit einem minimalen Aufwand an Probenvorbereitung maximale Information über die Konzentration und Identität von Mykotoxinen in Getreideproben zu erhalten.

Laborvergleichtests für die Verbesserung der Zearalenon-Analytik in Europa

Ralf Josephs und Rudolf Krska
IFA Tulln, Abt. Analytikzentrum, Konrad-Lorenz-Str. 20, A-3430 Tulln, Austria

Der Schimmelpilzbefall von Lebens- und Futtermitteln stellt ein weltweites Problem dar. In gemäßigten und warmen Regionen wird ausserdem das Mykotoxin Zearalenon (ZON), ein von Schimmelpilzen gebildetes sekundäres Stoffwechselprodukt, durch verschiedene *Fusarium* spp. produziert.

Zahlreiche Studien zum Vorkommen von Mykotoxinen haben gezeigt, dass das ZON neben den Trichothecenen zu den häufigsten in Europa auftretenden Fusarientoxinen zählt. ZON ruft Krankheiten bei Menschen und Tieren hervor. Insbesondere die östrogene Wirkung kann Fruchtbarkeitsstörungen verursachen und führt damit weiter zu Problemen in der Tierzucht, besonders in der Schweinezucht.

Die ZON Kontamination von Lebensmitteln und das damit verbundene Risiko wird in Zukunft ein wichtiges Qualitätskriterium im Handel (z.B. für Mais) sein und wird bereits von den Behörden einiger Länder reglementiert.

ZON gehört zu den am häufigsten analysierten Mykotoxinen, wobei Analysen auch zunehmend routinemäßig von einigen Lebens- und Futtermittelfirmen intern durchgeführt werden.

Quantitative analytische Verfahren zur Bestimmung von ZON basieren hauptsächlich auf Umkehrphasen-Hochleistungschromatographie (RP-HPLC) und Fluoreszensdetektion. Während bei den verwendeten Probenvorbereitungsmethoden die klassische flüssig/flüssig-Extraktion zusehends durch die Verwendung von Immunoaffinitätssäulen verdrängt wird.

Um die Vergleichbarkeit und Rückführbarkeit von Meßergebnissen gewährleisten zu können, werden im Zuge eines 4-jahrigen Projektes des „Standard, Measurement and Testing" Programmes der EC zertifizierte Referenzmaterialen (CRM) für ZON hergestellt. Eine ZON Standardlösung in Acetonitril wurde bereits auf Basis der Herstellung zertifiziert und in den ersten Ringversuchen erfolgreich eingesetzt.

Im weiteren Verlauf dieses Projektes wurde die Leistungsfähigkeit der analytischen Methoden der einzelnen Teilnehmer durch Ringversuche überprüft und verbessert. Die Ergebnisse des ersten Ringversuches zeigten deutlich, dass die Herstellung und der Einsatz einer gemeinsamen ZON Standardlösung die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erhöhten. Die Studie verdeutlicht auch das Problem kontaminationsfreien Mais zu finden, der als Blindwertmaterial verwendet werden kann.

Der zweite Ringversuch zeigte unter anderem, dass auch die Labormittelwerte für natürlich ZON kontaminierten Mais eine hohe Präzision aufweisen. Ferner wurde die Injektionsreproduzierbarkeit der RP-HPLC-Methoden überprüft, wobei die Kriterien ebenfalls vom Gros der Teilnehmer erfüllt wurden.

Nach diesen vorausgehenden Ringversuchen soll ein kontaminationsfreier (< 5 µg/kg ZON in Mais) und ZON kontaminierter Mais von den leistungsstärksten europäischen Mykotoxinlaboratorien zertifiziert werden.

Zur simultanen Bestimmung von Aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2, Ochratoxin A und Zearalenon

Roswitha Göbel, Detlef Bohm und Marlis Grunow

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

In Getreide- und Futtermitteln ist 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. Für eine kombinierte Analytik der genannten Mykotoxine gibt es in der Literatur nur wenige Hinweise.
Ziel der Untersuchungen war es, sowohl ein geeignetes Extraktionsmittel für die genannten Mykotoxine zu finden, als auch eine gemeinsame Reinigung und Detektion zu ermöglichen.
Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass eine gemeinsame Detektion der Mykotoxine mit HPLC mittels Gradientenelution und Fluoreszenzwellenlängenschaltung möglich ist.
Zur Extraktion von Getreideproben wurden Acetonitril bzw. Acetonitril-Wasser-Mischungen eingesetzt. Mit Schwierigkeiten war die Reinigung der Extrakte verbunden. Eine Reinigung von Getreideextrakten mittels Gelchromatographie führte nicht zu sauberen Extrakten; durch Reinigung an Silicagel-Festphasen konnten saubere Extrakte gewonnen werden. Während diese Reinigung über Festphasen bei reinen Mykotoxinlösungen hohe Wiederfindungsraten ergab, konnten beim Einsatz von Getreideproben, denen die genannten Mykotoxine zugesetzt wurden, vor allem für die Aflatoxine nur sehr schlechte Wiederfindungsraten ermittelt werden.
Aussichtsreicher für die Reinigung scheint der kombinierte Einsatz von Immunoaffinitätssäulen (AflaOchra- und ZEA-Säulen) zu sein. Über die Ergebnisse wird berichtet.

Wirkungen von Mykotoxinen auf das Immunsystem – gibt es den Prüfparameter?

Heike Köhler und Günter Müller
Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Fachbereich 4, Jena, Naumburger Straße 96a, 07743 Jena

Das Immunsystem spielt eine entscheidende Rolle bei der Erkennung von Fremdantigenen (z. B. von Infektionserregern oder entarteten Zellen) und ihrer Eliminierung aus dem Organismus. Dysregulationen der Immunantwort führen zum einen zu Immunsuppressionen, die sich u.a. in vermehrten, schwereren oder verlängerten Infektionen oder der Entwicklung von Tumorerkrankungen äußern können. Andererseits sind auch überschießende Immunreaktionen möglich, die als Allergien oder Autoimmunerkrankungen in Erscheinung treten. Da eine Reihe von Mykotoxinen unter anderem auch immuntoxische Effekte zeigen, verdienen sie als mögliche Wegbereiter o.a. Erkrankungen eine stärkere Beachtung.

Zur Erkennung und Charakterisierung immuntoxischer Wirkungen sind klinische Veränderungen jedoch nur unzureichend geeignet, da sie meist nur nach Aufnahme hoher Toxindosen auftreten und in ihrer Symptomatik wechseln können.

Es stehen aber eine ganze Reihe von Ex-vivo- und In-vitro-Methoden zur Verfügung, mit denen einzelne Funktionen des Immunsystems untersucht werden können, so z.B. die Infektabwehr als solche mit Hilfe von Immunisierungen und Modellinfektionen, die humorale Immunantwort anhand des Antikörpertiters oder des Prozentsatzes Antikörper-produzierender Zellen gegen Modellantigene, die T-Zell-Antwort mittels mitogenstimulierter Lymphozytenproliferation, der Expression von Aktivierungsmarkern und der Produktion bestimmter T-Zell-Zytokine, die Phagozytenfunktion anhand der Bildung freier Sauerstoffradikale und der Phagozytoseaktivität sowie der Bildung bestimmter Monozyten- oder Makrophagen-abhängiger Zytokine u.a.m..

Unsere eigenen Untersuchungen zur immuntoxischen Wirkung von Ochratoxin A (OTA) und weiteren Metaboliten OTA-produzierender Pilze ergaben, dass die einzelnen Funktionen des Immunsystems in unterschiedlicher Weise beeinflusst werden. Wir stellten deutliche tierartliche (Maus, Schwein) und konzentrationsabhängige Unterschiede fest. So führten hohe Konzentrationen an OTA bei der Maus (1 – 6 mg/kg KM/d) überwiegend zu einer Suppression der von uns untersuchten Parameter. Im Vergleich dazu wurden beim Schwein nach Applikation annähernd praxisrelevanter Dosen (7 – 50 µg/kg KM/d) einerseits immunmodulatorische Effekte auf Funktionen von neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen beobachtet, andererseits kaum Effekte auf die B- und T-Lymphozyten-Funktion festgestellt.

In-vitro-Tests an isolierten Immunzellen oder permanenten Lymphozyten- oder Monozyten-Zelllinien ermöglichen es, einzelne Effektor- oder Regulatorfunktionen detaillierter zu untersuchen. Als besonders empfindlich erwies sich die Freisetzung verschiedener proinflammatorisch und regulativ wirksamer Zytokine (IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-2, IL-4, IL-5, IL-8), die bereits durch sehr niedrige Mykotoxinkonzentrationen (<100 ng/ml) beeinflusst wurde. Dabei wiesen wir sowohl hemmende als auch stimulierende Effekte nach.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es den einen Parameter zur Beurteilung einer immuntoxischen Wirkung von Mykotoxinen aufgrund der Komplexität immunologischer Vorgänge nicht gibt. Es müssen immer verschiedene Aspekte der Immunantwort untersucht werden. Auf diese Weise kann man die für die einzelnen Mykotoxine charakteristischen Wirkungsweisen erkennen und besonders empfindliche Immunfunktionen identifizieren.

Empfindliche und selektive Bestimmung der A-Trichothecene mittels HPLC-APCI-MS

B. Cecon, B. Rabus, J. Böhm und E. Razzazi

Institut für Ernährung / Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1 / A-1210 Wien

Die A-Trichothecene (A-TCT) gehören zu den besonders toxischen Stoffwechselprodukten der Fusarien. Einige Vertreter dieser Gattung wie *F. poae, F. acuminatum* und *F. sporotrichioides* sind im Stande eine Reihe der A-Trichothece zu biosynthetisieren.

Die toxische Wirkung der A-TCT beruht auf der Hemmung der Proteinbiosynthese auf DNA bzw. mRNA-Ebene. Die immunsupressive Wirkung infolge verminderter Antikörperbildung bei verschiedenen Versuchstieren wird dieser Gruppe der Fusarientoxine zugeschrieben. Klinische Symptome äußern sich in Schleimhaut- und Hautnekrosen und bei Geflügel in Verminderung der Legeleistung und Schlupfraten. Auch kanzerogene, mutagene und teratogene Wirkungen der A-TCT wurden in der Literatur beschrieben. In verschiedenen Getreidesorten besonders in Hafer und Weizen, konnten immer wieder die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe der Fusarientoxine (T-2 Toxin, HT-2, DAS) nachgewiesen werden. Die Belastung der Futtermittel, speziell Hafer, mit A-TCT wurde in den letzten Jahren öfters festgestellt und führte in der Pferdehaltung zu großen Problemen.

In der Routineanalytik der A-TCT wird hauptsächlich Gaschromatographie in Kombination mit ECD und MS angewendet. Die genannten Methoden sind, da die Verbindungen vorher derivatisiert werden müssen, mit großem Aufwand verbunden. Die Verwendung der HPLC ist wegen der fehlenden charakteristischen Absorption der A-TCT mit Sensitivitätsproblemen verbunden, da die Detektion im unteren UV-Bereich erfolgt. In den letzten Jahren hat die Kombination der HPLC mit dem Massenspektrometer als ein selektiver, empfindlicher und spezifischer Detektor immer mehr an Bedeutung gewonnen. Das am meisten verwendete Kopplungsystem (Interface) in der HPLC-MS für die niedermolekulare Substanzen ist in erster Linie „Atmospheric Pressure Ionization Interface" (APCI), aber auch „Electrospray Interface" hat in letzter Zeit immer wieder Anwendung gefunden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode zur Analyse der Mykotoxine T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Diacetoxyscirpinol und Acetyl-T2 Toxin in verschiedenen Matrizes (Hafer, Weizen, Fermentationssuspension,...) erarbeitet.

Im Zuge der Optimierung der Methode wurde der Einfluß verschiedener LC und MS Parameter auf die Empfindlichkeit und Fragmentierungsmuster der getesteten Mykotoxine im APCI-Modus untersucht.

Für alle untersuchten Substanzen wurde eine intensive Fragmentierung beobachtet. Das Fragmentierungsmuster ist aber sehr stark von der Cone-Spannung und Vernebelungstemperatur abhängig. Zusätzlich wurde der Einfluß der Ammoniumacetatkonzentration auf die Empfindlichkeit des APCI-Interfaces untersucht.

Die Proben wurden mit einer Mischung aus Acetonitril und Wasser (84:16) extrahiert. Probenaufarbeitung und Clean-up erfolgte in zwei Schritten mit Hilfe der Mycosep®-Säulchen.

Für die Screeningversuche wurde eine schnelle isokratische HPLC-Methode entwickelt, die nur für die Trennung von DAS und T-2 Toxin in Biodegradationsstudien herangezogen wurde. Eine zweite HPLC-Methode basierend auf einem Gradientensystem wurde für die Trennung aller Mykotoxine der A-Trichothecengruppe in Hafer und Weizen entwickelt. Eine Microbore Säule (2.1x125 mm) auf RP Basis und mit einer Flußrate von 0,3 ml/min ohne Split wurde mit dem APCI-Interface gekoppelt. Im Gegenteil zu den B-Trichothecenen,

zeigten alle A-TCT im positiven Modus eine höhere Ionenausbeute als im negativen Modus. Die Quantifizierung erfolgte SIM Modus mittels Molekülpeaks und der Hauptfragmente. Die entwickelte Methode weist eine sehr gute Linearität, Wiederfindungsrate und Reproduzierbarkeit auf.

Anwendung eines PCR-Nachweises für Trichothecen-bildende *Fusarium*-Arten an DON-belasteten Weizenproben

Sandra Knoll*, Ludwig Niessen und Rudi F. Vogel
TU München, Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, Weihenstephaner Steig 16, 85350 Freising

Zum Nachweis von Trichothecen-bildenden *Fusarium*-Arten mittels PCR stehen inzwischen verschiedene species-spezifische Primerpaare zur Verfügung. Um einen allgemeinen Überblick über das Vorhandensein von Trichothecen-Bildnern in Getreideproben zu erhalten, kann man jedoch auch gruppenspezifische Primer verwenden, die von der Sequenz des *tri5*-Gens abgeleitet wurden. Das Produkt des *tri5*-Gens, die Trichodienzyklase, hat in der Biosynthese von Trichothecenen eine Schlüsselfunktion.

Das Ziel der Arbeiten war die Entwicklung einer schnellen und zuverlässigen Nachweismethode, die eine gruppenspezifische Analyse von Trichothecen-Bildnern mit dem artspezifischen Nachweis der wichtigsten Deoxynivalenol-Produzenten (*F.graminearum* und *F.culmorum*) in einer Triplex-PCR verbindet. Anhand vergleichender Untersuchungen DON-belasteter Getreideproben sollte die Aussagefähigkeit der verwendeten PCR-Methode hinsichtlich der Toxinbelastung überprüft werden.

Die Sensitivität der Triplex-PCR wurde an einem äquimolaren Mix von *F.graminearum* und *F.culmorum* getestet. Die Nachweisgrenze lag mit $8{,}6*10^{-5}$ µg DNA pro Ansatz in einem Bereich, der für den Nachweis von *Fusarium*-Arten in belastetem Probenmaterial ausreichend ist. Die Spezifität wurde an 19 Trichothecen-bildenden *Fusarium*-Arten getestet. Die artspezifischen Primerpaare zeigten nur bei *F.graminearum* und *F.culmorum* ein PCR-Signal. Das gruppenspezifische Primerpaar Tox5-1/Tox5-2 zeigte bei allen Arten ein Signal. Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurde die PCR mit einer Reihe von DNA aus Pilzen, Bakterien und Getreidepflanzen getestet. Hier wurde in keinem Fall ein PCR-Fargment gebildet.

DNA aus 32 Weizenproben, die mit DON belastet waren und die mykologisch untersucht worden waren, wurde mit der Triplex-PCR amplifiziert.

Der Vergleich mit den mykologischen Daten zeigte eine Übereinstimmung von 90 % bei der Gruppe der Trichothecen-Bildner und bei *F.graminearum*. Es gab keine falsch positiven Signale. Bei den falsch negativen Ergebnissen handelte es sich um Proben, bei denen der *Fusarium*-Befall unter fünf Prozent lag. Die Nachweisgenauigkeit von *F.culmorum* war mit 80% geringer als für *F.graminearum*.

In allen Proben, die Deoxynivalenol-Werte ab ca. 400 ppb aufwiesen wurde ein PCR-Signal beobachtet. Die Signalintensität sowohl der gruppenspezifischen PCR als auch der für *F.graminearum* spezifischen PCR erhöhte sich mit der Zunahme des DON-Gehaltes. Bei *F.culmorum* zeigte sich kein entsprechender Zusammenhang.

Quantifizierung von Mykotoxinbildnern mittels Real-Time-PCR

Angelo Bagnara und Rolf Geisen

Bundesforschungsanstalt für Ernährung
Haid-und-Neustr. 9
76131 Karlsruhe

In den letzten Jahren sind einige spezifische PCR Reaktionen zum Nachweis von mykotoxinbildenden Pilzen beschrieben worden. Diese Methoden haben den Vorteil, dass sie im Gegensatz zum konventionellen Verfahren wesentlich schneller Ergebnisse liefern und das sie sehr spezifisch sein können. Ein Nachteil der bis jetzt beschriebenen Systeme ist die Tatsache, das es sich um qualitative Methoden handelt, die nichts über die Höhe der Kontamination aussagen.
Für aflatoxinbildende Pilze wurde ein Real-Time-PCR System entwickelt, das zur Quantifizierung von aflatoxinogenen Schimmelpilzen geeignet ist. Eine Voraussetzung für ein quantifizierbares PCR System ist die Verfügbarkeit von konservierten Zielsequenzen, da Sequenzvariationen die Quantifizierung stark verfälschen können. Unter diesem Aspekt wurden zwei Gene aus dem Aflatoxinbiosyntheseweg, das *aflR* Gen und das *nor1* Gen, näher untersucht. Durch PCR-RFLP und Southern Blotting konnte gezeigt werden, dass das *aflR* Gen in *A. flavus* eine hohe Sequenzvariabilität aufweist, während das *nor1* Gen wesentlich konservierter ist. Aus diesem Grund wurde das *nor1* Gen als Zielsequenz für die Real-Time-PCR gewählt. Mittels dieses Systems konnte die Kopienzahl des *nor1* Gens in gereinigten DNA Lösungen von *A. flavus*, sowie in kontaminierten pflanzlichen Produkten ermittelt werden. Die erhaltenen Kopienzahlen des *nor1* Gens wurden mit der vorhandenen Lebendkeimzahl (cfu) miteinander verglichen.

Poster

P1:

Untersuchungen zum Fusarientoxingehalt von ökologisch und konventionell angebautem Getreide aus Thüringen

Susanne Döll[1], Hana Valenta[1], U. Kirchheim[2], S. Dänicke[1] und G. Flachowsky[1]

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

[2] Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft (TLL), Ricarda-Huch-Weg 20, 07743 Jena

In der Literatur werden Einflüsse des Klimas sowie ackerbaulicher Maßnahmen auf die Infektion von Getreide mit Fusarien und die Mykotoxinproduktion beschrieben. Im vorliegenden Beitrag wurde anhand von 265 aus Thüringen stammenden Getreideproben des Erntejahres 1998 der Einfluß der Anbauart (ökologisch/konventionell) auf die Belastung mit Fusarientoxinen untersucht. Die Proben, die von der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft zur Verfügung gestellt wurden, bestanden aus 150 Winterweizen- und 50 Winterroggenproben aus konventionellem Anbau aus der "Besonderen Ernteermittlung" (BEE) sowie aus 46 Winterweizen- und 19 Winterroggenproben aus ökologischem Anbau. Zu den BEE-Proben konnten Angaben zu Herkunft (Landkreis), Sorte, Erntezeitpunkt, Trockensubstanzgehalt und Tausendkornmasse sowie die meteorologischen Daten der Monate Mai bis September der jeweiligen Regionen beschafft werden.

Deoxynivalenol (DON) wurde in allen Weizen- und Roggenproben mit einem kompetitiven ELISA mit einer Nachweisgrenze von 110 µg/kg bestimmt. Zearalenon (ZON) wurde nur in den Weizenproben mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion mit einer Nachweisgrenze von 2 µg/kg bestimmt und die positiven Befunde wurden mit einem ELISA abgesichert. Ein Teil der ZON-Analysen von BEE-Weizen erfolgte in der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, und die Ergebnisse wurden zur Verfügung gestellt. Da die Nachweisgrenze der hier verwendeten Methode 20 µg/kg betrug, wurden alle Zearalenonanalysen einheitlich mit dieser Nachweisgrenze ausgewertet.

DON wurde in 69% der Winterweizenproben aus konventionellem Anbau mit im Mittel 1540 µg/kg T nachgewiesen. Beim Winterweizen aus ökologischem Anbau waren 54% der Proben mit DON belastet; sie enthielten im Mittel 760 µg/kg T und damit statistisch signifikant ($p<0,05$) weniger DON als die Proben aus konventionellem Anbau. Beim Deoxynivalenol im Winterroggen zeichnete sich dieser Trend ebenfalls ab. ZON wurde - auch auf Grund der hohen Nachweisgrenze - insgesamt nur in 11 Weizenproben mit im Mittel 69 µg/kg T nachgewiesen, wobei tendenziell auch hier die "Öko"-Proben weniger belastet waren. Die insgesamt hohen DON-Konzentrationen entsprechen den im Jahr 1998 auch in anderen Regionen Deutschlands ermittelten Daten. Eine ebenso starke Kontamination mit Zearalenon trat, vermutlich auch durch die termingerechte Ernte dieses Getreides, nicht ein.

Die Auswertung der DON-Gehalte von Winterweizen aus konventionellem Anbau (BEE) ergab große regionale Unterschiede in der Häufigkeit sowie Stärke der Kontamination. Auch im Bezug auf die verschiedenen Sorten zeigten sich erhebliche Unterschiede bei den Deoxynivalenolgehalten. Da zu den "Öko"-Proben keine Informationen über die Standorte und Sorten vorlagen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die niedrigere Mykotoxinbelastung der "Öko"-Proben auch regional bedingt war. Zur Aufklärung der Unterschiede in der Mykotoxinbelastung von konventionell und ökologisch angebautem Getreide bedarf es deshalb weiterer Untersuchungen unter definierten Bedingungen.

P 1a:

Schadwirkung und Mykotoxinbildung von *Fusarium culmorum*

Anja Schade-Schütze, James Muthomi, Erich-Christian Oerke und Heinz-Wilhelm Dehne
Institut für Pflanzenkrankheiten, Universität Bonn, Nussallee 9, 53115 Bonn

In mehrjährigen Untersuchungen wurde das Auftreten von *Fusarium*-Arten und *Microdochium nivale* auf Flächen mit organischer und konventioneller Bewirtschaftung erfasst. Dabei wurde der Einfluss von Sorte, Düngung, und Fungizid-Anwendungen auf den Ährenbefall durch *Fusarium*-Arten und deren Auswirkungen auf die Mykotoxinbildung ermittelt.

Zur biologischen Charakterisierung der *Fusarium*-Arten wurde deren Pathogenität und Virulenz in entsprechenden Testsystemen erfasst. Verschiedene Isolate von *F. culmorum* wurden hinsichtlich ihrer Pathogenität, Virulenz und der Mykotoxinbildung differenziert. Die Ährenbonitur, die Veränderung des Tausendkorngewichtes (TKG) und die grundsätzliche Mykotoxinbelastung wiesen Gemeinsamkeiten auf. Im Verlauf der Untersuchungen zeigte sich, dass DON-produzierende Isolate von *F. culmorum* das TKG stärker reduzieren als Nivalenol-bildende .

P 2:

Untersuchung von Weizen sächsischer Herkunft auf Fusarien und die Toxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA)

Franziska Horn[1], Gudrun Hanschmann[2], Christine Gebhart[2], Angelika John[1], Henriette Mietke[2]

[1] Hochschule Anhalt, FB Landwirtschaft, Ökotrophologie, Landespflege, Strenzfelder Allee 28, 06406 Bernburg
[2] Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft, FB 10, Gustav-Kühn-Str. 8, 04159 Leipzig

Im Rahmen einer Diplomarbeit wurden Untersuchungen zum Vorkommen von Fusarien und den Haupttoxinen DON, ZEA und Nivalenol (NIV) auf 98 sächsischen Weizenproben der Ernte 1998 aus drei verschiedenen Versuchsanstellungen der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft durchgeführt. Die Untersuchung der Fusarienspezies erfolgte mit dem Plattengußverfahren modifiziert nach Beck. Das Toxin DON wurde sowohl mit einem Fast-ELISA-Test, als auch mit HPLC-MS, ZEA mit HPLC-Fluoreszenz und NIV ebenfalls mit HPLC-MS analysiert.

Die mittels ELISA und HPLC-MS gemessenen DON-Werte der natürlich und künstlich inokulierten Weizenproben korrelierten sehr gut miteinander, wobei der ELISA tendenziell höher Werte lieferte.

98% der untersuchten, natürlich infizierten Weizenproben waren mit Fusarien befallen, wobei *F.graminearum* am häufigsten (in 76% der Fälle) vorkam und bei der Hälfte der Proben einen Anteil von 91 bis 100% an der Fusariengesamtkeimzahl ausmachte.

Der DON-Gehalt des Weizens schwankte zwischen der Nachweisgrenze (111µg/kg DON/kg Weizen) und dem Höchstwert von 2200µg/kg. Der größte Teil der Werte lag jedoch unterhalb der Nachweisgrenze, und damit unter den in den meisten Ländern empfohlenen Richt-oder Toleranzwerten von 500-1000µg/kg Weizen.

Zwischen der Fusarienmenge und dem DON-Gehalt des Weizens war ein signifikanter Zusammenhang feststellbar.

Der DON-Gehalt des Weizens konnte vor allem mit tebuconazole- und metconazolehaltigen Fungiziden reduziert werden, wobei die effektivste DON-Senkung durch die Fungizide Caramba, Folicur, Folicur+Corbel und Pronto Plus erreicht wurde.

Die untersuchten Proben wiesen nur geringe Mengen an ZEA und NIV auf.

P3:

Fusarientoxine (DON, ZEA) in Lebensmitteln

Gerhard Thielert, Elisabeth Burgmaier-Thielert

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Sigmaringen,
Fidelis-Graf-Str., 72488 Sigmaringen

Das Chemische und Veterinäruntersuchungsamt Sigmaringen führte Untersuchungen von Lebensmitteln auf die Fusarientoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA) in einem zweijährigen Untersuchungs- und Forschungsprojekt, das vom Ministerium Ländlicher Raum, Baden-Württemberg, gefördert wurde, durch.

Das Untersuchungs- und Forschungsprojekt "Fusarientoxine in Lebensmitteln" im Rahmen des gesundheitlichen Verbraucherschutzes zielte darauf ab, durch Untersuchungen von Lebensmitteln aus dem Handel ein möglichst wirklichkeitsgerechtes Bild der Belastung der Lebensmittel und damit des Verbrauchers, dem diese Lebensmittel zum Verzehr zur Verfügung stehen, wiederzuspiegeln.

Für eine derartige Datensammlung musste zuvor eine geeignete, bedarfs- und praxisgerechte Verfahrensweise erarbeitet werden, damit die Analytik im Routinebetrieb sinnvoll eingesetzt werden kann. Die ausgearbeiteten Methoden sollten nach Abschluss des Projektes nahtlos in die Routineanalytik der amtlichen Lebensmittelüberwachung einfließen.

Nach Meldungen der Ernteerhebung traten Fusarientoxine besonders im Getreide der Ernte 1998 verstärkt auf, da zur Zeit der Blüte des Getreides, bei der das Infektionsrisiko mit Fusarien besonders hoch ist, die Witterung in Deutschland für Fusarien ideal (feucht und warm) war.

„Wie wirken sich die ungünstigen Bedingungen bei der Wachstumsperiode des Getreides später auf die Gehalte der Fusarientoxine im Lebensmittel aus, das der Verbraucher im Handel erhält?“ Diese Frage sollte im Forschungsprojekt beantwortet werden.

Die Ergebnisse der Untersuchung von Lebensmitteln aus dem Handel auf Fusarientoxine (DON, ZEA) werden vorgestellt.

P 4:

Mykotoxine im Hausstaub – ein unterschätztes Problem?

U. Rolle-Kampczyk[1], A. Müller[1], U. Diez[1], M. Rehwagen[1], Schwenke[2], G. Metzner[3], O.Herbarth[1]

[1]Umweltforschngszentrum Leipzig
[2]Gesundheitsamt der Stadt Leipzig
[3] Klinik für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Leipzig
und Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche Leipzig im Forschungsverbund

In den letzten Jahren entwickelte sich die Problematik häuslicher Schimmelpilzbelastungen zu einem immer mehr an Bedeutung gewinnenden Problem.

Bedingt durch sich verändernde bautechnische Gegebenheiten, die in Zusammenhang mit Energiesparmaßnahmen, Lärmschutz und Sanierungen stehen, verringerte sich die Luftwechselrate in den Wohnungen in den letzten Jahren deutlich. Baufehler und der zu frühe Erstbezug noch nicht ausgetrockneter neugebauter Häuser begünstigen das Schimmelpilzwachstum ebenfalls.
Außerdem wird durch leicht zugängliche Informationen verschiedener Medien die Bevölkerung gegenüber „Giften aus der Wohnumfeld" (zu denen die Schimmelpilzbelastung zählt) und deren möglichen Folgen für die Gesundheit, sensibilisiert. Damit läßt sich erklären, warum sich z. B. in Leipzig die Anfragen beim Gesundheitsamt zu dieser Problematik zwischen 1995 und 1999 verzehnfacht haben.
Aus der Literatur ist bekannt, daß bestimmte Mykotoxine neben organtoxischen und cancerogenen Wirkungen auch immunsuppressiv und schleimhautreizend wirken können. Als deren Folge resultieren möglicherweise unspezifische gesundheitliche Beschwerden.
In einem Pilotprojekt soll in Leipzig geklärt werden, ob sich Zusammenhänge zwischen den in den Wohnungen gefundenen Schimmelpilzspektren sowie von ihnen gebildete Sekundärmetaboliten (Mykotoxine und mikrobiell erzeugte flüchtige organische Verbindungen (MVOC)) und bereits aufgetretenen gesundheitlichen Beschwerden finden lassen.
Dabei stellt der Hausstaub das Untersuchungsmedium für ausgewählte Mykotoxine dar.

P 5:

Mykotoxine von luftgetragenen Fadenpilzen und ihre Relevanz für die Arbeitsplatz- und Umwelthygiene

Thißen, R., T. Müller, S. Braun, R. Schwalbe, E. Dohms, W. Dott und G. Fischer

Institut für Hygiene und Umweltmedizin, Universitätsklinikum Aachen, Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen

Die Wiederverwertung von organischem Abfall (Kompostierung) und Kunststoffverpackungen (DSD-Sammlung) bildet einen wichtigen Teil der kommunalen Abfallentsorgung. Der Prozess der Kompostierung ist vor allem auf die Aktivität von Fadenpilzen zurückzuführen, deren Sporen durch die Handhabung des Abfalls/Kompostes in die Luft gelangen. Die toxikologische Relevanz von Sekundärmetaboliten luftgetragener Fadenpilze in Abfallbehandlungsanlagen wird zur Zeit kontrovers diskutiert. Durch Anhaften von Lebensmittelresten kann es zur Vermehrung von Fadenpilzen auf dem DSD-Abfall kommen, so daß während der Sortierung und Weiterverarbeitung der Kunststoffe Sporen freigesetzt werden. Vorherrschend sind bei beiden Verfahrenstechniken toxinbildende Arten, wie *Aspergillus fumigatus* (Verruculogen, Gliotoxin, Fumitremorgin), *Emericella nidulans* (Sterigmatocystin), *Paecilomyces variotii* (Viriditoxin), *Aspergillus flavus* (Aflatoxin) und *Penicillium crustosum* (Penitrem A). In der vorliegenden Untersuchung soll geprüft werden, ob die Mykotoxine in den Sporen der Fadenpilze vorkommen und ob sie auf natürlichen Substraten gebildet werden.

Das Potential der einzelnen Spezies zur Bildung von Mykotoxinen wurde anhand von Frischisolaten in Reinkulturen untersucht. Native Stäube und Bioaerosole aus Kompostierungsanlagen wurden auf ein Vorkommen von Mykotoxinen getestet. Darüber hinaus wurden Materialproben aus einer Kunststoff-Recyclinganlage auf eine Besiedlung durch Fadenpilze untersucht. Die natürlich vorkommenden Fadenpilze wurden auf dem Kunststoff angereichert und auf eine Bildung von Sekundärmetaboliten untersucht. Die Analytik wurde mittels HPLC-DAD und Kopplung mit einem Fluoreszenzdetektor (FLD) durchgeführt.

Nach Extraktion von Myzel und Sporen der relevanten Fadenpilze wurde eine Reihe von Sekundärmetaboliten in Reinkulturen nachgewiesen. So bildeten *Aspergillus flavus* Aflatoxin B_1, *Penicillium crustosum* Penitrem A und *Aspergillus fumigatus* Fumitremorgin, Tryptoquivalin, Trypacidin und Verruculogen. Auf dem DSD-Material wurden verschiedene toxinogene Fadenpilze nachgewiesen, die durch Zugabe verschiedener Supplemente auf dem Material vermehrt wurden. Die Bildung von Mykotoxinen auf dem DSD-Abfall konnte bisher nicht nachgewiesen werden, es wurden jedoch in nativen Stäuben und Bioaerosolen Mykotoxine von *Aspergillus fumigatus* gefunden (Fischer *et al.* 1999).

Die toxikologische Relevanz von luftgetragenen Fadenpilzen in verschiedenen Umweltbereichen kann nur zuverlässig beurteilt werden, wenn man sowohl die auftretenden Fadenpilze, als auch deren Sekundärmetabolite qualitativ und quantitativ bestimmt. Mykotoxine luftgetragener Fadenpilze konnten auf *natürlichen* Substraten in der Abfallwirtschaft (Stäube und Bioaerosole in Kompostierungsanlagen) nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen werden zeigen, welche der beiden Abfallarten die Bildung von pilzlichen Stoffwechselprodukten fördert bzw. hemmt.

Die Untersuchungen werden von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU), Osnabrück, gefördert.

P 6:

Adsorption of Ochratoxin A, Deoxynivalenol and Zearalenone *in vitro* at different pH and adsorbents

Shehata, S. [1]; Richter, W.I.F.[2]; Schuster, M. [2]; Scholz, W. [2] and Nowar, M.S. [1]

[1] Dept. of Animal Prod., Fac. of Agric., Zagazig University, Zagazig, Egypt.
[2] Bayerische Landesanstalt für Tierzucht, Grub. Postfach 1180 85586 Poing.

The adsorptions of standards of 100 ppb Ochratoxin A (OTA), 30 ppm Deoxynivalenol (DON) and 30 ppm Zearalenone (ZEA) from 2.5 ml phosphate buffer (pH 3.0 and pH 7.0) and distalled water were studied *in vitro* after addition of 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 and 2.5 % (w/v) activated charcoal and four other adsorbents (AI – AIV). Adsorbent AI was 1.0, 2.5 and 5.0 % modified yeast cell wall + vitamin mixture + plant oil refined. AII was modified yeast cell wall. A III was bentonite + enzymes + modified yeast cell wall + vitamin E + trace elements. A IV was bentonite. The percentage of adsorption for OTA and ZEA were 100 % by 0.1 % activated charcoal, but DON adsorption ranged from 47 to 99 % depending on the concentration of charcoal and pH values. However, adsorption of DON by 0.5, 1.0 and 2.5 % charcoal did not differ significantly by different pH.

Adsorption of OTA by A I, A II and A III (1.0 and 2.5 %) was higher in buffer pH 7.0 and distalled water compared to buffer pH 3.0. A IV and 5.0 % A II showed an opposite trend. However, adsorption of OTA was by A II > A III > A IV (at pH 7.0 and water). The overall means for adsorption were higher by A II > A III > A IV > A I. Generally, the adsorption ranged from 15 to 60 % depending on kind and concentration of adsorbents and pH values. DON (30, 16 and 5 ppm) was not affected by A I, A II, A III and A IV.

The highest adsorption of ZEA was by A I, and the lowest adsorption by A III. The means of adsorption at different pH were by A I > A II > A IV (2.5 and 5.0 %) > A III. The overall means show the same trend. Generally, the adsorption ranged from 13 to 57 % .

P 7:

Ochratoxin A in Traubensaft und Wein

Katrin Woese

Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Sachsen-Anhalt, Freiimfelder Str. 66-67, 06112 Halle

Ochratoxin A (OTA) ist ein Sekundärstoffwechselprodukt des Schimmelpilzes *Aspergillus* ochraceus sowie weiterer Arten der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*. Es wirkt nephrotoxisch, ist carzinogen im Tierversuch an Nagetieren und besitzt teratogene, immunotoxische und möglicherweise neurotoxische Eigenschaften. OTA kann sich bei feuchtwarmer Lagerung auf Getreide, Nüssen, Kaffee, Kakao, Weintrauben, Trockenfrüchten und Gewürzen bilden. Da es über eine hohe Stabilität gegenüber Umwelteinflüssen verfügt, ist es auch in den Verarbeitungsprodukten der o. g. Lebensmittelgruppen zu finden.

Weintrauben sind, abhängig von den jährlichen Klimabedingungen und vom Erntezeitpunkt, oberflächlich mehr oder weniger stark von Schimmelpilzen besiedelt. Infolge der Technologie der Traubensaft- und Weinherstellung kann unter günstigen Bedingungen Ochratoxin A gebildet werden, das in den Endprodukten nachweisbar ist.

Im Rahmen von Schwerpunktuntersuchungen wurden im Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Halle 1999 und im 1. Quartal 2000 37 Traubensäfte und 21 Rotweine auf ihre Gehalte an Ochratoxin A geprüft. Für die quantitative Bestimmung des Mykotoxins kam dabei eine HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion nach vorhergehender Aufreinigung der Probenextrakte an Immunaffinitätssäulen zur Anwendung.

In 78% der Traubensäfte und 100% der Rotweine war Ochratoxin A bestimmbar; bei 27% bzw. 33% lag der Gehalt oberhalb der derzeit in der EU als Höchstmengen diskutierten Konzentrationen von jeweils 0,5 µg/l. Auffallend war die mit Literaturangaben übereinstimmende höhere Kontaminationsrate von Weinen aus südlichen Anbauregionen.

P 8:

Aflatoxicosis in rabbits: 3- Effectiveness of Egyptian raw bentonite in prevention or diminution the detrimental effects of aflatoxins-naturally contaminated diets on reproductive performance, blood biochemistry and digestibility in rabbits.

M.S. Nowar[1]; M.I. Abd El- Rahim[2]; M.N. El-Gaafary[2]; M.I. Tawfeek[2]; Zenate, A. Ibrahim[1] and Fatma, R. Abdallah[3].

[1] Department of Animal Production, Faculty of Agriculture.
[2] Department of Animal Wealth, Institute of Productivity,
[3] Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Zagazig University, Zagazig, Egypt.

Two experiments, using a total of 70 mature and growing New Zealand white (NZW) male and female rabbits were conducted to evaluate the effects of aflatoxin- naturally contaminated diet (AF diet) on reproductive performance, blood serum profile, nutrients digestibility and to determine the efficacy of different levels of Egyptian raw bentonite added to the AF- diet in preventing or reducing the negative - toxin induced effects. In experiment 1, 35 of females and 15 of males mature rabbits, 6 months old were assigned to one of five dietary treatments (7 does + 3 bucks for each): uncontaminated control (UC) diet, AF- diet without or with 1,2 and 3% bentonite. The experiment lasted until the obtainment of 5 parities from each doe rabbit. In experiment 2, 20 growing male rabbits (mean initial body weight of 1325g) were used in a 10 days digestibility trial. Rabbits were randomly distributed based on the body weight into five equal groups and were given one of the five diets used in the 1*st* experiment.

Rabbit fed AF-diet had a decreased physical semen characteristics of bucks and reproductive performance traits of does. Blood serum profiles of these rabbits revealed higher levels of the liver enzymes such as alkaline phosphatase and glutamate pyruvate transaminase, cholesterol, urea-N and creatinine and lower concentrations of total protein and albumin. Feeding the AF-diet reduced the feed intake, impaired the digestibility of all nutrients and feeding value of the diet. Addition of bentonite to the AF- diet improved in general the physical semen characteristics of buck and reproductive performance traits of doe rabbits, digestibility of all nutrients and restored serum clinical chemistry indicators to that exhibited by rabbits fed the control. The greatest numerical improvements in the previous traits were achieved when bentonite was added to the AF- diet at 1%. The study demonstrate that adding 1% of Egyptian raw bentonite to the AF- naturally contaminated rabbit diets can provide an effective, cheap and safe practical technique for prevention the aflatoxicosis in mature and growing rabbits.

P 9:

Aflatoxin B_1 in animal feeding stuff - results of an international validation study

J. Stroka[1], M. Reutter[2], C. von Holst[1] and E. Anklam[1]

[1]Food Products and Consumer Goods Unit, Institute for Health and Consumer Protection, Joint Research Centre of the European Commission, 21020, Ispra, Italy
[2]Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt, Institut für Tiergesundheit und Lebensmittelqualität der Landwirtschaftskammer Schleswig-Holstein, Gutenbergstrasse 75-77, D-24116 Kiel, Germany

A collaborative study was carried out to evaluate the effectiveness of an immunoaffinity column clean-up LC method for the determination of aflatoxin B_1 in animal feeding stuff at a possible future European regulatory limit (1 ng/g). The test portion of the sample is extracted with aceton-water (85 + 15 [v + v]). The sample extract is filtered, diluted with water and applied to an immunoaffinity column. The column is washed with water to remove the interfering compounds and the purified aflatoxin B_1 is eluted with methanol. The separation and determination of the aflatoxin B_1 is performed by reverse-phase high performance liquid chromatography (LC) and detected by fluorescence after post column derivatisation (PCD) involving bromination. PCD is achieved with either pyridinum hydrobromide perbromide (PBPB) or an electrochemical cell (Kobra cell) by addition of bromide to the mobile phase. The animal feeding stuff samples, both spiked and naturally contaminated with aflatoxin B_1, were sent to 23 laboratories in 14 different countries. Test portions of samples were spiked at levels of 1.2 ng/g and 3.6 ng/g for aflatoxin B_1. Recoveries ranged from 74 - 157 %. Based on results for spiked samples (blind pairs at two levels) as well as naturally contaminated samples (blind pairs at three levels) the relative standard deviation for repeatability (RSD_r) ranged from 5.9 % – 8.7 %. The relative standard deviation for reproducibility (RSD_R) ranged from 17.5 % – 19.6 %. The method showed acceptable within-laboratory and between-laboratory precision for this matrix, as evidenced by HORRAT values, at the target levels of determination for aflatoxin B_1.

P10:

Aflatoxin B_1 in baby food - results of an international validation study

J. Stroka[1], U. Jörissen[2], J. Gilbert[3] and E. Anklam[1]

[1]European Commission, DG Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, I-21020 Ispra (Italy)
[2]Dr. Wierz-Dipl.-Chem.Eggert-Dr. Jörissen GmbH, Stenzelring 14b, D-21107 Hamburg (Germany)
[3]Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, CSL York, Sandhutton, UK-Y04 1LZ York (United Kingdom)

A collaborative study funded by the European Commission, Standards, Measurement and Testing Programme (4th Framework Programme) was carried out to evaluate the effectiveness of an immunoaffinity column clean-up LC method for the determination of aflatoxin B_1 in baby food at a possible future European regulatory limit (0.1 ng/g). The test portion of the sample is extracted with methanol-water (8 + 2 [v + v]). The sample extract is filtered, diluted with water and applied to an immunoaffinity column. The column is washed with water to remove the interfering compounds and the purified aflatoxin B_1 is eluted with methanol. The separation and determination of the aflatoxin B_1 is performed by reverse-phase high performance liquid chromatography (LC) and detected by fluorescence after post column derivatisation (PCD) involving bromination. PCD is achieved with either pyridinum hydrobromide perbromide (PBPB) or an electrochemical cell (Kobra cell) by addition of bromide to the mobile phase . The baby food (infant formula) samples, both spiked and naturally contaminated with aflatoxin B_1, were sent to 14 laboratories in 13 different European countries. Test portions of samples were spiked at levels of 0.1 ng/g and 0.2 ng/g for aflatoxin B_1. Recoveries ranged from 101 – 92 %. Based on results for spiked samples (blind pairs at two levels) as well as naturally contaminated samples (blind pairs at three levels) the relative standard deviation for repeatability (RSD_r) ranged from 3.5 % – 14%. The relative standard deviation for reproducibility (RSD_R) ranged from 9 % – 23 %. The method showed acceptable within-laboratory and between-laboratory precision for this matrix, as evidenced by HORRAT values, at the target levels of determination for aflatoxin B_1.

P11:

Aflatoxins in various food matrices - results of an international validation study

J. Stroka[1], U. Jörissen[2], J. Gilbert[3] and E. Anklam[1]

[1]European Commission, DG Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, I-21020 Ispra (Italy)
[2]Dr. Wierz-Dipl.-Chem.Eggert-Dr. Jörissen GmbH, Stenzelring 14b, D-21107 Hamburg (Germany)
[3]Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, CSL York, Sandhutton, UK-Y04 1LZ York (United Kingdom)

A collaborative trial study funded by the European Commission, Standards, Measurement and Testing Programme (SMT) was conducted to evaluate the effectiveness of method for the determination of aflatoxin B_1 and total aflatoxins at European regulatory limits. This method was validated for four different food matrices (peanut butter, pistachio paste, dried fig paste and paprika powder).

The method comprises of extraction procedure, consequent clean-up using immunoaffinity columns and determination by high performance liquid chromatography (HPLC) using post-column derivatisation for fluorescence detection. The test portion is extracted with methanol-water (8+2) for dried figs and paprika, and with methanol-water (8+2) plus hexane (or cyclohexane) for peanut butter and pistachios. The sample extract is filtered, duluted with water and applied to an immunoaffinity column. The column is washed with water and the aflatoxins are eluted with methanol. Aflatoxins are quantified by reversed-phase liquid chromatography with post column derivation involving bromination. The bromination is achieved with either an electrochemical cell (Kobra cell) and addition of bromide to the mobile phase or pyridinum hydrobromide perbromide (PBPB). The detection is achieved by fluorescence.

Peanut butter, pistachio paste, dried fig paste and paprika powder samples, both naturally contaminated with aflatoxins and containing added aflatoxins were sent to 16 laboratories in 16 different European countries. Test portions of samples were spiked at levels of about 2 and 10 ng/g for total aflatoxins which included incorporation of amounts of about 1 and 4 ng/g of aflatoxin B_1, respectively. Recoveries for total aflatoxins ranged from 71 to 92 % with the corresponding recoveries for aflatoxin B_1 ranging from 82 to 109 %. Based on results for spiked samples (blind duplicates at two levels) as well as naturally contaminated samples (blind duplicated at four levels including blank) the relative standard deviation for repeatability (RSDr) ranged from 14 to 34% for total aflatoxins, and from 9 to 32 % for aflatoxin B_1. The method showed acceptable within-laboratory and between-laboratory precision for all four matrices, as evidenced by HORRAT values being $\delta 1$, at the low levels of determination for both total aflatoxins and aflatoxin B_1.

P12:

Aflatoxine in Verarbeitungserzeugnissen von Pistazien

Elisabeth Burgmaier-Thielert, Gerhard Thielert

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Sigmaringen,
Fidelis-Graf-Str., 72488 Sigmaringen

Als die EU im September 1997 ein Importverbot für Pistazien aus dem Iran aussprach, wurde es offenkundig, dass hier ein Lebensmittel vorliegt, das stark mit Aflatoxinen belastet sein kann.

Pistazien werden deshalb von der amtlichen Lebensmittelüberwachung einer konsequenten Überwachung unterzogen.

Das CVUA Sigmaringen hat auch Weiterverarbeitungsprodukte von Pistazien in diese Untersuchungen mit einbezogen. Die Weiterverarbeitungsprodukte sollten, wenn sie bei den Einfuhruntersuchungen in die EU bzw. bei den Eigenuntersuchungen der Hersteller konsequent untersucht worden sind, weitestgehend frei sein von Aflatoxinen.

Untersuchungen, die am CVUA Sigmaringen durchgeführt wurden, zeigen allerdings, dass hier dennoch hohe Belastungen vorgefunden werden können.

Bei den untersuchten Weiterverarbeitungsprodukten handelt es sich vorwiegend um Grundmassen (Halberzeugnisse) für die Speiseeisherstellung.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der vergangenen Jahre werden vorgestellt.

P13:

HPLC based method for the measurement of the reduction of aflatoxin B_1 by bacterial cultures isolated from different African foods.

P. Färber, R. Adam and W.H. Holzapfel

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

The consumption of fermented foods contaminated with aflatoxin B_1 is linked to aflatoxicosis. Aflatoxicosis is a serious problem in developing countries with environmental conditions appropriate for the biosynthesis of AFB_1 by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. In Africa, especially in Ghana and Nigeria, there is a very high risk of liver cancer which is caused by the consumption of AFB_1-intoxicated, traditionally fermented maize and sorghum products. It is suggested that one way to diminish this health risk might be the reduction of the AFB_1 concentration by bacteria, especially lactic acid bacteria. Therefore, a HPLC based method for the screening of bacterial starter cultures has been developed to assess their ability to reduce the AFB_1 concentration. The assessment of lactic acid bacteria originating from German and other European culture collections only showed a very slight reduction of AFB_1 from 3% to 12%. Screening experiments in which other bacterial genera and lactic acid bacteria, isolated from different African foods have been assessed, showed in most cases the same results. However, some of these bacterial strains caused a release of AFB_1 which was chemically bound before to components of the test medium and which therefore could not be extracted with chloroform.

P14:

Die Wirkung von niedriger und hoher Ochratoxin A Belastung im Futter auf die Kückenaufzucht

J. Grajewski[1], J. Böhm[2], Katarzyna Szczepaniak[1], Magdalena Twaruzek[1], Beata Skladanowska[1]

[1] Institut für Biologie und Umweltschutz, Pädagogische Hochschule, Chodkiewicza-Str. 30, PL 85-064 Bydgoszcz
[2] Inst. für Ernährung, Veterinärmedizinische Universität, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien

Verschiedene *Aspergillus* und *Penicillium* Stämme bilden als sekundäre Stoffwechselmetabolite Ochratoxine, von denen Ochratoxin A (OTA) aufgrund seines Vorkommens und seiner Toxizität die größte Bedeutung hat.

Eine natürliche OTA - Kontamination ist weltweit auf den verschiedensten pflanzlichen Substraten zu finden. Bisherigen Untersuchungen zufolge ist jedoch vor allem bei den stärkereichen Getreidearten mit einer vermehrten OTA - Kontamination zu rechnen. Daneben findet man OTA auch in Erbsen, Sonnenblumenschrot, Erdnüssen, Baumwollsaaten und Heu, aber auch in Kaffee, Wein und Paprika.

Aufgrund der Tatsache, dass OTA über das Futter in bestimmten Organen bzw. Geweben von Nutztieren angereichert wird, kann es auch zu einer OTA-Belastung von Lebensmitteln tierischer Herkunft kommen. Nach Aufnahme OTA-kontaminierter Futtermittel lassen sich insbesondere im Blut und den Nieren hohe Konzentrationen von OTA nachweisen.

In den bisherigen eigenen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass die OTA-Belastung im Falle der Kücken direkt mit ihrer Menge in den Futtermitteln verbunden ist. Ein nachteiliger Effekt wurde bereits bei 0,2 ppm OTA in den Futtermitteln, in denen zu 60 % natürlich mit *Penicillium verrucosum* kontaminierter Weizen eingesetzt wurde, festgestellt.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Wirkung niedriger (0,5 ppm) und hoher (5 ppm) Belastung mit künstlichem OTA auf die Kückenaufzucht untersucht, wobei die Weizenkörner im Alleinfutter nicht belastet waren.

In der dreiwöchigen Untersuchung wurden täglich die Lebendmassen erhoben, bei Versuchsende wurde eine pathoanatomische und pathohistologische Untersuchung der Kücken durchgeführt, sowie Blut- und Organproben genommen. Bestimmt wurde der OTA-Gehalt in Futter, Kot, Nieren und Leber sowie im Blutserum. Die OTA-Extraktion wurde mit Hilfe von Ochraprep-Säulen (Firma Rhone-Poulenc) durchgeführt. Danach wurde der OTA-Gehalt mittels HPLC bestimmt. Die Nieren wurden in Formlösung präpariert, mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt und pathohistologisch beurteilt.

Es wurde nachgewiesen, dass der Zusatz von 0,5 ppm künstlicher Ochratoxin A zum guten (nicht belastetem) Alleinfutter auf die Kückenaufzuchtergebnisse keine Wirkung hatte. Erst ein hoher Anteil von 5 ppm verursachte schlechtere Futterverwertung, schlechtere Mastergebnisse und pathologische Veränderungen.

P15:

Wirkung von Deoxynivalenol (DON) auf den Magen-Darm-Trakt männlicher Läuferschweine

Tanja Dillenburger[1], U. Lauber[1], M. Steffel[2], M. Schweiger[2], W. Amselgruber[2]

[1] Institut für Tierernährung (450), Universität Hohenheim, Emil-Wolff-Strasse 10, 70599 Stuttgart

[2] Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin (460), Fachgebiet Anatomie und Physiologie der Haustiere, Universität Hohenheim, Fruwirthstraße 43, 70599 Stuttgart

Nach vierwöchiger Belastung von männlichen Läuferschweinen durch orale Gaben von Deoxynivalenol (6000 µg DON/kg Futter; natürlich kontaminiertes Getreide) wurden Gewebeproben aus dem Magen, sämtlichen Darmabschnitten sowie von Leber und Niere zur histologischen Untersuchung entnommen.

Nach Fixierung in Methanol/Eisessig wurde das Gewebe in aufsteigender Alkoholreihe entfettet und anschließend in Paraffin eingebettet. Mittels Rotationsmikrotom wurden Serienschnitte hergestellt und auf Objektträger aufgezogen. Die Präparate wurden zur lichtmikroskopischen Auswertung mit Hämalaun-Eosin gefärbt.

Bei der Entnahme des Dünndarms belasteter Tiere waren bereits mit bloßem Auge Veränderungen der Mukosa (katarrhalische Duodenitis/Jejunitis) deutlich erkennbar.

Mikroskopisch waren hier und v.a. in der Magenschleimhaut focale, pathologische Veränderungen des Gewebes zu finden.

Erstaunlicherweise zeigten selbst diese hochbelasteten Tiere während des gesamten Zeitraums der Toxinverabreichung keine ersichtlichen Krankheitserscheinungen. Auch nach den Ergebnissen der Blutuntersuchungen war keine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens festzustellen.

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung werden im Kontext des gesamten Fütterungsversuches dargestellt.

P16:

Beeinflussung der Zytokinsekretion von Maus-Thymom-Zellen (EL-4) durch Ochratoxin A

Heller, M.; Köhler, H.; Rosner, H.; Burkert, B.; Rohrmann, B.; Möller, U.; Thierbach, S.; Kielstein, P.; Müller, G.

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Fachbereich 4: Naumburger Straße 96a, 07743 Jena

Ochratoxin A (OTA) ist weltweit in Nahrungs- und Futtermitteln in unterschiedlichen Konzentrationen nachweisbar. Neben akut toxischen sowie genotoxischen und kanzerogenen Wirkungen wurden in der Literatur auch immunmodulatorische Effekte des Toxins beschrieben. In eigenen *in-vivo*-Versuchen am Schwein stellten wir nicht nur hemmende sondern auch stimulierende Einflüsse auf bestimmte Infektionsabwehrmechanismen fest.

Ursache dafür könnte ein unterschiedliches Eingreifen von OTA in Immunregulationsprozesse auf der Ebene der Zytokinsynthese und -freisetzung sein.

In der vorliegenden Studie sollte deshalb in *in-vitro*-Versuchen an einer permanenten Zellinie der Einfluß von OTA auf eine Reihe vorwiegend proinflammatorisch wirkender Zytokine untersucht werden, wobei unser Interesse insbesondere dem subtoxischen Bereich galt.

Ausgehend von der Tatsache, daß OTA stets in Verbindung mit sekundären OTA-Metaboliten in Nahrungs- und Futtermitteln vorkommt, wurden in den Untersuchungen sowohl reines kristallines OTA als auch eine *Aspergillus-ochraceus*-Rohtoxinpräparation verwendet. Als permanente Zellinie kam die Maus-Thymom-Zelline EL-4 zum Einsatz. Diese T-Zellinie produziert nach Mitogen-Stimulation eine Reihe von Zytokinen, von denen in unsere Untersuchungen Interleukin (IL) 2, 4, 5 und 6 einbezogen wurden. Parallel zum Einfluß von OTA auf die Freisetzung dieser Interleukine ermittelten wir auch den zytotoxischen Effekt mittels MTT-Test.

Der zytotoxische Einfluß begann beim Rohtoxin bei einer wesentlich geringeren Konzentration als beim reinen OTA. Eine 50 %ige Wachstumshemmung (IC_{50}-Werte) lag beim Rohtoxin bei ca. 3 µg/ml bezogen auf den OTA-Gehalt und beim Reintoxin bei ca. 11 µg/ml vor.

Beide OTA-Präparationen führten mit zunehmender Konzentration auch zur Hemmung der Zytokinausschüttung, wobei die Hemmkonzentrationen sowohl bei beiden OTA-Präparationen als auch bei den einzelnen Interleukinen unterschiedlich ausfielen. Die IL-4- und IL-5-Ausschüttung wurde insbesondere durch Rohtoxin schon bei relativ geringen, subtoxischen OTA-Konzentrationen gehemmt (IC_{50}-Wert 1-2 µg/ml), wogegen die entsprechenden Werte für IL-2 und IL-6 4-6 µg/ml betrugen. Bei einigen Zytokinen konnte im subtoxischen Bereich ein stimulierender Effekt ermittelt werden (IL-2 und IL-6). Beim Rohtoxin betrug die Stimulierungskonzentration 1-2 µg/ml und beim Reintoxin 6-10 µg/ml.

Bei allen Untersuchungen wurden mit der OTA-Rohtoxinpräparation somit stärkere Hemmwirkungen bzw. Stimulierungen bei niedrigeren Konzentrationen erzielt, als mit dem Reintoxin. Es ist deshalb zu vermuten, daß dafür weitere wirksame Substanzen, die im Rohtoxin neben OTA vorkommen, verantwortlich sind.

Desweiteren deuten die Ergebnisse darauf hin, daß OTA selektiv in die Regulationsmechanismen und Syntheseprozesse der einzelnen Zytokine eingreift und auf diese Weise immunmodulatorisch wirkt. Dies steht allerdings der bisherigen Hypothese einer allgemeinen immunsuppressiven Wirkung dieses Mykotoxins entgegen. Nach unseren Untersuchungen bleibt allerdings ungeklärt, an welchen Punkten des Zellstoffwechsels (Signaltransduktion,

DNA- oder Proteinsynthese) OTA wirksam wird. Entsprechende Folgen dieser Zytokin-Dysregulation *in vivo* im Hinblick auf die vorwiegend proinflammatorisch wirkenden bzw. die Immunzell-Differenzierung fördernden Interleukine lassen sich zwar vermuten, sind aber nach diesen *in-vitro*-Untersuchungen nur schwer abzuschätzen.

P17:

Apoptosis in cultured human renal epithelial cells caused by ochratoxin A

Gerald Schwerdt, Ruth Freudinger, Stefan Silbernagl and Michael Gekle

Physiologisches Institut, Röntgenring 9, 97070 Würzburg, Germany

Ochratoxin A (OTA) is suspected to cause severe renal damages and also Balkan endemic nephropathy is likely induced by OTA. In high, but non-physiologic concentrations, OTA causes DNA damages, disturbs protein synthesis and inhibits some enzyme activities. Only few reports exist in which the effect of low concentrations of OTA are studied. These new results show that OTA in nanomolar concentrations impairs organic anion transport in proximal tubule cells and that OTA has the potential to interfere with intracellular signalling pathways as e.g. the extracellular signal regulated kinases ERK which may lead to cell transformation. Here we studied whether OTA in nanomolar concentrations may also interfere with or induce the apoptosis pathway in renal cells. We used cells from the proximal tubule and the collecting duct of human, canine and marsupial origin. Apoptosis can be detected by some characteristic cellular changes as e. g. phosphatidylserine externalisation, chromatin condensation or DNA ladder formation. These changes are induced and managed by apoptosis executing enzymes activated either directly or indirectly by caspases with caspase 3 as main executing caspase. Thus, an activation of caspase 3 inevitably leads to apoptotic cell death.

We found that exposure of renal cells to nanomolar concentrations of OTA leads to activation of caspase 3. In human proximal tubule cells, on which our studies were concentrated, also chromatin condensation and DNA ladder formation was detected. The activation of caspase 3 was prevented by drugs interfering with the mitochondrial ADP/ATP carrier, bongkrekic acid and atractyloside, but not by cyclosporin A. Activation was not prevented by calcium chelation nor by radical scavenging. Inhibition of the mitochondrial respiration chain by either rotenone or antimycin also inhibited caspase 3 activation by OTA exposure. These results show that mitochondria play an important role for apoptosis induction by OTA, obviously as energy delivering organelles.

In summary we show that OTA at nanomolar concentrations has the potential to induce energy dependent apoptosis in renal cells. This is an additional risk of OTA as increased apoptosis rates may lead to inflammation processes in the kidney as e. g. tubulointerstitial fibrosis.

P18:

Citrinin in the diet of young and healthy persons living in Balkan Endemic Nephropathy areas

T. Vrabcheva[1], E. Usleber[2], T. Petkova-Bocharova[3], I. Nikolov[3], I. Chernozemsky[3], R. Dietrich[2], and E. Märtlbauer[2]

[1] National Center of Hygiene, Dimitar Nestorov Str. 15, 1431 Sofia, Bulgaria;
[2] Institute for Hygiene and Technology of Food of Animal Origin, University of Munich, Veterinärstr. 13, 80539 Munich, Germany;
[3] National Center of Oncology, Plovdivsko pole 6, 1156 Sofia, Bulgaria

Although ochratoxin A (OTA) is most frequently cited in the context of Balkan Endemic Nephropathy (BEN), in a recent study we have demonstrated that another nephrotoxic mycotoxin, namely citrinin (CT), co-occurs with OTA in cereal samples collected from BEN villages of Bulgaria, with CT levels exceeding that of OTA. The aim of the present study was to obtain first data about human dietary exposure to CT in BEN areas. For this project two villages in a high risk area for BEN - (Gorno Peshtene and Beli Izvor, located in the Vratza District, north-west Bulgaria) were selected. Nineteen healthy volunteers - 7 from Gorno Peshtene and 12 from Beli Izvor - participated in the study. Volunteers were selected in the age range 20 to 30 years to avoid subjects with impaired renal function. Volunteers were asked to keep an aliquot from each of their daily meal (food and beverages) during four weeks, and to keep a record of their food consumed throughout this month. For each day, meals were pooled, homogenized, and weighed. At the end of the week, all samples of one week were again thoroughly mixed. An aliquot of each sample (5 g) was analysed for citrinin by an enzyme immunoassay (EIA). The detection limit, estimated from the EIA standard curve, the recovery data, and the matrix variability, was at 1 ng/g. Mean recoveries of CT from food samples at levels of 1 ng/g, 2 ng/g, and 5 ng/g were at 45%, 70%, and 80%, respectively.

CT at >1 ng/g was detected at least once in the diet samples of 11 out of 19 persons. For seven persons, CT levels exceeded 1 ng/g in two or more weekly samples. Two persons had high CT levels in their diet in all four weekly samples, with concentrations ranging from 3 ng/g to 6 ng/g. The weekly intake of CT of these two persons was calculated to be 9000-32000 ng. One other person had a calculated weekly intake of 40000 ng of CT in one week, but less than 4000 ng in the three other weeks. The CT intake by the other persons for whom CT was found at least once in the diet was in a range of 4000 ng to 10000 ng. Although further confirmation of the analytical results by an independent method is still necessary, these data are sufficient to suspect that several of those persons volunteering in this study have a considerably high daily intake of CT. This would be consistent with earlier findings that cereals collected from BEN villages may contain high levels of citrinin (>100 ng/g). Although at the moment it is unclear whether or not CT plays a role in the etiology of BEN, the toxin levels found in food, and the nephrotoxic properties of CT seem to be a sufficient basis to initiate further work aiming at more intense surveys of foods from BEN areas for CT.

Reference: Vrabcheva, T., E. Usleber, R. Dietrich, and E. Märtlbauer (2000): Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of balkan endemic nephropathy. J. Agric. Food Chem. **48** (in press).

P19:

Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratoxin A - Qualität von Futtergetreide

W. Janes, W. Scholz, M. Schuster
Bayerische Landesanstalt für Tierzucht – Grub

Mykotoxine sind Stoffwechselprodukte aus Schimmelpilzen, die die Qualität von Futtergetreide beeinflussen und damit auch die Tiergesundheit gefährden.
Aus diesem Grund wurde im Rahmen der Qualitätskontrolle 5 Getreidearten aus verschiedenen Regionen Bayerns auf die Mykotoxine DON, OTA und ZEA untersucht.
Darüber hinaus war die Bestimmung der Keimzahl von Interesse um damit eine Korrelation der Keimzahlen zur Mykotoxinbelastung abzuleiten. Außerdem sollte der Frage nachgegangen werden ob Schimmelpilze in Abhängigkeit von der Wirtspflanze bevorzugt ein Mykotoxin bilden.

1) Gerste Weizen und Triticale zeigen vergleichbare DON Gehalte in Bayern im Jahr 1999.Auffällig ist die hohe Anzahl der DON belasteten Gersteproben. Die Mediane schwanken zwischen 0.8 und 1.5 (Gerste), 0.1 und 1 (Weizen) bzw. 0.3 und 1.2 mg/kg (Triticale). Die Daten zeigen außerdem, daß für Weizen die DON Belastung im Vergleich zu den anderen Getreidearten am niedrigsten ist. Grund hierfür kann sein, dass die LBP-Empfehlung bezüglich der Fruchtfolge, Bodenbearbeitung, Sortenwahl und Fungizideinsatz erste Erfolge zeigt.

   Bei Hafer und Mais waren nur wenige Proben DON-kontaminiert (Gehalte: 0,08 bis 1,7 mg/kg).
2) Die Werte für ZEA liegen im Bereich von 5 bis 20µg/kg mit Ausnahme weniger Proben, bei denen Belastungen von bis zu 220 µg/kg gefunden wurden.
3) OTA wurde nur in wenigen Proben in Konzentrationen < 1µg/kg gefunden, was auf den hohen Standard der Lagerhaltung und der Hygiene hinweist.
4) Mit wenigen Ausnahmen liegen alle Werte im Bereich der zur Zeit diskutierten Richtwerte (DON: 1 mg/kg [Schwein]; ZEA: 50 µg/kg [Jungschwein]), so dass die Qualität 1999 nicht wesentlich beeinträchtigt war.

P20:

Determination of Zearalenone and its Metabolites in Urine and Tissue Samples of Pig and Cow by LC-MS/MS

Justus Jodlbauer, Peter Zöllner, Wolfgang Lindner

Institute of Analytical Chemistry, University of Vienna
Währinger Straße 38, A-1090 Wien

Recently, it was shown that zeranol (α-Zearalanol, α-ZAL), a widely adopted growth stimulant, which has been banned in the European Union since 1985, may also be formed in vivo from the mycotoxins zearalenone (ZON) and α-zearalenol (α-ZOL) that can be carried over from contaminated feed stuff to animals [1]. Zearalenone itself has got estrogenic and anabolic properties and is formed by various *Fusarium* species on maize, wheat, barley and oats. Concluding from these findings illegal administration of zeranol may not be unambigiously evident from its presence in urine. Previously it was shown that simultanious determination of ZON, α-/β-ZOL, Taleranol (β-ZAL) and α-ZAL, along with the concentration ratio of α-ZOL/α-ZAL may enable differentiation of zeranol abuse from natural contamination [2]. Furthermore, analysis of all five compounds seems to be reasonable to improve risk assessment concerning an overall estrogenic and anabolic effect in food and feed.

For the sensitive and selective determination of α-ZAL, ZOLs, ZON and β-ZAL in animal urine and tissue a LC-MS/MS method has been developed. Sample preparation included extraction of meat samples and enzymatic digest of urine samples followed by solid-phase extraction with RP-18 columns for sample clean-up. Mass spectrometric determination was carried out with an atmospheric pressure chemical ionisation interface (APCI) in the multi-reaction monitoring mode (MRM). Using the negative ion mode detection limits between 0.1 and 0.5 ppb and determination limits between 0.5 and 1 ppb could be achieved. With zearalanone (ZAN) as internal standard, a linear range between 0.5 (1.0) and 100 ppb in urine samples (cow; pig) and between 1 and 100 ppb in meat samples (cow, calf, pig) could be established. Depending on the biological matrix and analyte standard deviations were below 8.2 %, with recovery rates between 86 and 102 % in spiked samples. The applicability of the method was demonstrated via several contaminated cow and pig urine samples.

References:

[1] A.F. Erasmuson, B. G. Scahill, D. M. West, J. Agric. Food Chem. **42**, 2721-2725 (1994).
[2] D. G. Kennedy, S. A. Hewitt, J. . G. McEvoy, J. W. Currie, A. Cannavan, W. L. Blanchflower, Food Add. Contam. **15**, 393-400 (1998).

P21:

Entwicklung eines immunchemischen Schnelltestverfahrens zum Multimykotoxinnachweis

Barbara Mayer, Elisabeth Schneider, Ewald Usleber, Richard Dietrich, Christine Bürk und Erwin Märtlbauer

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstrasse 13, D-80539 München

Qualitative immunchemische Schnellnachweise für Mykotoxine bieten die Möglichkeit, ausserhalb des Labors "vor Ort" auf die Anwesenheit eines Mykotoxins in verschiedenen Probenmaterialien zu untersuchen. Für einen derartigen Einsatz sollte idealerweise ein Multitoxin-Nachweis geführt werden. In diesem Beitrag wird die Entwicklung eines solchen Schnelltests zum gleichzeitigen Nachweis von sieben verschiedenen Mykotoxinen [Aflatoxin B_1 (AFB), Ochratoxin A (OTA), Fumonisine (FB), Deoxynivalenol (DON), Diacetoxyscirpenol (DAS), T-2 Toxin (T-2) und Roridin A (ROA)] beschrieben. Die Antikörper gegen diese Toxine sowie die entsprechenden Toxin-Meerrettichperoxidase-Konjugate wurden am Institut entwickelt und optimiert. Zur Testdurchführung wurde ein wiederverwendbares Testtablett mit acht Reaktionsfeldern entwickelt. In jedes Reaktionsfeld werden mit Anti-Toxin Antikörpern beschichtete Membranen eingespannt, durch eine darunter liegende Zellstoffschicht werden Testflüssigkeiten aufgesaugt. Der Nachweis erfolgt durch Auftropfen von Toxinstandard- bzw. Probenextraktlösung, gefolgt von von einer standardisierten Toxin-Enzymkonjugat-Lösung, Waschlösung und schliesslich der Farbentwickler-Lösung. Die Testauswertung erfolgt durch visuellen Vergleich der Farbintensität der Testfelder mit derjenigen eines integrierten Negativ-Kontrollansatzes. Die gesamte Testdauer liegt bei weniger als 10 Minuten. Zum Toxinnachweis in Getreideproben wurde eine einfache Probenextraktion mit Methanol/Wasser eingesetzt. Folgende Nachweisgrenzen wurden in ersten orientierenden Untersuchungen für künstlich kontaminierte Getreideproben ermittelt: AFB: 10 ng/g, OTA: 100 ng/g, FB: 100 ng/g; DON: 7000 ng/g; DAS: 10 ng/g, T-2: 200 ng/g, ROA: 500 ng/g. Das Testsystem eignet sich somit zur schnellen Überblicks-Untersuchung von Futtermitteln und Umweltproben auf die wichtigsten Mykotoxine der Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium* und *Fusarium*.

P22:

Fumonisingehalt von extrudiertem Mais und Cornflakes - untersucht mit verschiedenen analytischen Methoden

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

Maisrohstoffe zeigen wesentlich höhere Fumonisingehalte als verzehrsfertige Lebensmittel auf Maisbasis. Verschiedene Arbeitsgruppen postulierten eine Bildung von Addukten aus Fumonisinen und reduzierenden Zuckern bzw. die Bildung von N-(carboxymethyl)-Fumonisin B1 beim Durchlaufen thermischer Prozesse – beides sekundäre Amine, die mit der herkömmlichen HPLC-Methode (OPA-Derivatisierung) nicht nachzuweisen sind. Durch alkalische Hydrolyse sollen diese Addukte spaltbar und das freigesetzte Fumonisin als hydrolysierbares Fumonisin bestimmbar sein. Andere Arbeitsgruppen gehen bei thermischen Prozessen von einer kovalenten Bindung der Fumonisine an die Proteinmatrix und erwarten eine Freisetzung der an das Protein gebundenen Fumonisine bei der Verdauung.

Da bisher nur sehr wenige Untersuchungen zur Veränderung des Fumonisingehaltes in verschiedenen Prozessen der Nahrungsmittelindustrie vorliegen, wurde untersucht, wie sich der Fumonisingehalt bei Extrusion und Cornflakesherstellung in Abhängigkeit von den gewählten Prozessparametern verändert. Alle hydrothermischen Prozesse führten wie erwartet zur Abnahme des Fumonisingehaltes, der mittels HPLC/OPA-Derivatisierung entsprechend AOAC-Methode bestimmt wurde (Ergebnisse siehe Proceedings des 21. Mykotoxinworkshops). Mittels ELISA wurden im Vergleich zur HPLC um 15 ... 50 % höhere Gesamtfumonisingehalte ermittelt.

Eine alkalische Hydrolyse der zur HPLC entsprechend AOAC-Methode eingesetzten Probenextrakte mit nachfolgender Extraktreinigung an Amberlite XAD-2 (in amerikanischen Publikationen oft erwähnt) führte zu ungenügend gereinigten Extrakten und damit zu schlecht auswertbaren Chromatogrammen mit vielen Störpeaks und Peaküberlagerungen, die eine Identifizierung des hydrolysierten Fumonisin B1 sehr erschwerten und das berechnete Ergebnis sehr fraglich erscheinen lassen. Eine zusätzliche C18-Reinigung der XAD-2-gereinigten Extrakthydrolysate war nicht möglich (Wiederfindung 1-3 %).

Da die Hydrolyse der Extrakte kein brauchbares Ergebnis lieferten, wurden ausgewählte Proben direkt einer alkalischen Hydrolyse unterzogen und die Extrakte an C18-Kartuschen gereinigt (allerdings erlaubten auch die C18-Kartuschen keine sehr effektive Extraktreinigung). In Extrudaten, Gelatinaten und gekochten Grits wurden im Vergleich zur AOAC-Methode ca. 20...90% höhere Fumonisingehalte ermittelt, bei den Cornflakesproben um ca. 150 ... 400 % höhere Werte, die wie die entsprechend AOAC-Methode bestimmten Werte eine Abnahme des Fumonisingehaltes in Korrelation zu den technologischen Parametern zeigen. Lediglich in den dotierten Rohstoffen wurden etwas niedrigere Fumonisingehalte gefunden. Die zugesetzte Fumonisin B1 - Menge wurde auch nach alkalischer Hydrolyse nicht wiedergefunden.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass der Fumonisingehalt infolge thermischer Prozesse abnimmt, diese Abnahme mit unterschiedlichen Methoden nachgewiesen werden kann – wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Ob mit der Abnahme des Fumonisingehaltes auch eine Entgiftung einhergeht, muss in toxikologischen Untersuchungen geklärt werden. Dank hochempfindlicher analytischer Methoden bleibt die Verarbeitung von mykotoxikologisch nicht einwandfreien Rohstoffen jedoch nachweisbar und sollte daher im Sinne des

Verbraucherschutzes und der Sorgfaltspflicht der Unternehmen der Nahrungsmittelindustrie nach Möglichkeit vermieden werden.

Aus den Ergebnisse der analytischen Arbeiten muss weiterhin geschlussfolgert werden, dass zur Zeit nur die AOAC-Methode eine exakte Ermittlung des Fumonisingehaltes in verarbeiteten Produkten zulässt. Zur Bestimmung von Fumonisinen in hydrolysierten Maisproben existiert bisher kein brauchbares Extraktreinigungsverfahren, das saubere und gut quantifizierbare Chromatogramme liefert und empfindlich genug ist, auch kleinere Fumonisinmengen (< 200 µg/kg) exakt zu bestimmen. Deshalb muss der mittels üblicher HPLC-Methode bestimmte Gehalt als tatsächlicher Rest-Fumonisingehalt in verarbeiteten Produkten angesehen werden.

P23:

Fast method for screening of trichothecenes in fungal cultures – using GC-MS/MS

Kristian Fog Nielsen[1,2]
Ulf Thrane[1]
[1]Department of Biotechnology, Technical University of Denmark, Building 221, DK-2800 Lyngby, Denmark.
[2]Energy and Indoor Climate Division, Danish Building Research Institute, Dr. Neergaards Vej 15, DK-2970 Hørsholm, Denmark

Fast methods for screening for production of simple and macro-cyclic trichothecenes, produced on solid substrates was developed. Crude extracts from *Fusarium* cultures grown on yeast extract sucrose agar (approx. 0.3 cm^2 culture) was derivatised using pentafluoropropionic anhydride and analysed by gas chromatography – tandem mass spectrometry using a Finnigan GCQ^+ ion trap. The MS was operated in the EI^+ multiscan mode allowing simultaneous full scan and MS/MS of 3-4 parent ions. The production of acetyl T-2 toxin, T-2 toxin, HT-2 toxin, T-2 triol, T-2 tetraol, neosolaniol, iso-neosolaniol, scripentriol, 4,15-diacetoxyscirpenol, 15-acetoxyscripentriol, 4- acetoxyscripentriol, nivalenol, fusarenon-X, 4-deoxynivalenol, 15-acetoxy-4-deoxynivalenol and 3-acetoxy-4-deoxynivalenol was studies for several *Fusarium* species.

In crude hydrolysed crude extracts of *Stachybotrys albipes*, *Trichoderma harzianum*, and *Memnoniella echinata* trichodermol was detected and in cultures of *S. chartarum* both verrucarol and trichodermol was detected as the heptafluorobuturyl esters after derivatisation with a imidazole based reagent.

Negative ion chemical ionisation MS of both types of extracts could be used for verification and determination of the molecular mass of unknown compounds.

Liste

der Teilnehmerinnen und Teinehmer

Abd El-Hafez, Shehata: Bayerische Landesanstalt für Tierzucht, Prof.-Dürrwächter- Platz 1, 85586 Poing, Tel.: 089/99141431, Fax: 089/99141105

Prof. Dr. Anklam, Elke: Institute for Health and Consumer Protection, Via Fermi 1 (TP 260), I-21020 Ispra, Tel.: 0039/0332-785390, Fax: 0039/0332-785930, E-mail: elke.anklam@irc.it

Dr. Backes, Frank: Fédération Agricole, Rue de la Gare 4, L-9044 Ettelbrück, Tel.: 00352/81-225124, Fax: 00352/81-225148

Dr. Auerbach, Horst: c/o Wolfgang Röthel GmbH, Schwänheit 10, 34281 Gudensberg, Tel.: 05603/932829, Fax: 05603/932828, E-mail: horst.auerbach@roethel.de

Prof. Dr. Bauer, Johann: Lehrstuhl für Tierhygiene, TU München, Hohenbachernstr. 15, 85354 Freising, Tel.: 08161/713312, Fax: 08161/714516, E-mail: tierhygiene@lrz.tu-muenchen.de

Bevis, Simon: Coring System Diagnostix GmbH, Robert-Bunsen-Str. 4, 64579 Gernsheim, Tel.: 06258/9317-0, Fax: 06258/3050, E-mail: info@coring.de

Birzele, Barbara: Institut für Pflanzenkrankheiten, Universität, Abt.: Landwirtschaftliche und Lebensmittel-Mikrobiologie, Meckenheimer Allee 168, 53115 Bonn, Tel.: 0228/733376, Fax: 0228/739592, E-mail: b.birzele@uni-bonn.de

Prof. Dr. Blanz, Paul: Institut für Botanik, Universität, Holteigasse 6, A-8010 Graz, Tel.: 0043/316-3805694, Fax: 0043/316-3809883, E-mail: paul.blanz@kfunigraz.ac.at

Dr. Böhm, Josef: Veterinär-Medizinische Universität, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien, Tel.: 0043/1-250773215, Fax: 0043/1-250773290, E-mail: Josef.BOEHM@VU-Wien.AC.AT

Bonk, Christina: Fachhochschule Anhalt, Strenzfelder Allee 28, 06406 Bernburg, Tel.:

Bosch, Hansjörg: Deutscher Brauer-Bund e.V., Annabergerstr. 28, 53175 Bonn, Tel.: 0228/9590630, Fax: 0228/9590618, E-mail: hjbosch@society.de

Bossow, Henning: Tierärztliche Klinik, Von-Kranenfeldt-Str. 71, 27318 Hoya, Tel.: 04251/3888, Fax: 04251/3881

Dr. Brunklaus, Dieter: Klinik für Rinderkrankheiten, Tierärztliche Hochschule, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover, Tel.: 0511/8567282, E-mail: dbrunk@rikli.tiho-hannover.de

Prof. Dr. Buchenauer, Heinrich: Institut für Phytomedizin, Universität Hohenheim, Otto-Sander-Str. 5, 70593 Stuttgart, Tel.: 0711/4592387, Fax: 0711/4592408, E-mail: hbuchenauer@uni-hohenheim.de

Dr. Buchner, Leander: Bundesministerium für Verteidigung, InSan 18, Postfach 1328, 53000 Bonn

Bujara, Ingrid: SGS Natec Institut, Behringstr. 154, 22763 Hamburg, Tel: 040/88309195, Fax: 040/88309170, E-mail: ingridbujara@sgsgroup.com

Burgmaier-Thielert, Elisabeth: Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt, Hedingerstr. 2/1, 72488 Sigmaringen, Tel.: 07571/732696, Fax: 07571/732614, E-mail: Burgmaier@clua.cvnatu.bwl.de

Dr. Christall, Birgit: CLF Central Laboratories GmbH. Bahnstr. 14-30, 61381 Friedrichsdorf, Tel.: 06172/991897, Fax: 06172/991967, E-mail: birgit.christall@milupa.de

Dr. Färber, Paul: Institut für Hygiene und Toxikologie, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Haid- und Neu-Str. 9, 76131 Karlsruhe, Tel.: 0721/6625517, Fax: 0721/6625453, E-mail: Paul.Faerber@bfe.uni-karlsruhe.de

Dr. Fischer, Guido: Institut für Hygiene und Umweltmedizin, Universitätsklinikum, Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen, Tel.: 0241/8088876, Fax: 0241/8888477, E-mail: Guido.Fischer@post.rwth-aachen.de

Dr. Föllmann, Wolfram: Institut für Arbeitsphysiologie, Universität, Ardeystr. 67, 44139 Dortmund, Tel.: 0231/1084384, Fax: 0231/1084403, E-mail: foellmann@arb-phys.uni-dortmund.de

Dr. Fröhling, Christian: ABIMED Analysen Technik GmbH, Raiffeisenstr. 3, 40764 Langenfeld, Tel.: 02324/971980, Fax: 02324/971981

Fuchs, Elisabeth: IFA, Analytikzentrum, Konrad-Lorenz-Str. 20, A-3430 Tulln, Tel.: 0043/2272-66280409, Fax: 0043/2272-66280403, E-mail: efuchs@ifa-tulln.ac.at

Prof. Dr. Gareis, Manfred: Bundesanstalt für Fleischforschung, Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, E.-C.-Baumann-Str. 20, 95326 Kulmbach, Tel.: 09221/803220, Fax: 09221/803331, E-mail: gareis.baff@t-online.de

Prof. Dr. Gedek, Brigitte: Bergstr. 8, 85737 Ismaning, Tel.: 089/969182, Fax: 089/96201133

Dr. Geisen, Rolf: Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Haid- und Neu-Str. 9, 76131 Karlsruhe, Tel.: 0721/6625459, Fax: 0721/6625453, E-mail: rolf.geisen@bfe.uni-karlsruhe.de

Prof. Dr. Gekle, Michael: Physiologischen Institut, Universität, Röntgenring 9, 97070 Würzburg, Tel.: 0931/312739, Fax: 0931/312741, E-mail: michael.gekle@mail.uni-wuerzburg.de

Dr. Göbel, Roswitha: Institut für Veterinär-Pharmakologie und Toxikologie GmbH, Weißenseer Str. 36, 16321 Bernau, Tel.: 03338/3965-0, Fax: 03338/396517

Goll, Michael: European Commission, Food and Veterinary Office, Belfield Office Park, Beech Hill Road, Dublin 4/Ireland, Tel.: 00353/1-2064766, Fax: 00353/1-2064702, E-mail: Michael.Goll@cec.eu.int

Dr. Grajewski, Jan: Instytut Biologii i Ochrony Srodowiska WSP, ul. Chodkiewicza 30, PL-85064 Bydgoszcz, Tel.: 0048/52-3400744, Fax: 0048/52-3400734, E-mail: jangra@wsp.bydgoszcz.pl

Dr. Gutsche, Birgit: Phytolab GmbH & Co KG, Dutendorferstr. 5-7, 91487 Vestenbergsgreuth, Tel.: 09163/88445, Fax: 09163/88379, E-mail: Birgit.Gutsche@Phytolab.de

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

Hanschmann, Gudrun: Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft, Gustav-Kühn-Str. 8, 04159 Leipzig, Tel.: 0341/9174228, Fax: 0341/9174211

Dr. Hartung, Horst: Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Naumburgerstr. 98, 07743 Jena, Tel.: 03641/683463, Fax: 03641/683414, E-mail: Untersuchungswesen@TLLJena.thueringen.de

Heidler, Dian: BIOMIN G.T.I., Konrad-Lorenz-Str. 20, A-3430 Tulln, Tel.: 0043/2272-66280505, Fax: 0043/2272-66280503, E-mail: heidler@ifa-tulln.ac.at

Dr. Heller, Martin: Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Naumburgerstr. 96a, 07743 Jena, Tel.: 03641/804281, Fax: 03641/804283, E-mail: m.heller@bgvv.de

Dr. Just, Paul: Staatliches Veterinäruntersuchungsamt, Zur Taubeneiche 10-12, 59821 Arnsberg, Tel.: 02931/809-0, Fax: 02931/809290

Prof. Dr. Kielstein, Peter: Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Naumburgerstr. 96a, 07743 Jena, Tel.: 03641/804240, Fax: 03641/804228, E-mail: p.kielstein@bgvv.de

Klaffke, Horst Stefan: Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Thielallee 88-92, 14195 Berlin, Tel.: 0188/84123487, Fax: 0188/84123685, E-mail: H.KLAFFKE@bgvv.de

Dr. Kletschkus, Helmut: CR3-Kaffeeveredlung M. Hermes GmbH, Waterbergstr. 14, 28237 Bremen, Tel.: 0421/6490548, Fax: 0421/6490590

Knoll, Sandra: Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, TU München, Weihenstephaner Steig 16, 85350 Freising, Tel.: 08161/715171, Fax: 08161/713327, E-mail: sandra.knoll@bl.tum.de

Dr. Koch, Priska: Wissenschaftliche Dienste Migros, Postfach, CH-8031 Zürich, Tel.: 0041/1-2773203, Fax: 0041/1-2773170, E-mail: priska.koch@mgb.ch

Dr. Köhler, Heike: Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Naumburgerstr. 96a, 07743 Jena, Tel.: 03641/804262, Fax: 03641/804228, E-mail: h.koehler@bgvv.de

Dr. Kombal, Ralph: Staatliches Lebensmitteluntersuchungsamt, Postfach 2462, 26014 Oldenburg, Te.: 0441/9803163, Fax: 0441/9803121, E-mail: Ralph.Kombal@lua-ol.niedersachsen.de

Prof. Dr. Krämer, Johannes: Institut für Pflanzenkrankheiten, Abt. Landwirtschaftliche und Lebensmittel-Mikrobiologie, Universität, Meckenheimer Allee 168, 53115 Bonn, Tel.: 0228/735604, Fax: 0228/739592, E-mail: kraemer@uni-bonn.de

Prof. Dr. Krska, Rudolf: IFA Analytikzentrum, Konrad-Lorenz-Str. 20, A-3430 Tulln, Tel.: 0043/2272-66280401, Fax: 0043/2272-66280403, E-mail: KRSKA@ifa-tulln.ac.at

Dr. Kruse, Sabine: Bundesministerium für Landwirtschaft und Forsten, Rochusstr. 1, 53123 Bonn, Fax: 0228/5294221

Lafos, Kurt: Kantonales Laboratorium TG, Spannerstr. 20, CH-8510 Frauenfeld, Tel.: 0041/52-7242512, Fax: 0041/52-7242905, E-mail: kurt.lafos@kttg.ch

Dr. Laggner, Hilde: Noack AG, Auhofstr. 190, A-1130 Wien, Tel.: 0043/1-8775455-0, Fax: 0043/1-8765443

Dr. Lassek, Eva: LUA Südbayern, Veterinärstr. 2, 85762 Oberschleißheim, Tel.: 089/31560545, Fax: 089/31560457

Lauber, Uwe: Institut für Tierernährung, Universität Hohenheim, Emil-Wolff-Str. 10, 70599 Stuttgart, Tel.: 0711/4592413, Fax: 0711/4592421, E-mail: LAUBER@uni-hohenheim.de

Lebrun, Stefan: Institut für Arbeitsphysiologie, Universität, Ardeystr. 67, 44139 Dortmund, Tel.: 0231/1084213, Fax: 0231/1084403, E-mail: Stefan.Lebrun@arb-phys.uni-dortmund.de

Dr. Lepschy, Johann: Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Vöttingerstr. 38, 85354 Freising, Tel.: 08161/713978, Fax: 08161/714407, E-mail: Johann.Lepschy@lbp.bayern.de

Müller, Thomas: Institut für Hygiene und Umweltmedizin, Universitätsklinikum, Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen, Tel.: 0241/8088876, Fax: 0241/8888477

Muthomi, James: Institut für Pflanzenkrankheiten, Universität, Nußallee 9, 53115 Bonn, Tel.: 0228/732523, Fax: 0228/732442

Neugebauer, Sibylle: Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen, Reichenbachstr. 71/73, 01217 Dresden, Tel.: 0351/8144464, Fax: 0351/8144497, E-mail: sibylle.neugebauer@lua.sms.sachsen.de

Nielsen Fog, Kristian: Department of Biotechnology, TU, Building 221, DK-2800 Lyngby, Tel.: 0045/45252600, Fax: 0045/45884922, E-mail: KFN@ibt.dtu.dk

Prof. Dr. Nowar, M.S.: Department of Animal Production, University of Zagazig/Egypt

Dr. Obst, Alfred: Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Menzingerstr. 54, 80638 München, Tel.: 089/17800234, Fax: 089/17800233, E-mail: Alfred.Obst@lbp.bayern.de

Dr. Oldenburg, Elisabeth: Institut für Pflanzenbau und Grünlandwirtschaft, FAL, Bundesallee 50, 38116 Braunschweig, Tel.: 0531/596420, Fax: 0531/536320, E-mail: elisabeth.oldendurg@fal.de

Dr. Ostenfeld Larsen, Thomas: Department of Biotechnology, University, Building 221, DK-2800 Lyngby.

Dr. Otteneder, Herbert: Institut für Lebensmittelchemie, Landesuntersuchungsamt, Maximineracht 11a, 54295 Trier, Tel.: 0651/1446212, Fax: 0651/21028, E-mail: herbert.otteneder@cua-tr.rlp.de

Peasy, Ute: Central Laboratories Friedrichsdorf GmbH, Bahnstr. 14-30, 61381 Friedrichsdorf

Dr. Petracco, Marino: Illycaffè, Research & Development, Via Flavia 110, I-34147 Trieste Tel.: 0039/40-3890397, Fax: 0039/40-3890490, E-mail: MARINO.PETRACCO@ILLY.IT

Dr. Pettersson, Hans: Department of Animal Nutrition and Management, University, P.O.Box 7024, S-75005 Uppsala, Tel.: 0046/18-672103, Fax: 0046/18-672995, E-mail: Hans.Pettersson@huv.slu.se

Prof. Dr. Petzinger, Ernst: Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität, Frankfurterstr. 107, 35392 Gießen, Tel.: 0641/9938400, Fax: 0641/9938409, E-mail: ernst.petzinger@vetmed.uni-giessen.de

Pieczonka, Klaus: Privatbrauerei Erdinger Weißbräu GmbH, Franz-Brombach-Str. 1, 85435 Erding, Tel.: 08122/409589, Fax: 08122/409584

Prange, Alexander: Institut für Pflanzenkrankheiten, Abt.: Landwirtschaftliche und Lebensmittel-Mikrobiologie, Universität, Meckenheimer Allee 168, 53115 Bonn, Tel.: 0228/735604, Fax: 0228/739592, E-mail: uzsef5@uni-bonn.de

Dr. Raczek, Nico N.: Nutrinova GmbH, Industriepark Höchst, 65926 Frankfurt/M., Tel.: 069/30583567, Fax: 069/30516306, E-mail: raczek@msmnutri.hoechst.com

Raters, Marion: Lebensmittelchemisches Institut des Bundesverbandes der Deutschen Süsswarenindustrie e.V., Adamsstr. 52-54, 51063 Köln, Tel.: 0221/623061, Fax: 0221/610477

Dr. Razzazi, Ebrahim: Institut für Ernährung, VU, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien, Tel.: 0043/1-250773216, Fax: 0043/1-250773290, E-mail: Ebrahim.Razzani@VU-Wien.ac.at

Schräder, Johannes: Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr, Scharnhorststr. 14, 10115 Berlin, Tel.: 030/28412840, Fax: 030/28412213

Dr. Schuster, Manfred: Bayerische Landesanstalt für Tierzucht, Prof.-Dürrwächter-Platz 1, 85586 Poing, Tel.: 089/99141460, Fax: 089/99141105, E-mail: schust@blt.bayern.de

Schwalbe, Regina: Institut für Hygiene und Umweltmedizin, Universitätsklinikum, Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen, Tel.: 0241/8088876, Fax: 0241/8888477

Dr. Schwerdt, Gerald: Physiologisches Institut, Universität, Röntgenring 9, 97070 Würzburg, Tel.: 0931/312724, Fax: 0931/312741, E-mail: gerald.schwerdt@mail.uni-wuerzburg.de

Dr. Semar, Martin: Agrarzentrum der BASF AG, Carl-Bosch-Str. 64, 67117 Limburgerhof, Tel.: 0621/6027662, Fax: 0621/6028135, E-mail: martin.semar@central-europe.basf.org

Dr. Senkpiel, K : Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität, Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck, Tel.: 0451/5002812, Fax: 0451/5002808, E-mail: Senkpiel@hygiene.mu-Luebeck.de

Dr. Speakman, John-Bryan: Agrarzentrum der BASF AG, Carl-Bosch-Str. 64, 67117 Limburgerhof, Tel.: 0621/6027641, Fax: 0621/6027176, E-mail: john.bryan.speakman@basf-ag.de

Dr. Siboe, George: Department of Botany, University, P.O.Box 14050, Nairobi/Kenya, Tel.: 00254/2-722660, Fax: 00254/2-716710, E-mail: siboe@uonbi.ac.ke

Dr. Stamenitis, Stamatis: Nestle AG, , Menningerstr. 1, 84570 Polling, Tel.: 08631/68481, Fax: 08631/68460, E-mail: stamatis.stamenitis@de.nestle.com

Dr. van der Stegen, Gerrit: Sara Lee Douwe Egberts, Vleutense Vaart 35, NL-3532 AD Utrecht, Tel.: 0031/30-2972836, Fax: 0031/30-2972745, E-mail: gvanderstegen@saralee-de.com

Dr. Steinmüller, Rolf: BAG-Biologische Analysensysteme GmbH, Amtsgerichtsstr. 1-5, 35423 Lich, Tel.: 06404/925311, Fax: 06404/62554, E-mail: steinmueller.rolf@bag.eulink.net

Dr. Stocker, Stephan: Umweltagentur, Labor für Lebensmittelanalyse, A. Alagistr.5, I-39100 Bozen, Tel.: 0039/0471-291222, Fax: 0039/0471-283264

Dr. Stolz, Peter: Kwalis GmbH, Fuldaerstr. 21, 36160 Dipperts, Tel.: 06657/6492

Stroka, Jörg: Institute for Health and Consumer Protection, Via Fermi 1 (TP 260), I-21020 Ispra, Tel.: 0039/0332-785390, Fax: 0039/0332-785930, E-mail:

Dr. Swaczyna, Hubert: Hygiene Institut, Marckmannstr. 129a, 20539 Hamburg, Tel.: 040/42837337, Fax: 040/42837584, E-mail: hubert.swaczyna@bags.hamburg.de

Dr. Taschan, Hasan: Staatliches Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt, Marburgerstr. 54, 35396 Gießen, Tel.: 0641/300631, Fax: 0641/300618, E-mail: Taschan@T-Online.de

Dr. Thalmann, Alfred: LUFA Augustenberg, Neßlerstr. 23, 76227 Karlsruhe, Tel.: 0721/9468160, Fax: 0721/94685160 od. 0721/9468112, E-mail: thalmann@lufa.biol.de

Dr. Thielert, Gerhard: Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt, Fidelis-Graf-Str., 72488 Sigmaringen, Tel.: 07571/732737, Fax: 07571/732614, E-mail: Thielert@clua.cvnatu.bwl.de

Für die Unterstützung danken wir den Ausstellern und/oder Sponsoren:

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn
ABIMED Analysen-Technik GmbH, Langenfeld
BASF AG, Ludwigshafen
Bayer AG, Leverkusen
Coring System Diagnostix GmbH, Gernsheim
Merk eurolab, Darmstadt
R-Biopharm GmbH, Darmstadt
Ruttmann GmbH, Hamburg
SIGMA-ALDRICH Laborchemikalien GmbH, Seelze
Tchibo- Röstkaffee GmbH,Hamburg
Transia GmbH, Ober-Mörlen