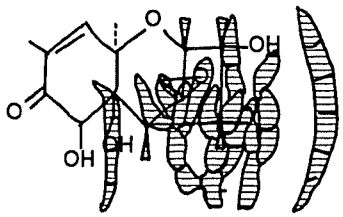
Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs
Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München

19. Mykotoxin-Workshop

Programm

Kurzfassungen



München, 2.-4. Juni 1997

19. Mykotoxin-Workshop
Hotel Novotel, Rudolf-Vogel-Bogen 3
D-81739 München

Organisation:
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München
Veterinärstr. 13, D-80539 München
Tel. 089/2180-3672
Fax. 089/2180-2106

Wir danken folgenden Firmen für die finanzielle Unterstützung der Veranstaltung:

Coring System, Gernsheim
Hipp-Werk, München
R-Biopharm GmbH, Darmstadt
Riedel-de Haën AG, Seelze
Transia GmbH, Ober-Mörlen
Unipath GmbH, Wedel
Zymark GmbH, Idstein

Unser ganz besonderer Dank für die großzügige Förderung gilt der
Stockmeyer Stiftung für Lebensmittelforschung, Sassenberg

19. Mykotoxin-Workshop in München, 2.-4. Juni 1997: Programm

Montag, 2.6.

09:30 Begrüßung, Organisatorisches

09:45 1. Sitzung

09:45 ***Fusarium* toxins in western Canadian barley**
David Abramson, Ewald Usleber, Randy Clear, Renate Geßler, Tom Nowicki und Erwin Märtlbauer

10:10 **Zum Vorkommen von Nivalenol in Getreide und Mais**
Hans Lew, Andreas Adler, Wolfgang Brodacz und Walter Edinger

10:30 **Gemeinsames Vorkommen von Fusarientoxinen in Getreide**
H.-M. Müller, J. Reimann, U. Schumacher und K. Schwadorf

10:50 Kaffeepause

11:20 **Untersuchung von Lebensmitteln auf Fumonisine**
Gerhard Thielert und Claus Reusch

11:40 **Mykotoxinbelastung in *Fusarium culmorum* infiziertem Winterweizen - Beeinflussung durch Fungizidapplikation**
Frank M. Ellner

12:00 Mittagspause

13:20 2. Sitzung

13:20 **Natürlich Nivalenol (NIV) Desoxynivalenol (DON) kontaminierter Hafer und seine toxischen Wirkungen auf Kücken**
J. Böhm, J. Grajewski, C. Gabler und F. Schilcher

13:40 **Wirkung von reinem Deoxynivalenol bei Läuferschweinen. I. Gewinnung der benötigten Toxinmengen - Versuchsaufbau**
U. Lauber, M. Schollenberger, S. Götz-Schröm, H.-M. Müller und W. Drochner

14:00 **Wirkung von reinem Deoxynivalenol bei Läuferschweinen. II. Erste Ergebnisse**
S. Götz-Schröm, M. Schollenberger, U. Lauber, H.-M. Müller und W. Drochner

14:20 **Laborvergleichstest für die Bestimmung von Desoxynivalenol in Weizen**
R. Krska, R. Schuhmacher und M. Grasserbauer

14:40 Posterpräsentation

15:40 **Biotransformation von Mykotoxinen von *Fusarium* spp.**
Andrea Völkl, Gertrud Woerfel, Tanja Häußermann, Bernhard Vogler, Iris Klaiber und Petr Karlovsky

16:00 **Neue Erkenntnisse über die mikrobielle Detoxifikation von DON und 3-Acetyl-DON**
J. Binder, E.M. Horvath, G. Schatzmayr, N. Ellend, H. Danner, R. Krska und R. Braun

16:20 **Analytik mikrobieller Abbauprodukte von Desoxynivalenol**
Nina Ellend, Eva-Maria Horvath, Elke Schaffer, Johann Binder und Rudolf Krska

16:40 **Superkritische Fluid Extraktion (SFE) von Fusarientoxinen aus Weizen**
Ralf Josephs, Rudolf Krska und Manfred Grasserbauer

18:00 **Mykotoxine in Bier (Teil I), Ochratoxin A in Spanferkeln - Exkursion mit Probenahme**
Gemeinsamer Ausflug mit U- und S-Bahn in den Münchner Hirschgarten
(Individuelle Rückfahrt mit S- und U-Bahn)

Dienstag, 3.6.

09:00 3. Sitzung

09:00 **In vitro DNA and nucleotides adducts formation caused by ochratoxin A**
Sophie Obrecht-Pflumio und Guy Dirheimer

09:20 **Einfluß von Ochratoxin A (OTA) auf die immunologischen Abwehrparameter des Schweines**
Peter Kielstein, Günter Müller, Heino Rosner, Angela Berndt und Martin Heller

09:40 **Uptake of ochratoxin A into liver cells occurs by carrier-mediated transport via the organic anion transporting polypeptide oatp**
Ernst Petzinger, Maria Kontaxi und Uta Eckhardt

10:00 **The renal collecting duct as a target of acute ochratoxin A exposure: Effects on acid-base homeostasis**
Michael Gekle, Ruth Freudinger, Sigrid Mildenberger, Stefan Wünsch, Gen Kuramochi und Stefan Silbernagl

10:20 **Induktion von DNA-Reparatursynthese durch Ochratoxin A in vitro**
Wolfram Föllmann, Angelika Flieger und Angelika Dörrenhaus

10:40 Kaffeepause

11:10 **Nachweis von Ochratoxin A in Fleisch- und Fleischerzeugnissen**
R. Scheuer, R. Dietrich, E. Märtlbauer und M. Gareis

11.30 **Vorkommen von Ochratoxin A und B in Braugetreide der Ernte 1996**
Carola Kuss, Franz Meußdoerffer, Herbert Graf und Manfred Gareis

11:40 **Bioverfügbarkeit von Ochratoxin A aus nicht-extrahierbaren Rückständen**
M. Goll, M. Bokern, E. Timm, C. Böhme und H. Harms

12:00 Mittagspause

13:20 4. Sitzung

13:20 **Behandlung von Ochratoxin A-haltiger Futtergerste mit Konservierungsstoffen**
W. Richter, M. Schuster, W. Scholz und M. Gareis

13:40 **Kombinierte Verabreichung von OTA, DON und ZEA an Schweine - Einfluß auf Leistung, Tiergesundheit und Rückstandsverhalten**
K. Lusky, R. Göbel, D. Tesch, K.-D. Doberschütz, A. Lippert und G. Tenner

14:00 **PCR-Nachweis des *Tri5*-Gens als gruppenspezifischer Marker Trichothecen-bildendender *Fusarium*-Arten**
Ludwig Niessen und Rudi F. Vogel

14:20 **Mäusemodell in der Mykotoxinforschung**
J. Böhm, G. Dürl, F. Schilcher, U.N. Devkota und S. Larsson

14:40 Posterpräsentation

16:00 **Zukunft des Mykotoxin-Workshops**

18:00 **Mykotoxine in Bier (Teil II)**
Bus-Exkursion ins Münchener Umland: Kloster Andechs
Rückfahrt ca. 23:00

Mittwoch, 4.6.

09:00 5. Sitzung

09:00 **Endophyte toxin research at the Ruakura Agricultural Research Centre**
Neale R Towers

09:25 **Einfluß von endophytinfiziertem und alkaloidhaltigem Deutschen Weidelgras auf die Gewichtsentwicklung und Gesundheit von Schafen**
Elisabeth Oldenburg, Friedrich Weißbach, Hana Valenta, Martin Höltershinken und Dorle Rattay

09:45 **Zur Toxizität von Roquefortin beim Schaf**
Johann Bauer, Georg Tüller, Sibylle Wiedenmann, Gerd Armbruster, Karin Seidel, Dieter Schams und Tilo Hänichen

10:05 **Siliertechnische Einflüsse auf den Pilzbesatz in Grassilagen und Untersuchungen zum Vorkommen von Roquefortin C**
Klaus-Josef Schmerbauch, Ehrengard Kaiser, Christine Idler und Manfred Schuster

10:25 Kaffeepause

10:55 **Anbau, Ernte und Weiterverarbeitung von Pistazien im Iran**
Paul Majerus

11:15 **Zum Arbeitsschutz im Mykotoxinlabor**
Rolf A. Meyer

11:35 **Mykotoxine und das HACCP-Konzept**
H. Taschan und B. Rother

11:55 Verabschiedung; Ende der Veranstaltung 12:00

Posterpräsentationen

Untersuchungen zum Vorkommen von Ochratoxin A in Buchweizen, zur Toxinbildung während der Lagerung sowie zur Veränderung des Toxingehalts bei der müllereitechnischen Aufbereitung
Ute Meister, Rosemarie Schneeweiß und Hannelore Dahlke

Einfluß von Milchsäure auf die Qualität von konserviertem Buchweizen
Christine Idler, Ute Meister und Rosemarie Schneeweiß

Evaluation of the new Rhône Diagnostics ochratoxin immunoaffinity column for determination of ochratoxin A in cereals, beer and coffee
E. C. Marley, W.C. Nicol und C.A. Donelly

Aflatoxin derivatisation using a Kobra cell as an alternative to post column derivatisation with iodine
W.C. Nicol, C.A. Donelly, J.M. Fremy und S. Dragacci

Inaktivierung von Ochratoxin-A in Pansensaft von Wiederkäuern bei Variation von pH-Wert und Fermentationsbedingungen im in-vitro System
H. Özpinar und W. Drochner

Biologische Detoxikationsmittel bei mit Ochratoxin A gefütterten Kücken
J. Grajewski und J. Böhm

Reabsorptive uptake of ochratoxin A in rat kidney collecting duct and in MDCK-cells
Gerald Schwerdt, Matthias Zingerle, Ruth Freudinger, Michael Gekle und Stefan Silbernagl

Effect of chronic exposure to Ochratoxin A on organic anion transport systems in OK cells
Cristoph Sauvant, Stefan Silbernagl und Michael Gekle

Screening potentiell toxinogener Penicillien mit Hilfe des MTT-Zellkulturtestes
Ralf Rotheneder und Manfred Gareis

Screening von lebensmittelrelevanten *Penicillium*-Isolaten auf artifiziellen Substraten und Charakterisierung gebildeter Sekundärstoffwechsel-Produkte
Andreas Czwalinna, Isabel Sattler, Ralf Thiericke, Susanne Grabley und Manfred Gareis

Lungenhämosiderose in Säuglingen im Zusammenhang mit Innenraum- und Luftkontaminierung mit *Stachybotrys atra* und anderen Schimmelpilzen
R.A. Etzel, E. Montana, W.G. Sorenson, G.J. Kullman, T.M. Allan, D.R. Olson, B.B. Jarvis, J.D. Miller und D.G. Dearborn

Pasture as a source of *Fusarium* toxins in New Zealand
Neale R. Towers

Anreicherung und Charakterisierung anaerober, Desoxynivalenol-transformierender Mikroorganismen
G. Schatzmayr, J. Binder, E.M. Horvath, N. Ellend, H. Danner, R. Krska und R. Braun

Hefehemmtest zur Bestimmung der Toxizität von DON-Metaboliten
J. Binder, E.M. Horvath, J. Heidegger, N. Ellend, H. Danner, R. Krska und R. Braun

Auftreten von *F. culmorum* an Winterweizen und Nachweis der Fähigkeit zur Trichothecenbildung
A. Schütze, L. Niessen, R.F. Vogel, E.-C. Oerke und H.-W. Dehne

Untersuchungen zur Reduktion der Ergotalkaloidgehalte (Ergonovin, Ergotamin, Ergocryptin) von mutterkornhaltigem Getreide durch verschiedene Behandlungen
E. Landes, M. Coenen und J. Kamphues

Zur Analytik von Lolitrem B im Blutserum von Schafen
Hana Valenta und Elisabeth Oldenburg

Bestimmung von 8 Trichothecenen mittels GC/MS (Ion Trap) nach Festphasenextraktion
M. Schollenberger, U. Lauber, H. Terry, H.-M. Müller und W. Drochner

Untersuchungen zum Verhalten von *Fusarium*-Toxinen währed der Mälzung
Michaela Böhm-Schraml, Gabriele Engelhardt und E. Geiger

HPLC-Methoden zur Bestimmung der Fumonisine B_1, B_2 und B_3 in Lebensmitteln mit Vor- oder Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion
Claus Reusch und Gerhard Thielert

Fusarium Toxins in Western Canadian Barley

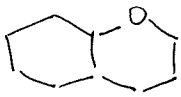
D. Abramson[1], E. Usleber[2], R.M. Clear[3], R. Geßler[2], T. Nowicki[3] and E. Märtlbauer[2]

[1]Agriculture and Agri-Food Canada, Cereal Research Center, 195 Dafoe Rd., Winnipeg R3T 2M9, Canada; [2]Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität, Veterinärstr. 13, 80539 München; [3]Canadian Grain Commission, Grain Research Laboratory, 303 Main St., Winnipeg R3C 3G8, Canada.

Fusarium head blight, caused mainly by *Fusarium graminearum,* is a major disease affecting most North American cereal crops. This *Fusarium* disease resulted in widespread damage to the Manitoba barley and wheat crops of 1993 and 1994, with contamination by deoxynivalenol (DON) and other 8-keto-trichothecenes. Visible *Fusarium* damage in barley correlated poorly with DON levels in the seed as determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Samples of 1993 and 1994 barley showed a moderate correlation between DON level assayed by GC-MS and % of kernels infected by *Fusarium graminearum* (r = 0.65 and 0.68, respectively), but this mycological method is too lengthy and requires too much training for commercial application. A commercial enzyme immunoassay for DON gave results that correlated well with GC-MS methods (r = 0.95 and 0.89, respectively) in samples of 1993 and 1994 barley and afforded a rapid and convenient method for screening.

In barley samples from 1994, DON, 15-acetylDON, 3-acetylDON and 3,15-diacetylDON were detected in the approximate ratio of 47:4:1:1. In view of higher oral toxicities of 15-acetylDON and 3-acetylDON compared to DON, and the unknown oral toxicity of 3,15-diacetylDON, GC-MS assays would be prudent in all samples showing positive results from enzyme immunoassay screening for DON. nivalenol

LD_{50} ↑



DON in Bier ??

yes

but amount is very low

DON	AcDON	
sensitivity	analysis	confirmation
0.1 ppm	EIA	
0.05 ppm	GC (ECD)	GC/MS
0.02 ppm	GC/MS SIM	SIM-2nd ion

Zum Vorkommen von Nivalenol in Getreide und Mais

Hans Lew, Andreas Adler, Wolfgang Brodacz und Walter Edinger
Bundesamt für Agrarbiologie, Wieningerstr. 8, A-4020 Linz

Das zur Gruppe der B-Trichothecene zählende Nivalenol (NIV) gehört neben dem Vomitoxin (DON) und seinen Vorstufen 3-ADON und 15-ADON, dem Zearalenon und dem Moniliformin zu den in Europa auf Getreide und Mais am häufigsten vorkommenden Fusarientoxinen. Gebildet werden kann Nivalenol von NIV-Chemotypen der Fusarienart *F.graminearum*, einigen *F.culmorum*-Stämmen, *F.cerealis* (*F. crookwellense*) und einem Großteil der *F. poae*-Stämme. Untersuchungen in Schweden, Polen und Österreich zeigten, daß *F. poae* aufgrund des häufigen Auftretens bei Getreide und Mais als weitaus wichtigster Nivalenolproduzent angesehen werden muß.

F. poae dominiert regelmäßig die Fusarienflora von Hafer, sodaß es nicht verwundert, daß bei Hafer besonders häufig hohe Nivalenolkonzentrationen nachgewiesen werden können. Obwohl es hier sehr oft mit DON vergesellschaftet vorkommt, zeigt die NIV-Bildung durch *F. poae* auf Hafer einen anderen Zeitverlauf als die DON-Bildung durch *F. graminearum*. Die beiden Fusarienarten scheinen sich hinsichtlich Zeitpunkt und Ort der Primärinfektion bei Hafer zu unterscheiden.

Auch die Gerste scheint aufgrund weltweiter Untersuchungen hinsichtlich Nivalenolkontamination sehr gefährdet, während bei Weizen die Nivalenolbelastung infolge unterschiedlicher Infektionsraten mit *F. poae* von Jahr zu Jahr stark schwanken kann.

Nivalenolgehalte von Körnermais stammen vor allem von Kolbenfusariosen, die durch *F. cerealis (F.crookwellense)* und *F. poae* verursacht werden. Stengelfusariosen, vorwiegend durch *F.graminearum* bzw. *F. culmorum* hervorgerufen, bewirken ein rasches Absterben der gesamten Maispflanze. Als Folge kommt es in den Blättern vielfach zu massiven Sekundärinfektionen mit *F.poae* und einer entsprechend hohen Nivalenolbelastung, die bei Silomais Relevanz bekommt.

Hervorzuheben sind hier auch die Untersuchungsergebnisse aus Braunschweig und Freising, die zeigen, daß auch bei rasch abreifenden Silomaissorten verstärkter Fusarienbefall mit beträchtlicher Nivalenolbildung auftreten kann.

Hauptproduzent von NIV

hohe Gehalte DON/NIV bei Mais wird in der Silage nicht abgebaut aber in Pulver

Gemeinsames Vorkommen von Fusarientoxinen in Getreide

H.-M. Müller, J. Reimann, U. Schumacher und K. Schwadorf
Institut für Tierernährung der Universität Hohenheim, Emil-Wolff-Str.10, 70599 Stuttgart

Daten zum Vorkommen von Fusarientoxinen in Weizen, Gerste und Hafer im Regierungsbezirk Stuttgart in den Erntejahren 1987, 1989, 1990, 1991 und 1992, die an Zufallsproben (Ziehung in den ersten Wochen nach der Ernte auf landwirtschaftlichen Betrieben) erhoben worden waren, wurden unter dem Aspekt des gemeinsamen Auftretens dieser Toxine ausgewertet. Die Angaben beziehen sich auf Zearalenon (ZEA), α- und β-Zearalenol (α-,β-ZOL), Deoxynivalenol (DON), 3-Acetyl-Deoxynivalenol (3-ADON), Nivalenol (NIV), HT-2 Toxin (HT-2) und T-2 Toxin (T-2).

In Weizen, Gerste und Hafer aus allen fünf Jahren (abgesehen von Gerste aus 1990) lag der Prozentsatz der Proben mit nur einem der genannten Toxine unter dem der Proben mit mehr als einem Toxin. Für alle fünf Jahre berechnet beträgt das Verhältnis bei Weizen 27:69, bei Gerste 35:52 und bei Hafer 25:60. In Weizen und Hafer wurden jeweils bis zu sechs, in Gerste bis zu fünf Toxine gemeinsam gefunden. Bezogen auf die Gesamtzahl der Proben aus fünf Jahren lag der Prozentsatz der Proben mit zwei, drei, vier bzw. fünf Toxinen für Weizen bei 35,0, 23,5, 8,5 bzw. 1,0%, für Gerste bei 29,2, 17,9, 4,2 bzw. 0,4%, für Hafer bei 34,2, 19,8, 5,2 bzw. 0,7%.

Insgesamt wurden 47 verschiedene Kombinationen festgestellt, davon 32 mit DON, 23 mit ZEA und 9 ohne diese beiden Toxine. Die Häufigkeit jeder Kombination war von der Getreideart und vom Erntejahr abhängig. Ein Unterschied war insbesondere zwischen 1987 und den anderen Jahren festzustellen. Dies dürfte damit zusammenhängen, daß 1987 die Sommermonate regenreicher waren als 1989-1992. Bezogen auf die Gesamtzahl der Proben aus fünf Jahren dominierte im Weizen die Kombination DON/NIV mit 19,7%, gefolgt von DON/3-ADON/NIV (7,5%), ZEA/DON und DON/3-ADON (beide 6,0%), ZEA/DON/NIV und ZEA/DON/3-ADON/NIV (beide 5,2%) und ZEA/DON/3-ADON (5,0%). In der Gerste dominierten ZEA/DON und DON/3-ADON (beide 8,3%), gefolgt von DON/NIV (7,9%) und ZEA/DON/3-ADON (7,1%). Im Hafer dominierte DON/NIV (15,4%), gefolgt von DON/NIV/T-2 (7,7%) und ZEA/DON und ZEA/DON/NIV (beide 5,1%).

Für Getreide, das als Schweinefutter benützt wird, wird derzeit ein tolerierbarer Höchstgehalt an DON von 1000 μg/kg angenommen. Diese Grenze wurde in den Jahren 1987, 1989, 1990, 1991 bzw. 1992 in 25,0, 1,3, 16,3, 8,8 bzw. 2,6% der Weizenproben, in 9,1, 0,0, 0,0, 0,0 bzw. 0,0% der Gersteproben und in 5,4, 0,0, 0,0, 0,0 bzw. 3,6 % der Haferproben überschritten. Zur Bewertung des gemeinsamen Vorkommens wurde in einem ersten Schritt unter Vernachlässigung von ZEA und 3-ADON und unter Annahme einer additiven Wirkung als "DON-Äquivalent" die Summe der Konzentrationen von DON und der mit einem Faktor korrigierten Konzentrationen von NIV, HT-2 und T-2 berechnet. Mit den Korrekturfaktoren 2 (NIV) und 6 (HT-2, T-2) (Verhältnis der p.o. Toxizitäten bei der Maus) liegt der Prozentsatz der Proben mit einem "DON- Äquivalent" > 1000 μg/kg für Weizen bei 26,2, 1,3, 18,8, 8,8 bzw. 3,8%, für Gerste bei 9,1, 0,0, 0,0, 0,0 bzw.6,9%, für Hafer bei 8,9, 7,1, 0,0, 2,0 bzw. 29,0%. Mit einem Korrekturfaktor von 8 für NIV, HT-2 und T-2 (Verhältnis der i.p.Toxizitäten bei der Maus) ergeben sich insbesondere für Hafer mit 12,5, 23,2, 3,7, 13,7 bzw.43,6% deutlich höhere Werte. Es wird geschlossen, daß für die Bewertung auch NIV, HT-2 und T-2 untersucht werden sollten, insbesondere bei Hafer. Weitere Daten zur Toxizität einschließlich der Interaktion der Toxine (additiv/synergistisch) sind erforderlich.

Untersuchung von Lebensmitteln auf Fumonisine

Gerhard Thielert und Claus Reusch
Chemische Landesuntersuchungsanstalt Sigmaringen, Fidelis-Graf-Straße, 72488 Sigmaringen

Die Chemische Landesuntersuchungsanstalt Sigmaringen führte Untersuchungen von Lebensmitteln auf die Fumonisine B_1, B_2 und B_3 in einem zweijährigen Untersuchungs- und Forschungsprojekt, das vom Ministerium für Umwelt, Baden-Württemberg gefördert wurde, durch.

Das Untersuchungs- und Forschungsprojekt "Fumonisine 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.

Gleichzeitig war zu prüfen, ob der Einsatz von Screeningverfahren (z.B. ELISA) sinnvoll und ausreichend ist oder nur vor der eigentlichen Quantifizierung, z.B. mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie, geeignet ist.

Zur Probenaufarbeitung wurde sowohl ein Verfahren über Ionenaustauschersäulen als auch über Immunoaffinitätssäulen eingesetzt.
Für die quantitativen Bestimmungen kamen chromatographische Verfahren zur Anwendung. Die Dünnschichtchromatographie (DC) wurde neben der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Fluoreszenzdetektion angewendet.
In Anlehnung an Sydenham et al. (1) wurde für den Routineeinsatz eine Methode für die HPLC mit Vorsäulenderivatisierung der Fumonisine und Fluoreszenzdetektion erarbeitet. Zusätzlich wurde eine HPLC-Methode mit Derivatisierung der Fumonisine nach der Säule entwickelt.

Über die Ergebnisse der Untersuchung von Lebensmitteln aus dem Handel auf Fumonisine wird berichtet.

Literatur:

Sydenham, E.W., Shephard, G.S. und Thiel, P.G. (1992): Liquid Chromatographic Determination of Fumonisins B1, B2, and B3 in Foods and Feeds. J. AOAC Intern. 75, 313-318.

SAX oder Immunosäule

OTA

Mais/Maisprodukte

368 Proben Reihen

Mykotoxinbelastung in *Fusarium culmorum* infizierten Winterweizen - Beeinflussung durch Fungizidapplikation

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

Die Partielle Taubährigkeit des Weizens, hervorgerufen durch *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.)Sacc., geht einher mit einer Belastung des Erntegutes durch Mykotoxine. Eine unzureichende Bekämpfung dieses Pathogens kann somit eine gesundheitliche Gefährdung der Verbraucher zur Folge haben. Das Fehlen zugelassener Mittel gegen *F. culmorum* in Weizen und die Tendenz, den Einsatz von Fungiziden so gering wie möglich zu halten, verstärkt diese Gefahr.

In Feldversuchen wurde untersucht, welche Mykotoxine von *F. culmorum* in Weizen gebildet werden und wie sich eine Fungizidbehandlung auf deren Konzentration auswirkt. Winterweizen wurde künstlich mit einer Sporensuspension von *F. culmorum* zu drei unterschiedlichen Entwicklungsstadien infiziert und mit verschiedenen Fungiziden behandelt, die im Getreideanbau eingesetzt werden und eine entsprechende Nebenwirkung gegen *F. culmorum* besitzen. In zwei Versuchsjahren konnte in der Weizensorte „Borenos" nur Deoxynivalenol (DON) nachgewiesen werden, weder Nivalenol, Zearalenon, α-Zearalenol noch β-Zearalenol waren in den Proben in detektierbaren Mengen vorhanden. Die Ergebnisse weisen deutlich auf einen Zusammenhang zwischen Befallsstärke und Mykotoxingehalt der Körner hin. Ein höherer Fusarium-Befall führte in allen Fällen zu einer höheren Belastung mit DON. In allen Fungizid behandelten Varianten war eine der fungiziden Wirkung äquivalenten Reduzierung der DON-Konzentration nachweisbar. Diese Korrelation besteht auch in den Varianten, in denen die Fungizide mit reduzierten Aufwandmengen eingesetzt wurden.

Natürlich Nivalenol (NIV) Desoxynivalenol (DON) kontaminierter Hafer und seine toxischen Wirkungen auf Kücken

J. Böhm[1], J. Grajewski[3], Cornelia Gabler[1] und F. Schilcher[2]
[1]Institut f. Ernährung, [2]Inst. f. Pathologie, Veterinärmedizinische Universität, J. Baumann-G. 1, A 1210 Wien. [3]Lehrstuhl f. Biologie und Umweltschutz, Pädagogische Hochschule, Chodkiewicza-Str. 30, PL 85-064 Bydgoszcz

Aus vorangegangenen Fütterungsversuchen mit Ferkeln war natürlich NIV/DON kontaminierter Ausputzhafer als stark leistungsbeeinträchtigend erkannt worden. In diesen Fütterungsversuchen an männlichen Legehybrid-Kücken wurde der gleiche Hafer direkt, energieausgeglichen, in extrahierter Form bzw. mit verschiedenen Toxinbindemittel versetzt mit einem handelsüblichen Kückenstarter als Kontrolle in seinen Auswirkungen auf Lebendmasseentwicklung und auf die Massen der Organe Leber, Darmtrakt, Nieren untersucht. Die Kücken waren in beheizten Batterien gruppenweise gehalten und ad libitum gefüttert und getränkt worden. Das Futter wurde mit einer eigenen Methode granuliert und an die wenige Tage alten Kücken eine bzw. zwei Wochen lang verabreicht.

Die Ergebnisse waren folgende: Sämtliche ausschließlich NIV/DON Hafer gefütterte Kücken zeigten einen erheblichen Leistungseinbruch in der Gewichtsentwicklung. Darüber hinaus konnte man erhöhte Nierenmassen in diesen Gruppen feststellen. Die Magenvergrößerungen respektive Leberverkleinerungen konnte auf die für Kücken ungewöhnlich erhöhte Rohfaseraufnahme aufgrund des Hafers zurückgeführt werden. Histologisch sind die Ergebnisse von eventüllen Organveränderungen noch in Auswertung. Wurden alkoholische bzw. wässrige Extrakte von den hochkontaminierten Haferproben oder synthetisches NIV/DON in äquater hoher Dosierung einem handelsüblichen Kückenstarterfutter zugesetzt, dann konnten drastische Verschlechterungen in den Lebendmasseentwicklungen aber keine relevanten Veränderungen in den Organen beobachtet werden.

Das läßt die Schlußfolgerung zu, daß Mykotoxine besonders bei nicht ausgewogener Fütterung (Mangelfütterung) zu Organschäden führen oder im Hafer außer den analysierten NIV/DON Trichothecenen zusätzliche nicht erfaßte Toxine enthalten sind , welche Organschäden wie Nierenvergrößerungen verursachen. Ein künstlicher NIV/DON Zusatz von 2,65 ppm DON, 0,5 ppm 3AcDON und 2,65 ppm NIV erbrachte im ausgewogenen Kückenstarterfutter auf Maisbasis keine Organveränderungen wie im Fall des natürlich NIV/DON kontaminierten Hafers. Ein zusätzlich eingemischtes Toxinbindemittel erbrachte ein interessantes Ergebnis: Die innerhalb einer Woche hervorgerufenen Nierenvergrößerungen waren in der darauffolgenden Woche normalisiert.

Wirkung von reinem Deoxynivalenol bei Läuferschweinen
I. Gewinnung der benötigten Toxinmengen - Versuchsaufbau

U. Lauber, M. Schollenberger, S. Götz-Schröm, H.-M. Müller, W. Drochner
Institut für Tierernährung, Universität Hohenheim, Emil-Wolff-Strasse 10, 70599 Stuttgart

Im Rahmen des Teilprojektes B der Forschergruppe "Fusarientoxine, Vorkommen, Wirkung und Prophylaxe", soll die Wirkung von Deoxynivalenol (DON) beim wachsenden Schwein untersucht werden. Um andere Effekte auszuschliessen, soll reines DON einer garantiert toxinfreien Diät in praxisrelevanten Konzentrationen zugesetzt werden.

Versuchsaufbau:

Futter:	halbsynthetisch, toxinfrei, mit individuellen Toxinzusätzen
Toxinkonzentrationen:	0, 300, 600 und 1200 µg je kg Futter
Tiere:	Absetzferkel, DL x Piet, weiblich; 4 Gruppen á 8 Ferkel
Versuchsdauer:	2 Wochen Anfütterung, ca. 8 Wochen Belastung

Die Kosten für eine kommerzielle Beschaffung der hierfür benötigten Toxinmenge (ca. 2.2 g DON) betragen 140000 DM. Aus diesem Grund wurde es notwendig das DON über *Fusarium*-Kulturen aus flüssigem oder festem Medium zu isolieren und aufzureinigen.

Problemstellung:
- Übertragung der relativ aufwendigen und teuren Produktion von DON in Fermentern auf die Verwendung von Flüssig- oder Reiskulturen
- Pilzisolat (*F. culmorum*, *F. graminearum*), welches ausreichend hohe Mengen produziert
- Optimierung der Kultivierungsbedingungen (Vorkultur, Hauptkultur, Produktionsmedium)
- Etablierung und Weiterentwicklung der Methodik (Isolierung)
- Etablierung eines Screeningverfahrens zur schnellen Analyse von 3-ADON und DON

Basierend auf Literaturangaben wurden verschiedene *Fusarium*-Stämme auf Malzextrakt-Agar kultiviert, Vorkulturen (Schüttelkultur, flüssig) hergestellt und damit die Hauptkulturmedien (fest, bzw. flüssig) beimpft. Da 3-ADON im Gegensatz zu DON einfacher aus komplexen Matrices isoliert werden kann, wird die Inkubation bei einsetzender DON-Produktion (maximale 3-ADON-Konzentration) unterbrochen. Das 3-ADON wird mittels wässrigem Methanol extrahiert, durch Flüssig-flüssig-Extraktion mittels Ethylacetat isoliert, an Florisil aufgereinigt und umkristallisiert. Die Hydrolyse zu DON erfolgt mittels eines stark basischen Anionentauschers.
Während in Flüssigkulturen maximal 40 mg DON je Liter Nährmedium produziert werden konnten, betrug die Ausbeute bei Kultivierung auf festem Substrat bis zu 1200 mg DON (je kg Reis). Bedingt durch Emulsionen war die Isolierung von 3-ADON mittels Flüssig-flüssig-Extraktion jedoch erheblich erschwert. Durch die alternative Verwendung von Extrelut-Säulen konnten deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden, sie ist jedoch für die Aufarbeitung großer Extraktmengen zu teuer.
Insgesamt wurden aus 5,4 kg Reis 12 g reines 3-ADON isoliert. Die Hydrolyse von 5,9 g 3-ADON ergab ca. 3.7 g reines Deoxynivalenol.

Wirkung von reinem Deoxynivalenol bei Läuferschweinen
II. Erste Ergebnisse

S. Götz-Schröm, M. Schollenberger, U. Lauber, H.-M. Müller, W. Drochner
Institut für Tierernährung, Universität Hohenheim, Emil-Wolff-Str. 10, 70599 Stuttgart

Gemessen an der Häufigkeit des Vorkommens und den beobachteten Toxingehalten in Getreide, zählt Deoxynivalenol (DON) zu den dominierenden Trichothecenen in Mitteleuropa. Der derzeitige Kenntnisstand zur Toxizität beruht hauptsächlich auf Untersuchungen, die mit reinen Toxinen an Zellkulturen und Labortieren durchgeführt wurden.

In nahezu allen Untersuchungen mit landwirtschaftlichen Nutztieren wurde DON aus Kostengründen über natürlich infiziertes Getreide zugeführt. Eine Kontamination mit weiteren Mykotoxinen ist dabei grundsätzlich nicht auszuschließen, wodurch beobachtete Effekte nicht eindeutig auf das DON zurückgeführt werden können.

Deshalb wurde in dem vorliegenden Versuch reines DON in praxisrelevanten Konzentrationen einer getreidefreien Diät zugesetzt. Um Belastungen der Tiere vor Versuchsbeginn weitgehend auszuschließen, erhielten sowohl die tragenden Muttersauen als auch die Absetzferkel DON-freies Futter.

Zur Überprüfung von in der Literatur beschriebenen Effekten wurden schwerpunktmäßig in Zusammenarbeit mit anderen Laboratorien folgende Untersuchungen durchgeführt:

- um Störungen des Stofftransportes durch die Darmwand zu beobachten wurden Studien zur transmembranalen Aufnahme von Glucose und Aminosäuren an luminalen Membranvesikeln von Enterozyten vorgenommen, sowie der Protein- und Aminosäureanteil im Kot bestimmt
- eine Hemmwirkung auf die Proteinbiosynthese soll anhand von Einbaustudien mit radioaktiv markierten Aminosäuren in Organsuspensionen von Darm und Leber und Bestimmung der Aminosäuregehalte im Blut untersucht werden
- der allgemeine Gesundheitsstatus der Tiere wurde über die tägliche Futteraufnahme, die wöchentlichen Gewichtszunahmen und durch Beobachtung des Tierverhaltens kontrolliert
- außerdem wurden zur Kontrolle des Allgemeinzustandes der Tiere und des Leberstoffwechsels in wöchentlichen Abständen ausgewählte Blutparameter bestimmt
- um erste Anhaltspunkte über Veränderungen im Immunsystem zu erhalten, soll in ausgewählten Proben das Immunglobulinspektrum bestimmt werden - zusätzlich wurde wöchentlich das Differentialblutbild erstellt
- die Fähigkeit von Mikroorganismen durch eine länger andauernde DON-Belastung Trichothecene zu transformieren, wird in Inkubationsversuchen mit Frischkot untersucht
- mögliche Auswirkungen auf die Feinstruktur der Targetorgane, werden durch mikrohistologische Untersuchungen erfasst

Das Vorhaben dient damit der Sammlung von Basisdaten (Modelltier Schwein) für eine Einschätzung des Gefährdungspotentials von DON auch für andere Säugetierspezies.

Laborvergleichstest für die Bestimmung von Desoxynivalenol in Weizen

R. Krska, R. Schuhmacher, M. Grasserbauer
Interuniversitäres Forschungsinstitut für Agrarbiotechnologie (IFA-Tulln), Analytikzentrum, Konrad-Lorenzstraße 20, A-3430 Tulln, Austria (KRSKA@IFA1.BOKU.AC.AT)

Aufgrund seiner großen Bedeutung für die österreichische Landwirtschaft wird Desoxynivalenol (DON) von vielen europäischen Institutionen und Labors mehr oder weniger regelmäßig analysiert. Dabei kommt der Zuverlässigkeit der gewonnenen Analysendaten bei der Bewertung von kontaminierten Produkten natürlich größte Bedeutung zu. In einem vom Analytikzentrum des IFA-Tulln organisierten Laborvergleichstest wurde die Qualität und die Vergleichbarkeit von Ergebnissen nach Analyse von DON in Weizen durch insgesamt dreizehn Teilnehmer aus Österreich, Deutschland, Kanada, Ungarn und den USA untersucht. Darüber hinaus sollte durch diesen Laborvergleichstest vor allem ein Erfahrungs- und Wissensaustausch unter den teilnehmenden Labors angeregt werden, um dadurch eine Verbesserung der Analysenqualität auf dem Gebiet der Mykotoxinanalytik zu ermöglichen.

Die Teilnehmer erhielten für jedes Mykotoxin fünf verschiedene Probenarten (DON-Standardlösung, unbelasteten Weizen, künstlich kontaminierten Weizen (spiking Level 1: 100-500 µg/kg DON, spiking - Level 2: 1000-5000 µg/kg) und natürlich mit DON kontaminierten Weizen (100-1000µg/kg DON in Weizen).

Neben ELISA Verfahren wurde DON vor allem mittels Gaschromatographie-Elektroneneinfangdetektion (GC-ECD) und RP-HPLC mit UV-Detektion quantifiziert. Unter Verwendung der Summe der absoluten z-Scores (SAZ) zur Bewertung der Laborleistung konnten sieben der teilnehmenden Labors als gut bezeichnet werden (SAZ<3). Überraschenderweise hatten viele Teilnehmer Probleme bei der Analyse der Standards (CV=21%). Dafür konnte auch beim abschließenden Teilnehmertreffen kein Grund gefunden werden, obwohl festgestellt werden kann, daß insbesondere jene Labors, die ELISAs verwendeten die größten Abweichungen von der Standard-Sollkonzentration aufwiesen. Die Mitlieferung des DON-Standards (deklariert als 10 µg/l), mit dem jeder Teilnehmer seine Kalibration durchzuführen hatte, war demnach entscheidend für die - im Vergleich zu anderen Ringversuchen - recht gute Übereinstimmung der Ergebnisse für DON in Weizen. Diese Ergebnisse und das enorme Interesse der Teilnehmer zeigte jedoch auch klar auf, daß Bedarf nach weiteren Mykotoxin- Laborvergleichstests besteht.

Biotransformation von Mykotoxinen von Fusarium spp.

Andrea Völkl[1], Gertrud Woerfel[1], Tanja Häußermann[1],
Bernhard Vogler[2], Iris Klaiber[2] und Petr Karlovsky[1]
[1]Institut für Phytomedizin der Universität Hohenheim, Otto-Sander-Str. 5, 70599 Stuttgart,
und [2]Institut für Chemie der Universität Hohenheim, Garbenstr. 30, 70593 Stuttgart

Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA) sind Mykotoxine, die von *Fusarium* spp. in Getreide gebildet werden und wegen ihrer toxischen (DON) bzw. östrogenen (ZEA) Wirkung ein gesundheitliches Risiko für Mensch und Tier darstellen. Weder die Resistenzzüchtung noch die Anwendung von Fungiziden konnte bisher die Belastung des Erntegutes mit diesen Mykotoxinen wirksam einschränken.

Unsere Gruppe beschäftigt sich mit der Isolierung und Charakterisierung von Genen, deren Produkte DON und ZEA enzymatisch detoxifizieren. Diese Gene sollen in Kulturpflanzen übertragen werden, um Mykotoxine direkt am Ort ihrer Ausscheidung durch parasitierende Fusarien zu inaktivieren. Neben einer Minderung der Toxinbelastung des Erntegutes wird eine Ertragssteigerung in Beständen erwartet, die mit Fusarien befallenen sind, weil DON einen Virulenzfaktor dieser Pathogene darstellt. Weiterhin können toxinabbauende Aktivitäten in Hefen als Zusatz zum Tierfutter exprimiert werden.

Mikrobielle Degradation von DON scheint mit Ausnahme der Pansen- und Darmflora bestimmter Tiere in der Natur sehr selten. In unserem Screening hat nur eine Mischkultur von ca. 1000 untersuchten Proben DON transformiert. Der aus dieser Probe isolierte aktive Stamm HOH107 erwies sich als Vertreter einer neuen Gattung von α-Proteobacterien. Seine nächsten Verwandten sind photosynthetisierende, marine Bakterien der Gattung *Rhodobium*. Die Transformation von DON durch HOH107 erfolgt unter aeroben Bedingungen und unterliegt katabolischer Repression durch Glucose. Das erste Produkt, als X1-DON bezeichnet, besitzt nach massenspektroskopischen Analysen das Molgewicht von 310 Dalton. ^{1}H-NMR und ^{13}C-NMR zeigten, daß C2 eine zusätzliche OH-Gruppe aufweist und C3 zur Keto-Gruppe oxidiert wurde. Chromatographisch lassen sich drei weitere Produkte der DON-Transformation nachweisen, die sich laut ihrer relativen Polarität wie folgt anordnen lassen: L1-DON > DON > > L2-DON >> X1-DON ≈ X2-DON. Der Stamm HOH107 transformiert neben DON noch folgende Trichothecene: 15-Acetyl-DON, Diacetoxyscirpenol, Fusarenon-X und Nivalenol. Die Toxizität der Transformationsprodukte wird gegenwärtig in einem Biotest mit *Artemia salina* untersucht.

Beim Screening auf ZEA-Degradation zeigte sich, daß viele Bakterien und Pilze in der Lage sind, ZEA zu α-Zearalenol bzw. ß-Zearalenol zu reduzieren. Die Hydrolyse der Lacton-Bindung von ZEA wurde aber nur bei einem Pilz nachgewiesen. Die Bildung der ZEA-spezifischer Esterase wird durch Zugabe von ZEA ins Kulturmedium induziert. Die Aktivität der Esterase bleibt im zellfreien Extrakt aus dem induzierten Myzel erhalten, neben ZEA werden auch die beiden Zearalenole hydrolysiert.

Neue Erkenntnisse über die mikrobielle Detoxifikation von DON und 3-Acetyl-DON

J. Binder[a], E.M. Horvath[c], G. Schatzmayr[a], N. Ellend[b], H. Danner[a], R. Krska[b], R. Braun[a]
Interuniversitäres Forschungsinstitut für Agrarbiotechnologie, Abt. Umweltbiotechnologie[a] und Abt. Analytische Chemie[b], Konrad Lorenz Str. 20, A-3430 Tulln
Biomin GTI[c], Industriestr. 21, A-3130 Herzogenburg

Abstrakt (Vortrag)

Ein Überblick über die Erkenntnisse, die im Rahmen des Forschungsprojektes „Screening nach DON und 3-Acetyl-DON transformierenden Mikrooganismen" gewonnen wurden, wird präsentiert.

Alle literaturbekannten Versuche zur Isolation von Mikroorganismen-Reinkulturen, die imstande sind, DON zu detoxifizieren, blieben bisher ohne Erfolg. Um zu klären, ob es nur in Mischkulturen zur Detoxifikation kommt, oder ob auch Reinkulturen oder definierte Kokultivationen DON transformieren können wird das gegenständliche Projekt durchgeführt.

Als natürliche Habitate für die Untersuchungen dienten in Falle aerober Mikroorganismen die autochtone Bodenflora und im Falle anaerober Mikroorganismen die Pansenflora von Wiederkäuern.

Die Experimente mit aerober Bodenmischkultur führten zur Detoxifikation von DON bzw. 3-Acetyl-DON. Dabei wurde innerhalb von wenigen Stunden Acetyl-DON deacetyliert und anschließen das DON zu unbekannten Metaboliten umgesetzt. Untersuchungen dieser Metaboliten in einem Hemmtest mit Hefezellen zeigten keine Toxizität. Versuche, aktive biotransformierende Reinkulturen zu gewinnen, blieben erfolglos.

Ergebnisse der Biotransformation von DON mit aeroben Mischkulturen und derzeit vorliegende Untersuchungsergebnisse bezüglich der Metaboliten werden präsentiert.

Detoxifikationsversuche mit anaerober Pansenflora zeigten rasche Biotransformation des DON bzw. 3-Acetyl-DON zum bekannten Metaboliten DOM-1. Alle uns literaturbekannten Versuche, eine aktive Reinkultur aus Pansen zu isolieren, blieben bisher ohne Erfolg. Ursache dürften die komplexen Interaktionen in der Pansenmischkultur sein. Konventionelle Methode zur Anreicherung und Isolation berücksichtigen diese Interaktionen meist nicht, wodurch der aktive Mikroorganismus in Anreicherungskulturen keine geeigneten Wachstumsbedingungen vorfindet.

Durch Variation der Medienzusammensetzung, Einsatz von Antibiotika und Berücksichtigung bekannter Interaktionen der Pansenflora gelang erstmals die Isolation einer aktiven, DON transformierende definierten Kultur, bestehend aus zwei Mikroorganismen. Derzeit laufen Versuche dieses offensichtlich syntropische System zu trennen und die beiden Mikroorganismen zu identifizieren. In weiteren Experimenten wurden diese Kultur charakterisiert und das Detoxifiaktionspotential in *in-vitro* Versuchen untersucht.

Neue Ergebnisse der umfangreichen Untersuchungen zur mikrobiellen Detoxifikation von Vomitoxin werden präsentiert.

Analytik mikrobieller Abbauprodukte von Desoxynivalenol

Nina Ellend[1], Eva-Maria Horvath[3], Elke Schaffer[3], Johann Binder[2], Rudolf Krska[1]
[1]IFA Tulln, Analytikzentrum und [2] Abteilung Umweltbiotechnologie, Konrad-Lorenz Str. 20, 3430 Tulln, Österreich, (3) Biomin Gesunde Tierernährung International GmbH., Industriestr. 21, 3130 Herzogenburg, Österreich

Die Kontamination von Getreide mit Trichothecenen, vor allem mit Desoxynivalenol, stellt europaweit ein bedeutendes Problem in der Futtermittelindustrie dar. Herkömmliche Methoden zur Dekontamination der mykotoxinbefallenden Futtermittel, wie Verdünnen mit unkontaminiertem Material oder chemische Behandlung, werden auf Grund zu geringer Effizienz, bzw. Verminderung des Nährwertes wenig angewendet. Bekannter ist das Zufüttern von Adsorbentien, die eine mehr oder weniger spezifische Bindung mit den Mykotoxinen eingehen, wobei die Trichothecene aufgrund ihrer geringen Polarität eine Problemgruppe darstellen. Ein möglicher Weg die Toxizität der Trichothecene zu senken, ist die mikrobiologische Transformation der Verbindungen, bei der die 12,13-Epoxidgruppe, die aufgrund ihrer Möglichkeit die Proteinbiosynthese zu hemmen als die für die Toxizität verantwortliche Gruppe gilt, umgewandelt wird.

Zielsetzung dieser Arbeit war es, analytische Methoden zu entwickeln, die es ermöglichen die Abbauprodukte von mikrobiellen Transformationsversuchen zu detektieren und zu identifizieren. Dafür wurde eine hochdruckflüssigkeitschromatographische Methode (HPLC) mit UV-Detektion und verschiedene dünnschichtchromatographische Methoden (DC) entwickelt. Zur Identifizierung der Metaboliten wurde zusätzlich noch eine gaschromatographische Methode mit anschließender Massendetektion (GC-MS) herangezogen.

Um störende Begleitsubstanzen und Matrixeffekte bei der HPLC-Methode, die für qualitative und quantitative Aussagen herangezogen wurde, zu minimieren, muß der Trennung und Detektion eine Aufreinigung der Proben vorrausgehen. Dazu wurde eine Schnellmethode mit Mycosep™- ? Festphasensäulen, die sowohl polare als auch apolare Eigenschaften besitzen, angewendet.

Aufgrund des hohen Probendurchsatzes wurden zusätzlich zur HPLC-Methode verschiedene dünnschichtchromatographische Methoden entwickelt, die es erlauben, in kürzester Zeit und ohne vorhergehende Probenaufarbeitung qualitative Aussagen über die Transformationsversuche des Desoxynivalenols zu machen. Für die aeroben Transformationsversuche wurden die Proben auf Kieselgel 60-Alufolien aufgetragen und mit einem Gemisch aus iso-Propanol und n-Hexan 25:75 als Laufmittel entwickelt. Die Spots wurden entweder mit Aluminiumchlorid, Chromotropsäure oder 4-(4-Nitrobenzyl)Pyridin (NBP) visulaisiert. Für die anaeroben Transformationversuche wurden RP-Glasplatten verwendet. Als Laufmittel diente hier ein Gemisch aus 0,5-m NaCl und Acetonitril 60:40. Die Visualierung der Spots wurde wie bei den anaeroben Versuchen vorgenommen.

Superkritische Fluid Extraktion (SFE) von Fusarientoxinen aus Weizen

Ralf Josephs, Rudolf Krska und Manfred Grasserbauer
IFA Tulln, Abt. Analytikzentrum, Konrad-Lorenz-Str. 20, A-3430 Tulln, Austria
(eMail: josephs@ifa1.boku.ac.at)

Das Fusarientoxin De(s)oxynivalenol (DON oder Vomitoxin), ist ein von Schimmelpilzen gebildetes sekundäres Stoffwechselprodukt, das bei Warmblütern eindeutig toxische Wirkungen hervorruft und vor allem für die Landwirtschaft von großer Bedeutung ist.

Das polare DON wird der Gruppe der Trichothecene zugeordnet, die mehr als 60 Mykotoxine umfaßt und deren molekulares Grundgerüst das tetrazyklische 12,13-Epoxytrichothec-9-en-Ringsystem ist. Gebildet wird DON vorwiegend durch verschiedene Arten der Feldpilzgattung Fusarium auf geeigneten Substraten (insbesondere Weizen). Da DON neben einigen anderen Trichothecenen, Moniliformin und Zearalenon zu den häufigsten in Österreich vorkommenden Fusarientoxinen zählt, wird ständig nach leistungsfähigeren analytischen Verfahren für die quantitative Bestimmung gesucht.

Ein wichtiger Schritt dabei ist die Probenvorbereitung, die eine schnelle, selektive und möglichst vollständige Extraktion des DON aus der Matrix umfassen muß. Eine leistungsfähige Alternative zu den klassischen Extraktionstechniken stellt dabei die umweltfreundliche Superkritische Fluid Extraktion (SFE) dar, die überdies keine weiteren „Clean-up"-Prozeduren erfordert. Ziel dieser Arbeit war es, für die Extraktion von DON aus Weizen eine SFE-Methode zu entwickeln und zu optimieren. Die etablierte klassische Flüssigextraktion mit einem Acetonitril / Wasser-Gemisch (84/16 v/v) und anschließendem „Mycosep"-Clean-up diente dabei als Referenzmethode. Die chromatographische Trennung und Detektion erfolgte in beiden Fällen „off-line" mittels RP-HPLC-DAD (220 nm), sowie bei weiterführenden Versuchen mit Hilfe der GC-ECD nach Derivatisierung.

Die SFE wurde, unter Verwendung von modifiziertem CO_2, in einem statisch / dynamisch kombinierten Modus durchgeführt. Dabei waren zahlreiche Parameter, wie beispielsweise die Extraktionsbedingungen, der Modifer und die Analytkollektion mittels Festphasen, schrittweise unter Einsatz einer DON dotierten inerten Matrix, eines DON dotierten Weizens und schließlich eines natürlich DON kontaminierten Weizens zu optimieren.

Die SFE-Wiederfindungsraten konnten für DON dotierten Weizen zu 90,1 ± 10,7 % und für natürlich DON kontaminierten Weizen zu 53,0 ± 3,2 % bestimmt werden. Die Summe der Extraktionszeit betrug dabei 45 min, während die Kosten pro Analyse mit den Kosten der klassischen Methode vergleichbar waren. Ähnliche Studien über Aflatoxine konnten bei sinnvollen Extraktionszeiten von 60-90 min nur von Wiederfindungsraten im Bereich von 4-14 % berichten. Unsere Untersuchungen zeigten ferner, daß mit der für DON optimierten SFE-Methode auch eine Simultanbestimmung der 5 Fusarientoxine DON, 3-Acetyl-DON, 15-Acetyl-DON, Nivalenol und Fusarenon X möglich ist. Diese Arbeit stellt somit die erste erfolgreiche Anwendung der SFE zur Extraktion von DON, dem bedeutendsten Mykotoxin Nord- und Mitteleuropas dar.

In vitro DNA and nucleotides adducts formation caused by ochratoxin A

Sophie Obrecht-Pflumio[1] and Guy Dirheimer[2]
1, IUT Louis Pasteur, allée d'Athènes, F-67300 Schiltigheim.
2, IBMC CNRS, 15 rue René Descartes, F-67084 Strasbourg.

In vivo methodologies are often complicated by the complexity of the intact organism. When DNA adducts are found after administration of ochratoxin A (OTA) to an animal, they can have an epigenetic origin in which adducts are formed by secondary effects. *In vitro* assays can distinguish direct and indirect mecanisms involved in adduct formation. Previously we have shown that the DNA adduct level after a single acute administration of OTA to mice, was 3 times higher in the kidney than in the liver (PFOHL-LESZKOWICZ et al., 1993). In addition, the DNA adduct level was observed to be dramatically reduced in kidney and urinary bladder after pretreatment of mice with indomethacin, an inhibitor of prostaglandin H synthase (PGHS). These results have suggested that PGHS plays an important role in the metabolism of OTA, leading to genotoxic metabolites (OBRECHT-PFLUMIO et al., 1996). Therefore, we have began *in vitro* experiments using kidney and liver microsomes, incubated with adduct-free DNA, OTA and 2 cosubstrates either arachidonic acid (to explore the role of PGHS) or $NADPH_2$ (to prospect the involvement of cytochromes P450). Our results show that OTA gives rise to DNA adducts *in vitro*. This is in agreement with the *in vitro* studies and provides evidence for direct genotoxic activity of the mycotoxin after its metabolism. In this case, DNA adduct level was higher in the presence of kidney microsomes than those of liver. In addition, when $NADPH_2$ was used as cosubstrate with kidney microsomes, the adduct levels were detected to be lower than the amount of adducts measured using arachidonic acid. These results lend support to the hypothesis of the activation of OTA by the peroxidasic activity of PGHS.
To identify the nucleotides of DNA modified by the OTA metabolite(s), we have used dAMP, dCMP, dGMP or dTMP as substrates, under the same conditions as used with DNA. The adducts were only found in dGMP, in higher amounts when arachidonic acid was used compared to $NADPH_2$ as cosubstrate. In the former case, 4 major types of adducts were found, representing respectively 100, 92, 69 and 60 adducts per 10^9 nucleotides. We have also used the dG-p-dC and polydG-polydC as alternative substrates. Similar results were obtained.
Horseradish peroxidase has an enzymatic action very close to the peroxidasic activity of the PGHS. Therefore in subsequent studies, we have conducted the same experiment substituting the kidney microsomes with horseradish peroxidase and using cumene-hydroperoxide in place of arachidonic acid as cosubstrate. DNA, dGMP, dG-p-dC or polydG-polydC served as substrates in presence of OTA. Consequently, we have obtained similar patterns of adducts as those with kidney microsomes. The results of these investigations support the implication that the activation of OTA to genotoxic compound(s) occurs by a peroxidasic mechanism leading to adducts in DNA guanylic residues.

References

OBRECHT-PFLUMIO, S., GROSSE, Y., PFOHL-LESZKOWICZ, A. and DIRHEIMER, G. (1996) : Protection by indomethacin and aspirin against genotoxicity of ochratoxin A, particularly in the urinary bladder and kidney. Arch. Toxicol. 70, 244-248.

PFOHL-LESZKOWICZ, A., GROSSE, Y., KANE, A., CREPPY, E.E. and DIRHEIMER, G. (1993): Differential DNA adduct formation and disappearance in the mouse tissues after treatment with the mycotoxin ochratoxin A. Mut. Res. 289, 265-273.

Einfluß von Ochratoxin A (OTA) auf die immunologischen Abwehrparameter des Schweines

Peter Kielstein, Günter Müller, Heino Rosner, Angela Berndt und Martin Heller
Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin,
Naumburgerstraße 96 a, 07743 Jena

Zusammenfassung

Zur Prüfung immunsuppressiver Wirkungen von Ochratoxin A (OTA) auf den Verlauf von faktorenabhängigen Infektionskrankheiten des Schweines prüften wir verschiedene OTA-Dosen sowohl im Form des Reintoxins als auch von OTA in einem Rohtoxin. Die Dosis pro Versuchstier wurde in Abhängigkeit von den unter mitteleuropäischen Verhältnissen in Mischfuttermitteln vorkommenden OTA-Mengen zwischen 20 µg und 50 µg/kg KM/d festgelegt und diese Menge wurde 35-37 Tage subkutan verabreicht. Als Infektionsmodelle wurden eine P.-multocida A- bzw. H.-parasuis-Belastung gewählt. In 7 Versuchsansätzen mit jeweils 6 Versuchs- und 6 Kontrolltieren wurden verschiedene klinische, immunologische und Blutbild-Parameter und am Versuchsende der Pneumoniegrad sowie die Polyserositis als die entscheidenden Parameter zur Beurteilung eines OTA-Einflusses auf den Verlauf der Faktorenkrankheiten Enzootische Pneumonie und Glässersche Krankheit ermittelt.

Die tägliche Verabreichung von 20 µg OTA-Reintoxin bzw. 20 µg OTA im Rohtoxin führten zu keinen Unterschieden im Pneumoniegrad nach einer P.-multocida A-Infektion zwischen Versuchs- und Kontrolltieren. Jedoch wiesen die Versuchstiere mit 20 µg OTA im Rohtoxin eine um das 2,5fache geringere OTA-Serumkonzentration als nach Verabreichung von 20 µg Reintoxin sowie eine Eosinophilie, Monozyto-penie und eine erhöhte Chemilumineszenz der Blutzellen auf. Die daraufhin in den weiteren Versuchen eingesetzte erhöhte OTA-Dosis im Rohtoxin (50 µg/kg KM/d) führte zu Serumkonzentrationen wie nach der 20 µg OTA-Reintoxinapplikation. Aber auch nach einer H.-parasuis-Infektion konnten unter dieser erhöhten OTA-Dosis im Rohtoxin kein Einfluß auf den Pneumoniegrad und auf das Auftreten von Glässerscher Krankheit sowie auf wichtige zelluläre und humorale Infektionsabwehr-mechanismen beobachtet werden. Aber auch in der Versuchsreihe mit 50 µg OTA im Rohtoxin wurden eine Eosinophilie, Erhöhung der Chemilumineszenz und Apoptose der Blutzellen bei den Versuchstieren festgestellt. Es muß geklärt werden, ob es sich hierbei um toxische Wirkungen von Nebenprodukten im Rohtoxin z.B. auf Knochenmarkzellen im Sinne eines Zellstresses und nachfolgenden Zelltod (Apoptose) handelt.

Uptake of ochratoxin A into liver cells occurs by carrier-mediated transport via the organic anion transporting polypeptide oatp.

Ernst Petzinger, Maria Kontaxi und Uta Eckhardt
Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Frankfurter Straße 107, D-35392 Gießen
mit Unterstützung des Instituts für Klinische Pharmakologie, CH-8091 Zürich

Ochratoxin A (OTA) is a pathogenic threat for man and animals since it is a contaminant of cereals and animal feed in temperate climates. The mycotoxin is well known to provoke nephrotoxic, hepatotoxic, genotoxic, immunosuppressive and cancerogenic effects in domestic and laboratory animals, and in humans (1). Toxikokinetic studies upon metabolism, distribution and elimination have demonstrated a major role of the liver. After oral absorption ochratoxin A is delivered to the liver via portal blood from which it is extracted by rapid hepatocellular uptake and secretion into bile. This liver clearance process has not been characterized previously in detail. In this study we have characterized the uptake of [^{3}H]OTA with isolated rat hepatocytes and have performed extraction studies with the in situ-perfused rat liver. Ochratoxin uptake was cell specific; no transport was observed into human HepG2 cells, rat FAO-hepatoma cells, HPCT-hepatocytoma cells and baby hamster kidney cells BHK. Uptake in hepatocytes was saturable with affinity constant for transport K_m = 18.9 µM and maximal transport capacity V_{max} = 473 pmol/mg/min. It was temperature dependent with apparent activation energies of A_{app} = 30.4 kJ/mol and 76.6 kJ/mol. These uptake properties were compatible with the participation of a membrane carrier.
Several weak organic acids such as bile acids and bromosulfophthalein but not phenylalanine and isocoumarine inhibited OTA transport competitively. We concluded that a bile acid/organic anion carrier ist involved in rat liver OTA uptake. In hepatocytes the bile acid carriers Ntcp (Na^+-dependent taurocholate transporting polypeptide) and oatp (organic anion transporting polypeptide) have been cloned from rats (2). In order to differentiate between these carriers we have injected freshly prepared cRNA of each carrier clone into oocytes from Xenopus laevis frogs. After three days the frog oocytes became competent for bile acid uptake indicating the expression and insertion of the appropriate carrier into the oocyte cell membrane. Only the oocytes which expressed the cRNA of the oatp took up [^{3}H]ochratoxin A. This uptake was again inhibited by several bile acids and cholephilic organic anions known to be substrates of the oatp.
In conclusion we have demonstrated that ochratoxin A uptake into liver cells is mediated by the organic anion transporting polypeptide oatp (3) This explains preferential OTA burden of liver cells when the mycotoxin is absorbed from the ingesta.

(1) KUIPER-GOODMAN, T und P.M. SCOTT (1989): Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. Biomed. Environ. Sci. **2**, 179-248.
(2) HAGENBUCH, B., JACQUEMIN, E. und P.J. MEIER (1994): Na^+-dependent and Na^+-independent bile acid uptake systems in the liver. Cell. Physiol. Biochem. **4**, 198-205
(3) KONTAXI, M., ECKHARDT, U., HAGENBUCH, B., STIEGER, B., MEIER, P.J., und E. PETZINGER (1996): Uptake of the mycotoxin ochratoxin A in liver cells occurs via the cloned organic anion-transporting polypeptide. J. Exp. Pharm. Ther. **279**, 1507-1513

(Kontaxi et al
J. Pharmacol Exp Ther in press 1996

The renal collecting duct as a target of acute ochratoxin A exposure: Effects on acid-base homeostasis

Michael Gekle, Ruth Freudinger, Sigrid Mildenberger, Stefan Wünsch, Gen Kuramochi and Stefan Silbernagl
Physiologisches Institut, Röntgenring 9, 97070 Würzburg, Germany

Introduction. The collecting duct of the mammalian kidney is a heterogeneous epithelium responsible for the final adjustment of urine pH, electrolyte content and osmolality. Thus, the collecting duct plays a crucial role in water-, electrolyte- and pH-homeostasis. It consists of two cell types: principal cells (PC; responsible for Na^+ and K^+-transport) and intercalated cells (IC; responsible for acid-base transport). Exposure to the nephrotoxic fungal metabolite ochratoxin A (OTA) leads to alterations of renal function that point to the collecting duct as a primary target, e.g. increased electrolyte excretion, reduced osmolality.

Aims. In this study, we investigate the effects of OTA on renal collecting duct by (i) conventional clearance techniques, (ii) analysis of collecting duct fluid by micropuncture techniques and (iii) in collecting duct-derived MDCK cells. The results presented here will focus on the collecting duct as an acid-base transporting epithelium.

Results. (i) Acute intravenous application of 3 µmol/lkg OTA to male Wistar rats results in an increase of urine pH from 6.0 to 6.6 within 30 min with a concomitant decrease of titratable acid excretion by 50%. By contrast, there is no impairment of proximal tubular or glomerular function.

(ii) Micropuncture experiments show that the pH of collecting duct fluid also increases by 0.6 pH-units within 30 min after OTA application. This effect is the result of an increase of urine HCO_3^--concentration with no change in CO_2-concentration. Thus, OTA acutely impairs H^+-secretion and HCO_3^--reabsorption in renal collecting duct.

(iii) In order to investigate the effect of OTA on the cellular level, we use two types of collecting duct-derived MDCK cells, cloned in our laboratory. MDCK-C11 resembles intercalated cells and MDCK-C7 resembles principal cells. We determined the effect of OTA on plasma membrane Cl^- conductance by whole-cell patch clamp, and on cytoplasmic pH with the fluorescence dye BCECF. In C11-cells 1 µM OTA blocked the whole-cell Cl^- conductance by 50% 30-60s after application. Furthermore, OTA induced an intracellular alkalinization by 0.11 pH-units in C11-cells. The rate of alkalinization correlated with the functional activity of the plasma membrane Cl^-/HCO_3^--exchanger. In C7-cells, where the Cl^-/HCO_3^--exchange activity is low, 1 µM OTA induced only a small acidification by 0.03 pH-units.

Conclusions. We conclude that the renal collecting duct is a primary target during acute OTA exposure. According to a recent study from our laboratory OTA is partially reabsorbed along the collecting duct thereby gaining access to intercalated cells. OTA reduces plasma membrane Cl^- conductance thereby disturbing cellular pH-homeostasis in intercalated cells, due to their high Cl^-/HCO_3^--exchange activity. Subsequently, transepithelial acid-base transport is impaired resulting in reduced urine acidification. Changes in cellular pH-homeostasis may be one event leading to the alterations of collecting duct cell function observed during long-term exposure, like reduced concentrating ability and cell transformation.

Induktion von DNA-Reparatursynthese durch Ochratoxin A in vitro

Wolfram Föllmann, Angelika Flieger und Angelika Dörrenhaus
Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund, Ardeystr. 67, 44139 Dortmund

Das Mykotoxin Ochratoxin A (OTA) wurde lange Zeit als nicht-genotoxisch betrachtet. Erst in den letzten Jahren haben in vitro-Studien zeigen können, daß OTA ein genotoxisches Potential besitzt (Degen et al., Arch Toxicol in press 1997; Föllmann et al., Arch Toxicol 69: 280-286, 1995; Obrecht-Pflumio et al., Arch Toxicol 70: 244-248, 1996). In der vorliegenden Studie wurde an verschiedenen Zellkultursystemen demonstriert, daß OTA DNA-Schäden verursacht, die von betroffenen Zellen im Rahmen einer nachweisbaren DNA-Reparatursynthese (UDS = unscheduled DNA synthesis) repariert werden.

Als Standard-Zellkultursystem für den UDS-Assay werden kultivierte Rattenhepatozyten benutzt, die unter Standardkulturbedingungen nicht proliferieren und dadurch eine Detektion von DNA-Reparatursynthese erlauben. In der Literatur liegen Daten vor, die eine schwache bis keine Induktion von UDS durch OTA in diesem System beschreiben (Mori et al., Cancer Res 44: 2918-2923, 1984 bzw. Bendele et al., Food Chem Toxicol 23: 911-918, 1985). Diese Befunde konnten teilweise bestätigt werden. Nur in einem sehr engen Konzentrationsbereich (750-1000 nM) war OTA schwach positiv. Niedrigere Konzentrationen waren negativ und höhere Konzentrationen zytotoxisch.

Wurden Zellkulturen von Epithelzellen verwendet, die aus Harnblasen von Schweinen stammten, so waren die Ergebnisse signifikant positiv. Die hier verwendeten Zellkulturen wurden in vorangegangenen Studien eingehend charakterisiert (Guhe und Föllmann, Am J Physiol 266: F298-F308, 1994; Guhe et al., Arch Toxicol 70: 599-606, 1996) und stellen ein geeignetes in vitro Modell der Harnblase, einem Zielorgan von OTA, dar. Um eine Unterscheidung von normaler, replikativer DNA-Synthese und DNA-Reparatursynthese zu ermöglichen wurde die Proliferation der Zellen durch Kultur in einem Arginin-defizienten Kulturmedium gehemmt. In diesen Zellen konnte in einem Konzentrationsbereich von 250-1000 nM OTA eine konzentrationsabhängige Induktion der DNA-Reparatursynthese nachgewiesen werden. In Konzentrationen über 1000 nM war OTA auch in diesem Zellsystem zytotoxisch.

Um auch Ergebnisse mit humanen Zellmaterial zu erhalten, wurden primäre Urothelzellen menschlichen Ursprungs (OP-Material) kultiviert und im UDS-Test benutzt. Auch in diesem Zellkultursystem konnte eine Induktion der UDS durch OTA nachgewiesen werden.

Zusammen mit den bereits vorliegenden Studien zeigen diese neuen Ergebnisse eindeutig, daß Ochratoxin A ein genotoxisches Potential besitzt. Dieses konnte in Zellkultursystemen gezeigt werden, die als Modelle für Zielgewebe des Mykotoxins dienen. Bei einer weiteren Bewertung von OTA sollte die Gentoxizität daher unbedingt berücksichtigt werden.

Nachweis von Ochratoxin A in Fleisch und Fleischerzeugnissen

Scheuer, R.[1], Dietrich, R.[2], Märtlbauer, E.[2] und Gareis M.[1]
[1] Bundesanstalt für Fleischforschung, Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, E.-C.-Baumann-Str. 20, 95326 Kulmbach
[2] Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstr. 13, 80539 München

Im Rahmen des Forschungsprojektes „Belastung des Verbrauchers und der Lebensmittel mit Ochratoxin A" wurden bislang ca. 100 Proben Fleisch und Fleischerzeugnisse mit einem „klassischen" Analysenverfahren (Methode I) und einer Methode mit einem Aufreinigungsschritt über Immunoaffinitätssäulen (IAS) vergleichend auf Ochratoxin A analysiert (Methode II). Aufgrund der komplex zusammengesetzten Probenmatrix bei Fleisch und Fleischerzeugnissen ist bei dem erstgenannten Verfahren eine Aufreinigung des Probenextraktes sowohl über Verteilung zwischen sauerem und basischem Milieu als auch über Sep-Pak-Kartuschen notwendig.

Während die HPLC-Chromatogramme nach Methode I zahlreiche Störpeaks enthalten, die sich in Einzelfällen auch mit dem Ochratoxin A-Peak teilweise überlagern können, sind Chromatogramme nach Aufreinigung über IAS nahezu frei von Störpeaks. Darüber hinaus zeichnet sich dieses Verfahren durch einen geringeren Zeitaufwand für die Analysen und einen geringeren Lösungsmittelverbrauch aus. Die Wiederfindungsraten beider Verfahren sind nahezu identisch und liegen in Abhängigkeit von der Art des Probenmaterials und dem Ochratoxin A-Gehalt der Proben zwischen 50 und 90 %. Die Nachweisgrenze der Methode I ist etwa um den Faktor 10 niedriger als bei Methode II. Dies beruht primär auf unterschiedlich hohen Mengen an Probenextrakten, die in die HPLC injiziert werden. Von den 105 Proben waren nach Methode I 38 Ochratoxin A-positiv mit einer durchschnittlichen Konzentration von 0,064 µg/kg (0,004 - 0,42 µg/kg). Nach Analyse mit Methode II waren von 105 Proben 23 positiv, wobei ein Mittelwert von 0,091 µg/kg ermittelt wurde (0,015 bis 0,417 µg/kg).

Die unterschiedlichen Analysenverfahren sowie die Ergebnisse zum Ochratoxin A-Vorkommen werden diskutiert.

Vorkommen von Ochratoxin A und B in Braugetreide der Ernte 1996

Carola Kuss[1], Franz Meußdoerffer [2], Herbert Graf [3] und Manfred Gareis[1]
[1]Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, BAFF, E.-C.-Baumannstr. 20, 95326 Kulmbach
[2] Meussdoerffer Malz, 95326 Kulmbach, [3]Ireks GmbH, 95326 Kulmbach

Der feuchtes und kaltes Witterungsverlauf des Getreidejahrganges 1996 verursachte in vielen Späterntegebieten Deutschlands Probleme, da das Getreide sehr spät und z.T. nur feucht eingebracht werden konnte. In einem, in Kooperation mit dem Deutschen Mälzerbund durchgeführten Forschungsvorhaben wird derzeit der Status quo dieser Getreidepartien im Hinblick auf die Belastung mit Ochratoxinen ermittelt. In die Untersuchung einbezogen sind sowohl erntefrische Getreideproben aus unterschiedlichen Anbaugebieten sowie Proben nach längerer Lagerzeit.

Zum Toxinnachweis werden jeweils 20g - Aliquote der Getreideproben gemahlen, mit 20 ml $MgCl_2$ (0,4 m) versetzt und der pH-Wert mit 2m HCl auf $\leq$ 1,6 eingestellt. Die Extraktion erfolgt mit 80 ml $CHCl_3$ im Stomacher. Nach Zentrifugation werden 25 ml der $CHCl_3$-Phase mit 25ml $NaHCO_3$ (0,13m) extrahiert und nach erneuter Zentrifugation 10 ml des Überstandes über Immunoaffinitätssäulen (RIDA Ochratoxin A, R-Biopharm) aufgereinigt. Der Nachweis der Ochratoxine erfolgt mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion unter standardisierten Bedingungen.

Dieses Verfahren ermöglicht mit einer hohen Empfindlichkeit die gleichzeitige Bestimmung von Ochratoxin A (Nachweisgrenze 0,02 - 0,05μg/kg) und Ochratoxin B (0,03 - 0,05μg/kg), wobei durchschnittliche Wiederfindungsraten von 75 - 130% ermittelt wurden.

Untersucht wurden bislang 147 Gersteproben, davon 89, die bis Ende Oktober 1996 gesammelt wurden sowie weitere 58 Proben aus dieser Ernte nach 5 monatiger Lagerung. In den erntefrischen Getreiden wurde Ochratoxin A in 9 (10,1%) und Ochratoxin B in 7 (7,8%) Proben detektiert. Zwei dieser Gersten waren mit Ochratoxin A und B kontaminiert. Die durchschnittlichen Konzentrationen betrugen 0,06 μg OTA/kg (0,02 - 0,15 μg/kg) und 0,07 μg OTB/kg (0,03 - 0,17 μg/kg). Diese vergleichsweise geringe Belastung der erntefrischen Braugersteproben läßt sich offensichtlich auf eine Produktion der Toxine noch auf dem Felde zurückführen. In den gelagerten Proben (n=47) wurde mit 7 positiven (14,9%) nicht nur ein erhöhtes Vorkommen von OTA sondern mit einer durchschnittlichen Konzentration von 0,18 μg/kg (0,02 - 0,87 μg/kg) auch geringfügig höhere Werte als in den erntefrischen Getreiden ermittelt. OTB wurde in 2 (4,2%) der OTA-positiven Proben nachgewiesen, wobei ebenfalls vergleichsweise höhere Konzentrationen (0,17 und 0,64 μg/kg) als im erntefrischen Material gefunden wurden.

Die bislang erhaltenen Daten zeigen, daß das Braugetreide aus dem Jahr 1996 trotz ungünstiger Erntebedingungen eine sehr geringe Belastung mit Ochratoxin A und B aufweist. Die gefundenen Werte liegen hierbei etwa um den Faktor 25 - 50 niedriger als der diskutierte Grenzwert von 3 - 4 μg OTA/kg.

Bioverfügbarkeit von Ochratoxin A aus nicht-extrahierbaren Rückständen

Bioavailability of ochratoxin A from non extractable residues

Goll, M., M. Bokern, E. Timm, C. Böhme und H. Harms

Durch frühere Untersuchungen konnten wir nachweisen, daß die Zugabe von OTA zu Gerstenzellkulturen zur Bildung nicht-extrahierbarer OTA-Rückstände führt. Aus vorausgegangenen Versuchen war bekannt, daß der überwiegende Anteil des bioverfügbaren OTA´s aus der Stärke- oder Proteinfraktion des nicht extrahierbaren Rückstands stammt. Durch den hier dargestellten Versuchsansatz sollte die „Quelle" des bioverfügbaren OTA´s eindeutig identifiziert werden.
Nach dem bereits früher dargestellten Verfahren wurden nicht-extrahierbare OTA-Rückstände mittels Gerstenzellkulturen hergestellt und diese einem Standardfuttermittel (Altromin 1324) zugemischt (Anteil in der Ration 1%) und über 10 Tage an Ratten verfüttert.

Es wurden 5 verschiedene Gruppen gebildet:

Gruppe 1 (n = 4): erhielt nicht-extrahierbare Rückstände ohne OTA-Applikation (Negativkontrolle)

Gruppe 2 (n = 6): erhielt nicht-extrahierbare Rückstände nach OTA-Applikation, die mit Amylase, Pronase und Pektinase behandelt wurden (⇨ dadurch wird die Stärke-, Protein- und Pektinfraktion aus dem nicht-extrahierbaren Rückstand entfernt, es wird also die Lignin-, Hemizellulose- und Zellulosefraktion verfüttert)

Gruppe 3 (n = 6): erhielt nicht-extrahierbare Rückstände nach OTA-Applikation, die mit Amylase und Pronase behandelt wurden (⇨ dadurch wird die Stärke- und Proteinfraktion aus dem nicht-extrahierbaren Rückstand entfernt, es wird also die Pektin-, Lignin-, Hemizellulose- und Zellulosefraktion verfüttert)

Gruppe 4 (n = 6): erhielt nicht-extrahierbare Rückstände nach OTA-Applikation, die mit Amylase behandelt wurden (⇨ dadurch wird die Stärkefraktion aus dem nicht-extrahierbaren Rückstand entfernt, es wird also die Protein-, Pektin-, Lignin-, Hemizellulose- und Zellulosefraktion verfüttert)

Gruppe 5 (n = 6): erhielt nicht-extrahierbare Rückstände nach OTA-Applikation ohne weitere Behandlung (⇨ dadurch wird der gesamte nicht-extrahierbare Rückstand verfüttert = Positivkontrolle; OTA-Blutplasmagehalte entsprechen 100 % Bioverfügbarkeit)

Die OTA-Gehalte im Blutplasma lagen in Gruppe 1 bei 0,7, in Gruppe 2 bei 4,2, in Gruppe 3 bei 6,4, in Gruppe 4 bei 15,2 und in Gruppe 5 bei 18,4 ng/ml. Der Blutplasmagehalt von 18,4 ng/ml entspricht einer Bioverfügbarkeit der nicht-extrahierbaren OTA-Rückstände von 100 %. Etwa 48 % des bioverfügbaren OTA´s stammen aus der Protein-, ca. 17 % aus der Stärke- und ca. 12 % aus der Pektinfraktion. Die verbleibenden 23 % sind der Lignin-, Hemizellulose- und Zellulosefraktion des nicht-extrahierbaren Rückstands zuzuschreiben.

Behandlung von Ochratoxin A-haltiger Futtergerste mit Konservierungsstoffen

W. Richter[1], M. Schuster[1], W. Scholz[1], M. Gareis[2]
[1]Bayerische Landesanstalt für Tierzucht, Grub, Postfach 1180, 85580 Poing
[2] Institut für Mikrobiologie und Toxikologie der Bundesanstalt für Fleischforschung, E.-C.-Baumann-Str. 20, 95326 Kulmbach

Durch Konservierungsstoffe kann der Ochratoxin A-Gehalt in behandeltem Getreideschrot gesenkt werden (RICHTER und WOLFF 1994). In den nun durchgeführten Untersuchungen mit Körnern sollten zusätzlich noch unterschiedliche Dosierungen geprüft und im MTT-Zellkulturtest abgesichert werden. Alle eingesetzten Konservierungsstoffe reduzieren die Ochratoxin A-Gehalte in Futtergerste, wobei die Dosierung noch weiter optimiert werden muß.

Konservierungs-stoffe/Variable	Dosierungstufe I	II	III
Propionsäure (%)	0,25	0,5	1,0
Reduzierung (%)	23	16	65
Verdünnungsstufe	1	2	1
Harnstoff (%)	1,75	2,25	2,75
Reduzierung (%)	60	71	40
Verdünnungsstufe	1	1	1
Natriumdisulfit (%)	0,5	1,0	1,5
Reduzierung (%)	56	57	7
Verdünnungsstufe	1	2	2
Natronlauge (%)	1,5	2,5	3,5
Reduzierung (%)	82	74	100
Verdünnungsstufe	2	4	4

Bei der Natronlauge mit der höchsten Dosierung wurde eine vollständige Reduktion von OTA erreicht, die einer geringeren Bioverfügbarkeit gleichzusetzen ist (RICHTER et al. 1997). Im MTT-Zellkulturtest wurden die Rohextrakte der *Gerstevarianten* im Hinblick auf ihre zytotoxischen Eigenschaften untersucht. Dieser biologische Screening-Test ermöglicht, da Rohextrakte überprüft werden, eine Auskunft über die Summe aller potentiell zytotoxischen Rückstände in den betreffenden Proben. Die Behandlung der Gerste mit Natronlauge führt, zu einer generell erhöhten zytotoxischen Aktivität der Rohextrakte, die offensichtlich auf Matrixeffekte durch den NaOH-Aufschluß zurückgeführt werden kann und deshalb die Interpretation der Ergebnisse erschwert.

Kombinierte Verabreichung von Ochratoxin A, Deoxynivalenol und Zearalenon an Schweine - Einfluß auf Leistung, Tiergesundheit und Rückstandsverhalten

K. Lusky, Roswitha Göbel, Doris Tesch, K.-D. Doberschütz, A. Lippert und Gunda Tenner
Institut für Veterinär-Pharmakologie und Toxikologie GmbH,
Weißenseer Str. 36, 16321 Bernau

In einem 90-Tage-Test an Schweinen sollte geprüft werden, welche Auswirkungen ein kombiniertes Vorkommen der Mykotoxine Ochratoxin A (OTA), Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA) im Futter von Schweinen auf die Tiergesundheit hat und welches Rückstandsverhalten diese Mykotoxine in Kombination im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zeigen (Gr. I: OTA [0,1 ppm] + DON [1,0 ppm] + ZEA [0,25 ppm]; Gr. II: Kontrolle).

Ergebnisse

Eine Kombination der Mykotoxine OTA, DON und ZEA in praxisrelevanten Dosierungen hat keinen nachweisbaren Einfluß auf die Tiergesundheit. Anhand der Lebendmasse, Hämatologie und Klinischen Chemie lassen sich Auswirkungen einer kombinierten Mykotoxinfütterung von OTA, DON und ZEA nicht nachweisen. Eine Beeinflussung der Antikörperbildung nach AK-Vaccinierung konnte nicht beobachtet werden. Im Blutserum und in den Organen sind DON und ZEA bzw. α-ZEA nicht nachweisbar. Im Serum deutet sich bei kombinierter Verfütterung von OTA, DON und ZEA an, daß sich der "steady state" im Gegensatz zu früheren Untersuchungen (Gabe von OTA + DON bzw. OTA + ZEA) bereits um den 6. VT mit ca. 41 µg OTA/kg einstellt. In den Organen und Geweben sind die höchsten OTA-Gehalte in der Niere und in der Leber bestimmbar.

Weitere Ergebnisse werden dargelegt und diskutiert.

PCR-Nachweis des *Tri5*-Gens als gruppenspezifischer Marker Trichothecen-bildender *Fusarium*-Arten

Ludwig Niessen und Rudi F. Vogel
Technische Universität München, Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie,
85350 Freising-Weihenstephan

KURZFASSUNG

Die Biosynthese der Trichothecen-Mykotoxine wird bei Fusarien durch eine Vielzahl von Genen gesteuert und katalysiert. Die Nukleotid-Sequenzen einiger dieser Gene wurden in jüngerer Zeit aufgeklärt und die Produkte in Bakterien zur Expression gebracht. Insbesondere für *F. sporotrichioides* als wichtigem Produzenten von T-2 Toxin wurden Arbeiten in dieser Richtung durchgeführt.

Das Gen *Tri5* codiert für das Enzym Trichodien Cyclase. Dieses Enzym katalysiert die Auffaltung von Farnesylpyrophosphat zum Trichodien, dem ersten spezifischen Produkt der Trichothecen Biosynthese. Den vorgestellten Arbeiten liegt die Überlegung zugrunde, dass Trichodien die Ausgangsverbindung ist, aus der im Verlaufe der Biosynthese alle weiteren bekannten Trichothecene synthetisiert werden. Entsprechend sollte das *Tri5* Gen in allen Arten vorhanden sein, die potentiell in der Lage sind, ein Derivat dieser Stoffklasse zu produzieren. Deshalb sollte sich dieses Gen als Gruppen-spezifischer Marker für die betreffenden Arten verwenden lassen.

Aus konservativen Regionen des *Tri5*-Genes von Fusarien wurde ein Primerpaar (Tox5-1 und Tox5-2) abgeleitet, und ein PCR-Verfahren entwickelt. Dieses Verfahren wurde auf maximale Sensibilität und Selektivität hin optimiert. Mit der so entwickelten PCR wurde gereinigte DNA aus Reinkulturen von 64 verschiedenen Arten und Varietäten der Gattung *Fusarium* auf ihre Reaktion mit den Tox5-Primern getestet. Im Testfeld waren alle Sektionen der Gattung, einschließlich der neuen Sektion *Dlaminia,* vertreten.

Insgesamt zeigten 22 der getesteten Arten und Varietäten ein PCR Produkt der richtigen Größe. Von den positiven Arten gehörte die überwiegende Mehrzahl der Sektion *Discolor* an. Hier waren neben weniger bedeutsamen Pilzen bekannte Trichothecen-Bildner wie *F. graminearum, F. culmorum, F. cerealis, F. sambucinum* oder auch *F. sulphureum* vertreten. In der Sektion *Sporotrichiella,* in der besonders potente A-Trichothecen Produzenten auftreten, zeigten mit Ausnahme von *F. chlamydosporum* und *F. tricinctum* alle Arten ein positives Signal. In der Sektion *Arthrosporiella* war *F. camptoceras* positiv. Auch in der Sektion *Liseola* trat mit *F. fujikuroi* nur eine Art auf, die ein PCR Signal ergab. In der Sektion *Gibbosum* konnte für *F. equiseti* und für *F. scirpi* ein passendes Fragment amplifiziert werden. Mit DNA, die aus verschiedenen anderen Schimmelpilz-Arten, Hefen, Bakterien und Pflanzen isoliert wurde, konnte kein PCR-Amplifikat erhalten werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß mit dem entwickelten gruppenspezifischen PCR-Verfahren die Amplifikation eines Fragmentes ausschließlich mit DNA solcher *Fusarium*-Arten stattfindet, die in der Literatur als Bildner von Trichothecenen beschrieben wurden. Abweichungen von bisherigen Beobachtungen ergaben sich nur bei *F. fujicuroi* und *F. camptoceras,* bei denen bisher *in vitro* keine Trichothecen Produktion beobachtet wurde. Bei verschiedenen Stämmen von *F. graminearum* und auch *F. culmorum* war das Auftreten einer Tox5-Bande konkret mit der *in vitro* Bildung von Trichothecenen verbunden.

Mäusemodell in der Mykotoxinforschung

J. Böhm[1], G. Dürl[1], F. Schilcher[2], U.N. Devkota[3] u. S. Larsson[1]
[1] Institut für Ernährung, [2] Institut für Pathologie, Veterinärmedizinische Universität Wien, Josef Baumann-Gasse 1, 1210 Wien, [3] M.I.T., Katmandu, Nepal

Weil schlecht getrocknetes und gelagertes Getreide oft verschimmelt und mit Mykotoxinen verseucht ist, wurde schon 1965 (Munck) das Mäusemodell als billiges und gutes Testinstrument vorgeschlagen. Systematisch wird es erst seit 1992 (Rotter et. al.) durch eine kanadische Gruppe angewendet. Es soll nicht unerwähnt bleiben, daß solche Mäusemodelle bei Studien über die "Ulcus" Bakterien Helicobacter spp. interessante Ergebnisse erbracht haben. Zur Zeit wird das "Mäusemodell" am Institut eingesetzt, um mykotoxinkontaminiertes Schweine- und Hühnerfutter sowie frische Nahrungsproben von selbstversorgenden nepalesischen Bauern zu testen. Zusätzlich werden auch deren Blutserumproben untersucht. In diesen Versuchen wurde nicht nur eine Gewichtskontrolle durchgeführt, sondern auch Proben von ganzen Verdauungstrakt, Leber, Niere, Milz und Gonaden histologisch untersucht. Dazu wurden verschiedene Altersgruppen eingeteilt.

So kann jetzt schon festgestellt werden, daß sowohl das absolute wie auch das relative Gewicht der Nieren von Mäusen, die mit natürlich kontaminiertem Hafer (NIV und DON) gefüttert wurden, viel höher ist als das der Nieren der Kontrollgruppe. Ferner muß darauf hingewiesen werden, daß bei verschimmelten Getreide, egal ob Mykotoxine vorhanden sind oder nicht, in den meisten Fällen durch die Maillardreaktion die biologische Wertigkeit des Proteines gesenkt wird. Als Nebenbefund wurde festgestellt, daß im distalen Teil des Ösaphagus, im Magen und Duodenum von Mäusen, die mit kommerziel erhältlichen Referenzfutter gefüttert wurden, eine hohe Anzahl von Bakterien nachwiesen wurden. Im Gegensatz dazu wurden in Magenproben von Mäusen, die mit verschiedenen Proben aus Nepal gefüttert wurden, keine Bakterien gefunden. Die histologische Untersuchung ist zur Zeit nicht abgeschlossen; jedoch wurde in einigen schon untersuchten Proben herausgefunden, daß schon relativ kleine Mengen von Aflatoxinen, gefüttert über einen Zeitraum von 10 Tagen, die Anzahl der Becherzellen verminderten und eine sogenannte "flache Mucosa" tendenziell sichtbar wurde. Überdies ist bekannt, daß Mäuse mit Vitamin A-Mangel eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Aflatoxinen aufweisen, verursacht durch die geminderte Widerstandskraft des Darmes.

So ist es augenscheinlich, daß das Mäusemodell im Vergleich zu Schweine- oder Hühnermodellen wesentlich wirtschaftlicher ist und diese Art von Fütterungsversuch auch schneller Ergebnisse bringt.

Endophyte toxin research at the Ruakura Agricultural Research Centre

Neale R Towers
Toxinology and Food Safety Research Group, AgResearch, Ruakura Agricultural Research Centre, Private Bag 3123, Hamilton, NEW ZEALAND

A number animal disease problems (fescue toxicosis, ryegrass staggers [RGS], sleepy horse syndrome) are associated with the presence of toxin-producing endophytic fungi (*Neotyphodium* spp.) within several grass species, some of agronomic importance. These fungi (formerly classified as *Acremonium* spp.) live in symptomless mutualistic associations within the grass plant where they produce a range of toxins which confer environmental advantages on the host (increased resistance to water stress, deterrence of insect and nematode feeding) but which may also cause toxicoses in grazing livestock. Our research has focussed on the chemistry, biochemistry and mode of action of the neurotoxins (lolitrems) responsible for RGS, in developing immunoassays for the toxins produced by the *Neotyphodium*, and in developing farm management strategies for avoiding the disease.

The obvious solution to the endophyte toxin problems, growing grass species or cultivars which are not infected with the endophytic fungus, is not a viable option in many regions as the grasses are then susceptible to insect attack or environmental stress and rapidly disappear from the grass sward. An alternative to this strategy is to select endophytes which are incapable of synthesising toxins causing animal disease but which can still produce toxins deterring insect and nematode attack. For success in this approach an understanding of toxin biosynthesis is required as it is not sufficient to select an endophyte incapable of lolitrem B (the toxin primarily responsible for RGS) synthesis since modification to the late stages of the biosynthetic pathway could lead to accumulation of other tremorgenic lolitrems. Lolitrem B was first isolated and its structure determined 15 years ago, but we have since isolated and determined the structure of 15 further lolitrem analogues, and several other indole-diterpenoids, from infected ryegrass seed and from this deduced the likely biosynthetic pathway. This has identified paspaline as the crucial intermediate. Endophytes unable to elaborate paspaline should be incapable of synthesing any of the tremorgenic indole-diterpenoid neurotoxins.

Neotyphodium spp. produce a range of toxins in addition to the indole-diterpenoids, including members of the ergot alkaloid family. An important part of our research has been the development of immunoassays for endophyte toxins (paxilline, lolitrems, ergot alkaloids containing the lysergol group, peramine) and for the endophyte itself. Using these ELISAs, and HPLC, we have shown that many grasses associated with animal diseases contain endophytic fungi and toxins with similar structures.

We have shown that resistance to RGS is a heritable trait in sheep but the development of a performance test for identifying resistant sires for use in breeding programmes has been hindered by the great difficulty of isolating sufficient lolitrem B. We have therefore investigated the use of the more readily available indole-diterpenoid tremorgens as alternatives. The tremorgenicity of newly isolated compounds have been compared with those of paxilline, lolitrem B, and penitrems to provide information on the structural features essential for tremorgenicity and to help determine whether this family of neurotoxins have a common mode of action. The onset of tremors following I.V. injection of paxilline and penitrem is much quicker than for lolitrem B, but the duration of the tremors is much reduced (1-5 h versus 72 h). The relative ranking for potency, speed of onset and duration of tremors for the three tremorgens is the same in sheep as in a mouse bioassay, indicating the mouse bioassay is a valid method for determining structure:activity relationships of newly isolated lolitrem analogues. A study of the tremorgenicity of lolitrem B, lolilline, paxilline and terpendole C, which all share common structural elements, suggest that more than one receptor may be involved, presumably in the central nervous system, with paxilline binding to one receptor and lolitrem B to a second.

Einfluß von endophytinfiziertem und alkaloidhaltigem Deutschen Weidelgras auf die Gewichtsentwicklung und Gesundheit von Schafen

Elisabeth Oldenburg*, Friedrich Weißbach*, Hana Valenta**, Martin Höltershinken*** und Dorle Rattay**

* Institut für Grünland- und Futterpflanzenforschung der FAL, ** Institut für Tierernährung der FAL, Bundesallee 50, 38116 Braunschweig

*** Klinik für Rinderkrankheiten, Tierärztliche Hochschule Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover

Lolitrem B ist ein tremorgenes Indolalkaloid und wird in Deutschem Weidelgras (*Lolium perenne*) gebildet, das mit dem endophytischen Pilz *Acremonium lolii* infiziert ist. Durch die Aufnahme von Lolitrem B können bei Weidetieren (Schafe, Rinder, Pferde) klinische Symptome des „Ryegrass staggers" ausgelöst werden, die sich in leichter Form als Muskelzittern an Nacken, Schulter und Flanken und in schweren Fällen als starker Tremor der gesamten Muskulatur bishin zu längerfristiger Bewegungsunfähigkeit äußern.

Im Rahmen eines Weideversuches mit Mastlämmern wurde untersucht, ob unter den bei uns auftretenden Alkaloidkonzentrationen in Deutschem Weidelgras die Gewichtsentwicklung sowie der Gesundheitsstatus der Lämmer beeinträchtigt werden und ob ein carry over von Lolitrem B ins Blut der Tiere erfolgt.

Dazu wurde eine Umtriebsweide mit einer Sorte von *Lolium perenne*, jedoch geteilt in die Varianten endophytfrei (Lolitrem B negativ) und endophytinfiziert (Lolitrem B positiv) angelegt und mit jeweils 10 männlichen Mastlämmern pro Variante bestückt.

Im Verlauf der Weideperiode von Mitte Juni bis Ende Oktober 1996 erfolgten regelmäßig Gewichtsermittlungen, Blutentnahmen und Kontrollen des Gesundheitsstatus der Lämmer.

In den Blutproben wurden zusätzlich zu den Lolitrem B-Analysen Enzymaktivitäten bestimmt, die Aufschluß über den Zustand der Leber zulassen sowie Mineralstoffe analysiert, die Einfluß auf Nervenfunktionen haben können.

Am Ende der Beweidung wurden von insgesamt 8 Tieren (4 von der endophytfreien und 4 von der endophytinfizierten Variante) nach der Tötung pathologisch-anatomische Untersuchungen an verschiedenen Organen durchgeführt sowie Gewebeproben für histologische Untersuchungen entnommen.

Über die Ergebnisse des Weideversuches und der Laboruntersuchungen wird berichtet.

Zur Toxizität von Roquefortin beim Schaf

Johann Bauer[1], Georg Tüller[1], Sibylle Wiedenmann[1], Gerd Armbruster[1], Karin Seidel[1], Dieter Schams[2] und Tilo Hänichen[3]

1 Lehrstuhl für Tierhygiene, TUM, Hohenbachernstraße 15, 85354 Freising
2 Lehrstuhl für Physiologie, TUM, 80350 Freising-Weihenstephan
3 Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie, LMU, Veterinärstr. 13, 80539 München

Roquefortin, ein Indolalkaloid vom 2,5-Diketopiperazin-Typ, kommt in Silagen häufig vor. Bei Untersuchungen mit HPLC-UV-Diodenarray und ^{1}H-NMR waren 24 von 111 Proben mit dieser Verbindung kontaminiert; die Roquefortin-Konzentrationen variierten zwischen 0,048 und 28,150 mg/kg. Da die toxikologischen Daten bezüglich der Wirkung von Roquefortin äußerst widersprüchlich sind, wurde ein 20tägiger Fütterungsversuch mit weiblichen Schafen (n=18) durchgeführt. Die verabreichten Roquefortin-Mengen entsprachen 0, 5 und 25 mg/kg Silage, wobei täglich 2 kg Silage verfüttert wurden. In regelmäßigen Abständen wurde das Allgemeinbefinden der Tiere protokolliert und klinisch-chemische (ALT, AST, Bilirubin, GLDH, Blutzucker) sowie hämatologische Parameter (Anzahl von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten, Hämoglobingehalt, Hämatokrit) bestimmt. Da in In-vitro-Versuchen mit Lutealzellen eine dosisabhängige Hemmung der Progesteronsekretion durch Roquefortin festgestellt werden konnte, wurden die Progesteron-, LH- und FSH-Profile über eine volle Zykluslänge aufgezeichnet. Die Ausscheidung von Roquefortin wurde anhand von Kot- und Harnanalysen studiert. Am Versuchsende wurden die Tiere euthanasiert und einer pathologisch-anatomischen und histologischen Untersuchung zugeführt. Darüber hinaus wurden ausgewählte Gewebeproben, Pansensaft und Blutserum auf Roquefortin-Rückstände untersucht.

Während der gesamten Versuchsperiode zeigte keines der Schafe klinische Anzeichen einer akuten Intoxikation. Weder die Werte der klinisch-chemischen noch die der hämatologischen Parameter wurden durch die Verabreichung von Roquefortin wesentlich verändert. Ebenso war kein Einfluß auf die Hormonprofile feststellbar; allein der pH-Wert des Pansensaftes war durch die Roquefortingaben geringgradig, aber signifikant erniedrigt. Die pathologisch-anatomischen und histologischen Untersuchungen ergaben keine Hinweise auf Veränderungen, die durch Roquefortin hervorgerufen worden sind. Die höchsten Roquefortinkonzentrationen wurden im Pansensaft und in Faeces gefunden. Darüber hinaus wurde ein "Carry over" in Leber, Galle, Nieren, Lunge und Herz nachgewiesen. Obwohl Roquefortin eine antibiotische Aktivität besitzt, wurden alle Nieren- und Muskelproben im Hemmstofftest als "negativ" beurteilt. Aufgrund dieser Untersuchungen und dem Sachverhalt, daß im Mikronucleus-Test und im HGPRT-Test mit V79-Zellen kein genotoxisches Potential nachgewiesen werden konnte, wird die Toxizität von Roquefortin als äußerst gering eingestuft.

Siliertechnische Einflüsse auf den Pilzbesatz in Grassilagen und Untersuchungen zum Vorkommen von Roquefortin C

Klaus-Josef Schmerbauch[1,2], Ehrengard Kaiser[1], Christine Idler[2] und Manfred Schuster[3]

In extensiv ausgerichteter Landwirtschaft und Landschaftspflege fallen große Mengen rohfaserreichen Grünfutters an. Ausreichende Winterfutterkonservierung erfordert, dieses Material neben der Heubereitung auch durch Silierung nutzen zu können. Zuverlässig anaerobe Silagelagerung stellt an die landwirtschaftliche Verfahrenstechnik hohe Anforderungen hinsichtlich Lagerungsdichte und Luftabschlußgüte. Mängel im Luftabschluß führen vor allem in Silorandschichten häufig zu einer starken Schimmelbildung während der Lagerung. In der Literatur wird in diesem Zusammenhang insbesondere auf *Penicillium roqueforti* als die in Silagen dominierende Pilzspezies und deren Fähigkeit zur Roquefortin C -Bildung hingewiesen.

Ziel der Untersuchungen ist die Ermittlung der notwendigen verfahrenstechnischen Parameter zur Reduzierung der Pilzbelastung in Grassilagen. Schwerpunkt sind Welksilagen aus extensiv erzeugtem Grünfutter, die infolge relativ hoher Rohfasergehalte besonders schwer verdichtbar sind. Hierbei wird das Vorkommen von *P. roqueforti* und Roquefortin C genauer untersucht.

Die Ergebnisse von 1995 und 1996 durchgeführten Praxisversuchen zeigen, daß die Erhöhung der Lagerungsdichte eine gute Grundlage für die Reduzierung der Pilzbelastung schafft. Höhere Dichten sind durch Verbesserung bekannter sowie Anwendung neuer Verfahren möglich.

Aus 43 Silageproben konnte *P. roqueforti* isoliert werden. Die Isolate wurden unter definierten Bedingungen (14 Tage bei 25°C) auf ihr Roquefortin C -Bildungsvermögen hin untersucht. Als Medium wurde jeweils 100g autoklavierte Grassilage mit einer Sporensuspension beimpft. Bis auf drei bildeten alle anderen Isolate Roquefortin C im Bereich von 2,5 - 89,9 mg/kg TS. Bei den gegenwärtig durchgeführten Analysen der Grassilagen auf Roquefortin C wurden bisher in 16 % der Proben Gehalte im Bereich von 0,06-0,64 (im Mittel 0,17) mg/kg TS detektiert.

Gefördert durch die „Deutsche Bundesstiftung Umwelt".

[1] Fachgebiet Futtermittelkunde, Humboldt-Universität zu Berlin, Invalidenstr. 42, 10115 Berlin
[2] Institut für Agrartechnik Bornim e.V. (ATB), Max-Eyth-Allee 100, 14469 Potsdam-Bornim
[3] Bayerische Landesanstalt für Tierzucht Grub, Prof. Dürrwaechter Platz 1, 85586 Poing

ANBAU, ERNTE UND WEITERVERARBEITUNG VON PISTAZIEN IM IRAN

Paul Majerus

Chemisches Untersuchungsamt Trier
Maximineracht 11a, 54295 Trier

Pistazien zählen zur Zeit zu den Lebensmitteln mit der höchsten Kontaminationsrate an Aflatoxinen. Aufgrund der nach § 48 LMBG durch die Bundesrepublik verhängten Vorführpflicht für Pistazienimporte aus dem Iran besuchte auf Einladung der islamischen Republik eine fünfköpfige deutsche Expertendelegation, bestehend aus Vertretern des Bundes, der Länder und des Handels, Ende September 1996 3 Tage den Iran. Die Gastgeber demonstrierten Praxis und Forschung von Anbau, Ernte und Weiterverarbeitung in einer Reihe von Groß- und Kleinbetrieben mit offensichtlichem Vorzeigecharakter. Die zunehmende Mechanisierung ermöglicht die kritischen Prozeßschritte - zügige Verarbeitung nach der Ernte, schnelle Trocknung nach dem Naßschälvorgang und Abtrennung geschädigter Früchte - zu optimieren. Anhand von Dias wurden die verschiedenen Vorgänge bildlich dargestellt und erläutert. Als Schwachpunkt der Pistazienproduktion, die immerhin 120.000 t im Jahr beträgt, erwies sich erwartungsgemäß die repräsentative Probenahme für Produkt- bzw. Exportkontrolle auf Aflatoxine.

Zum Arbeitsschutz im Mykotoxinlabor

Rolf A. Meyer
Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen, Standort Dresden
Reichenbachstraße 71-73, D-01217 Dresden

Die wachsenden Anforderungen an die Mykotoxinanalytik und der Zwang zur Rationalisierung verlangen die Schaffung größerer leistungsfähiger Mykotoxinlaboratorien. Die Ausstattung solcher Laboratorien wird wesentlich von den Forderungen des Arbeitsschutzes mitbestimmt. Verbindliche Aussagen zu dieser Problematik wären daher eine wichtige Hilfe bei der Laborplanung.

Nach einer kritischen Sichtung der Hinweise zum Arbeitsschutz im Mykotoxinlabor wird die Arbeitsschutzrichtlinie für das chemisch-analytische Arbeiten mit Mykotoxinen vom 02.01.87 (Rundschreiben 1/87 der Hauptabteilung Hygiene und Staatliche Hygieneinspektion beim Ministerium für Gesundheitswesen der DDR) vorgestellt und im Hinblick auf die verbesserten derzeitigen Möglichkeiten diskutiert.

Für das ordnungsgemäße Arbeiten erscheinen neben dem eigentlichen Mykotoxinlabor mit ausreichender Abzugskapazität ein separater Entgiftungsraum mit korrosionsfestem Abzug sowie ein Bereich für Dünnschichtchromatographie mit Abzügen und ein Bereich für Hochdruck-Flüssigchromatographie erforderlich.

Es wird vorgeschlagen, die vom Arbeitsschutz her notwendigen Forderungen an ein leistungsfähiges Mykotoxinlabor in einem Gremium zu diskutieren und die Expertenmeinung möglichst verbindlich zu fixieren.

Mykotoxine und das HACCP-Konzept

H. Taschan und B. Rother

Staatl. Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Mittelhessen
Marburger Str. 54; 35396 Gießen

Zielsetzung der EU-Richtlinien innerhalb der Gemeinschaft ist die Harmonisierung einzelstaatlicher Regelungen, die Transparenz von Vorgängen und Abläufen, die Vermeidung möglicher Handelsschranken und ein präventiver Verbraucherschutz. In diesem Sinne wurde die Richtlinie des Rates über die Hygiene von Lebensmitteln (93/43/EWG) erlassen. Die Umsetzung dieser Richtlinie erfolgte in vielen Mitgliedsstaaten der EU. In der BRD wird sie erst in Kürze in nationales Recht umgesetzt.
Nach dem letzten Entwurf vom 24.3.97 findet die neue Verordnung, mit Ausnahme der Urproduktion, auf alle Lebensmittel und Betriebsformen Anwendung.
Die wichtigsten und neusten Regelungsinhalte sind u.a. die betriebseigene Maßnahmen und Kontrollen (HACCP-Konzept). Nach der neuen Regelung erfolgten die betrieblichen Eigenkontrollen durch vorgegebene Grundsätze des international anerkannten HACCP- Systems. Dieses Konzept setzt die Einhaltung der allgemeinen Hygieneanforderungen voraus und beschränkt sich nur auf gesundheitsrelevante Risiken, die in mikrobiologische, physikalische und chemische Risiken eingeteilt werden.
In Anbetracht der Tatsache, daß über die chemischen Risiken keine einheitliche Meinung herrscht, ist es notwendig über folgende Fragen zu diskutieren.

1. Stellen Mykotoxine bei der Herstellung von bestimmten Lebensmitteln im Sinne des HACCP-Konzeptes ein Risiko dar?
Werden Mykotoxine im Bereich der Lebensmittelproduktion als kritische Kontrollpunkte (CCP`s) eingestuft, so sind nach der neuen Hygieneverordnung angemessene Sicherheitsmaßnahmen festzulegen, durchzuführen und zu überprüfen.
2. Welche Prüf- und Überwachungsmaßnahmen kommen hier in Frage?
3. In welchen Abständen sollen Prüf- und Überwachungsmaßnahmen erfolgen?

Im Rahmen dieses Beitrages wird die Problematik aufgrund der Aktualität erörtert und es werden Lösungsvorschläge zur Diskussion gestellt.

Poster

Untersuchungen zum Vorkommen von Ochratoxin A in Buchweizen, zur Toxinbildung während der Lagerung sowie zur Veränderung des Toxingehaltes bei der müllereitechnischen Aufbereitung

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

Ochratoxin A ist ein Stoffwechselprodukt von speziellen Penicillien oder Aspergillen und wirkt stark nephrotoxisch, genotoxisch, teratogen, immunsuppressiv sowie primär karzinogen. Daher ist in der nächsten Zeit mit der Festlegung eines Grenzwertes von wenigen µg/kg in der EU und damit auch in der BRD zu rechnen.

Vorangegangene Untersuchungen zeigten, daß bei Buchweizen teilweise hohe, weit über dem vorgesehenen Grenzwert liegende Ochratoxin A-Gehalte auftreten können.

Um die Güte der landwirtschaftlichen Rohstoffe nach der Ernte zu erhalten und eine Kontamination der Mahl- und Verarbeitungsprodukte mit Ochratoxin A zu vermeiden, sollte in dem Forschungsprojekt untersucht werden, in welchem Umfang beim Lagerprozeß auf erntefrischem Schälgetreide Ochratoxin A gebildet wird, wie sich der Toxingehalt in der nachfolgenden müllereitechnischen Aufarbeitung verändert bzw. beeinflussen läßt und mit welchem Infektionsrisiko die verschiedenen Schälverfahren behaftet sind.

Für die Untersuchungen wurde Buchweizen der Ernten 1994 und 1995 aus dem Land Brandenburg eingesetzt. Die Untersuchung des Ochratoxin A-Gehaltes erfolgte nach Methode 15.00-1 der amtlichen Sammlung nach § 35 LMBG.

Die Schälung wurde im Labormaßstab mittels Unterläuferschälgang sowie mittels Prallschälung in Anlehnung an das Fliehkraftschälverfahren durchgeführt. Die Lagerung der Proben erfolgte in einem Klimaschrank mit Temperatur- und Luftfeuchte-Regelung.

Die untersuchten Buchweizenproben der Ernten 1994 und 1995 waren weitgehend ochratoxinfrei; lediglich in 8 bzw. 6% der Proben konnte Ochratoxin A in Höhe von 1...166 µg/kg nachgewiesen werden. Die hoch kontaminierten Proben zeigten hohe Kornfeuchten von ca. 20%. Neben Ochratoxin A waren in einer dieser Proben auch Aflatoxine enthalten.

In Lagerversuchen mit ochratoxinfreien Proben bei 25, 30 und 40°C über mehrere Wochen ergab sich keine Ochratoxinbildung, wenn der Buchweizen mit Feuchten zwischen 11 und 15% gelagert wurde. In auf ca. 20...25% wiederbefeuchtetem Buchweizen, der bei 25°C gelagert wurde, zeigte sich mehr oder weniger starker Schimmelbefall. Bei einzelnen Proben kam es auch zur Ochratoxin A-Bildung.

Schälversuche mit kontaminiertem Buchweizen zeigten, daß der größte Teil des Toxins mit der Schale entfernt wird. In Kernen, Grütze und Mehl wurden nur geringe Ochratoxingehalte festgestellt. Die aus feinen Schalen- und Mehlanteilen bestehende Mischfraktion ist dagegen deutlich höher belastet und sollte in der Praxis einwandfreiem Buchweizenmehl nicht zugesetzt werden.

Eine Toxinverschleppung bei der Unterläuferschälung infolge der Porosität des Läufersteines konnte nicht beobachtet werden; es konnte auch kein erhöhtes Infektionsrisiko für dieses Schälverfahren bei Lagerversuchen unter erhöhter Temperatur und Luftfeuchte festgestellt werden.

Einfluß von Milchsäure auf die Qualität von konserviertem Buchweizen

Christine Idler [1], Ute Meister [2], Rosemarie Schneeweiß [2],
[1] Institut für Agrartechnik Bornim e.V., Max-Eyth-Allee 100, 14469 Potsdam
[2] IGV Institut für Getreideverarbeitung GmbH, Arthur Scheunert- Allee 40-41, 14558 Rehbrücke

Buchweizen (*Fagopyrum esculentum L.*) verfügt im Land Brandenburg über eine lange Anbautradition. Er ist eine Pflanze mit potentieller Anbaueignung für sorptionsschwache Böden und besitzt gute ökologische Eigenschaften und eine vielseitige Verwendung. Im Erntezeitraum von August bis Oktober sind die Pflanzen sehr ungleichmäßig ausgereift und weisen Feuchtegehalte zwischen 15% und 22% auf. Somit ist das Gut nicht ohne konservierende Maßnahmen lagerfähig. Konservierungsverfahren, wie sie zur Getreidelagerung angewandt werden, sind entweder zu teuer (z.B. Trocknen) oder entsprechen nicht den Lebensmittelvorschriften (z.B. Konservierung mit Propionsäure).

In Modellversuchen wurde geprüft, inwieweit wiederbefeuchteter Buchweizen mittels Milchsäure lagerfähig gemacht werden kann. Der Konservierungserfolg wurde anhand der Keimzahlen an Hefen und Schimmelpilzen und am Gehalt an Ochratoxin A eingeschätzt. Außerdem wurde der Einfluß der Säure auf die Veränderung der Viskosität des Buchweizenmehles am Brabender Viskograph untersucht.

Es ist ein Regime erarbeitet worden, mit dem getrockneter Buchweizen (TS = 89%) bis zu einem Feuchtegehalt von 22% wiederbefeuchtet werden kann. Die Lagerung der Ansätze erfolgte in Jutesäcken über einen Zeitraum von sechs Monaten.
Zusätze von 1,1 l/dt Milchsäure bewirkten bei 18% feuchtem Buchweizen eine Reduzierung von Hefen und Schimmelpilzen auf $6{,}0 \cdot 10^3$ KbE/g FM. Damit wurde der Schwellenbereich für Hefen und Schimmelpilzen von $1{,}0 - 2{,}0 \cdot 10^4$ KbE/g FM deutlich unterschritten. Der Gehalt an Ochratoxin A lag bei diesen Proben bei 1,1 µg/kg und damit im Bereich eines z.Z. diskutierten Grenzwertes für OTA. Die Viskosität des Mehles war gegenüber der Kontrolle um durchschnittlich 40% erniedrigt.
Bei einem Feuchtegehalt 22% reichten die gewählten Aufwandmengen an Milchsäure nicht aus, um den Keimgehalt an Schimmelpilzen unter den Schwellenbereich zu reduzieren. Der OTA- Gehalt lag mit 0,5 µg/kg niedriger als bei den erfolgreich konservierten Proben, die Viskösität des Mehles war gegenüber der unbehandelten Kontrolle um 60% reduziert.
Die Sensorik der mit Milchsäure behandelten Partien war durch den sauren Geruch beeinträchtigt.
Ob sich diese Befunde auch bei der Konservierung von erntefeuchtem Buchweizen bestätigen lassen, werden weitere Untersuchungen zeigen müssen.

Evaluation of the New Rhône Diagnostics Ochratoxin Immunoaffinity Column, for Determination of Ochratoxin A in Cereals, Beer and Coffee

E.C. Marley, W.C. Nicol, C.A. Donnelly
Rhone-Diagnostics Technologies Ltd, Research and Development Department,
West of Scotland Science Park, Unit 3.06 Kelvin Campus, Maryhill Road, Glasgow, G20 0SP, UK

In the United Kingdom industrial guidelines for cereals are set at 10ppb however ochratoxin limits worldwide can vary from 1ppb to 1000ppb in a range of foodstuffs including cereals, animal feed and pork kidney.

Following the development of a new ochratoxin immunoaffinity column by Rhône Diagnostics, a project was carried out to ensure that the new ochratoxin columns were capable of complying with legislation. The ochratoxin columns were required to perform to a high standard irrespective of the legislative levels in different countries, the type of commodity to be tested and the experience of the analyst.

Three commodities, cereals, coffee and beer were chosen and different extraction methods were developed for the determination of ochratoxin A using the new immunoaffinity column. Acetonitrile proved to be the best solvent for extracting ochratoxin A from cereals, while a bicarbonate/water extraction was the most appropriate solution for coffee. Beer required no extraction, only degassing prior to passage through the column. The recoveries obtained using the respective methods on spiked commodities were greater than 90% for cereals and beer and greater than 70% for ground coffee. The results obtained using the new column were highly reproducible and the column was found to have a capacity of at least 500ng and to have a detection level of as low as 0.18ppb, based on the detection limit of the HPLC system used.

The new methods and columns were shown to provide an excellent tool to comply with varying international legislation and guidelines being sufficiently reproducible, sensitive and providing excellent recoveries regardless of the commodity being tested. The methods involved were simple to follow and the ochratoxin columns were robust and easy to use.

Further work (expected completion date: mid-1996) has been initiated to develop satisfactory methods for pork kidney samples and animal feed for use with the ochratoxin columns.

Aflatoxin Derivatisation Using a Kobra Cell as an Alternative to Post Column Derivatisation with Iodine

a) W.C. Nicol and C.A. Donnelly and b) J.M. Fremy and S. Dragacci
a) Rhône-Diagnostics Technologies Ltd, West of Scotland Science Park, Unit 3.06 Kelvin Campus, Maryhill Road, Glasgow, G20 0SP, UK
b) CNEVA, Laboratoire Central D' Hygiene Alimentaire, 43 Rue de Dantzig, 75015 Paris, France

Aflatoxins are produced by the moulds *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* which can produce aflatoxins B_1, B_2, G_1 and G_2. Due to their carcinogenic nature, it is important to ensure that certain commodities do not contain aflatoxins prior to consumption by humans or animals. Aflatoxins fluoresce naturally under UV light therefore it is possible to detect the toxins using an HPLC with a fluorescent detector following extraction of the sample and concentration of the toxin using antibody-based immunoaffinity columns. Aflatoxins B_2 and G_2 fluoresce to a greater extent than aflatoxin B_1 and G_1, allowing direct detection by HPLC, however aflatoxins B_1 and G_1 require derivatisation with iodine or bromine in order to enhance their fluorescence prior to detection.

Derivatisation is often performed by PCD (post-column derivatisation) with iodine, however a KOBRA CELL can be used as an alternative method. The KOBRA CELL is an electrochemical cell which generates bromine for derivatisation and has been shown to produce excellent results compared to PCD. EC proposals for tighter mycotoxin legislation have resulted in the need for rapid and simple methods for determination of low levels of aflatoxins by HPLC. The use of immunoaffinity columns in conjunction with a KOBRA CELL and HPLC has been shown to provide a simple and accurate method with enhanced analytical performance. The KOBRA CELL was compared in two laboratories to PCD with iodine on a range of spiked peanut samples. The results showed a higher fluorescent signal and a larger signal to noise ratio with the KOBRA CELL for all four aflatoxins. This indicates that at lower detection levels where the peak areas of the aflatoxins are small in relation to the background noise using PCD with iodine, the KOBRA CELL is likely to allow greater differentiation resulting in better accuracy at lower aflatoxin levels. Laboratory tests have shown the limit of detection to be 0.05μg/kg of aflatoxin B_1 which meets with present EC requirements and could be used to meet even stricter legislation.

The AFLAPREP column used in conjunction with a KOBRA CELL was used to analyse naturally contaminated maize, cotton and peanut samples showing recoveries of approximately 70-90% and a satisfactory CV_R ($<15\%$) regardless of the food type. The KOBRA CELL was found to have the added advantage over PCD with iodine of requiring only one HPLC pump, with no need for a water bath or a column heater.

Inaktivierung von Ochratoxin-A in Pansensaft von Wiederkäuern bei Variation von pH-Wert und Fermantationsbedienungen im in-vitro System.

***H.Özpinar und **W. Drochner-**

Ochratoxin A, ein in erster Linie nierenschädigend wirkendes Mykotoxin, wird im Pansen zu Ochratoxin α abgebaut. Dabei führen nur sehr höhe Dosierungen zu Rückständen in der Milch.Die Toxizität des Abbauproduktes Ochratoxin α ist deutlich geringer als jene des Ochratoxin A .

In der vorliegende Arbeit wurde untersucht, wie sich verschiedene Faktoren wie pH-Wert und Fermentationsbedienungen im Pansen auf die Inaktivierung von Ochratoxin A auswirken . Die Untersuchungen wurde in-vitro durchgeführt. Dazu wurde das Verfahren des Hohenheimer Futterwerttestes zurückgegriffen. Pansensaft wurde vor der Morgenfütterung der Tiere gezogen. Reines Ochratoxin A wurde mit Pansensaft/Nährmedium- Lösung für die Dauer von 48 Stunden in Woulff'schen Flaschen inkubiert. Die eingesetzte Konzentration an Ochratoxin A betrug 200 µg je Liter Pansensaft. Nach einer Inkubationsdauer von 5 Minuten wurde eine gleichmäßige Verteilung im Ansatz angenommen und die ersten Proben gezogen. Weitere Parallelen wurden nach 4, 8, 12, 24, 32 und 48 Stunden entgenommen. Der Nachweis von Ochratoxin A und Ochratoxin wurde mit Hilfe von HPLC-Fluoresanzensdetektion nach **Lerch & Müller,1990** durchgeführt.

Die bei alllen eingesetzten Konzentrationen ermittelte Wiederfindungsrate betrug für Ochratoxin A 67±5 % und für Ochratoxin α 50±4 % . Die Arbeit wurde im zwei Reihen durchgeführt. Zuerst wurden Inkubationen mit Pansensaft der Milchkuh bei unterschiedlicher Fütterung (4 Rationen) an vier aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Im zweiten Teil wurde mit Pansensaft unterschiedlich pH-Werte gearbeitet. Bei Inkubation mit Pansensaft in-vitro nahmen die Konzentrationen an Ochratoxin A unter allen untersuchten Bedienungen mit der Inkubationsdauer ab. Als einziger Metabolit wurde Ochratoxin α nachgewiesen. Seine Konzentration stieg parallel zur Abnahme des Gehaltes an Ochratoxin A bei allen Untersuchungen an.

Der pH-Wert erwies sich als ein wichtiger Faktor bezüglich der Umsetzungsgeschwindigkeit von Ochratoxin A . Während der hohen pH-Werte wurde Ochratoxin A am schnellsten hydrolisiert.

*** Institut für Tierernährung der Veterinärmedizinischen Fakultät, Üniversität Istanbul/Türkei**

**** Institut für Tierernährung der Üniversität Hohenheim- Stuttgart**

Biologische Detoxikationsmittel bei mit Ochratoxin A gefütterten Kücken

J. Grajewski [1], J. Böhm [2]
[1] Lehrstuhl für Biologie und Umweltschutz, Pädagogische Hochschule, Chodkiewicza-Str. 30, PL 85-064 Bydgoszcz
[2] Inst. für Ernährung, Veterinärmedizinische Universität, Josef Baumann-G. 1, A-1210 Wien

In den Untersuchungen wurde der Versuch einer Detoxikation von Ochratoxin A durch das biologische Mittel Silibinin unternommen, welches als Extrakt aus Samen der Mariendistel (*Silybum marianum*) gewonnen wurde. Gegenwärtig wird die obige Gruppe von Flavonoiden zur Vorbeugung und bei stationärer Behandlung von Erkrankungen des Leber- und Nierengewebes angewendet, besonders bei der Vergiftung mit Amanitin (Toxin des Fliegenpilzes).

Zweck der Untersuchung war die Prüfung der Aktivität von Silibinin bei der Detoxikation von OTA bei wenige Tage alten Kücken. Fünf Isolate Penicillium verrucosum wurden auf Reis in zwei Wiederholungen vermehrt (Inkubation). Der festgestellte pathogenste Stamm (Nr. 450) wurde zur Biosynthese von OTA auf Weizen angewendet. Dieser Weizen wurde zu 60 % im Kückenstarter eingesetzt. Ausgeführt wurden zwei Fütterungsversuche an Kücken mit einer Daür von je einer Woche. Bei der ersten Untersuchung wurde je eine Gruppe mit Kontrollfutter, Versuchsfutter mit 2 ppm OTA, Versuchsfutter mit 1 % Silibinin bzw. Versuchsfutter mit OTA und Silibinin gefüttert. Bei der zweiten Untersuchung betrug der OTA-Anteil nur 0,2 ppm und der Silibinin-Anteil 0,5 %. Die Gruppeneinteilung erfolgte wie bei der ersten Untersuchung.

Während des Versuches wurden wiederholt die Lebendmassen erhoben, bei Versuchsende wurde eine pathoanatomische 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 der Firma Rhone-Poulenc durchgeführt. Danach wurde der OTA-Gehalt mittels HPLC bestimmt.

Auf Grund der erzielten Ergebnisse kann man schlußfolgern, daß man in einem einwöchigen Versuch keinen positiven Einfluß von Silibinin in Bezug auf eine OTA-Detoxikation im Verdauungskanal bei Kücken feststellen kann. Es zeigte sich, daß die Versuchsgruppe mit 2 ppm OTA und 1% Silibinin den niedrigsten Lebendmassezuwachs hatte, gefunden wurde eine Vergrößerung von Niere und Leber.

Ähnliche Ergebnisse brachte der zweite Versuch. Bei den mit OTA und Silibinin gefütterten Kücken traten überdies vermehrt Magengeschwüre auf.

Reabsorptive uptake of ochratoxin A in rat kidney collecting duct and in MDCK-cells

Gerald Schwerdt, Matthias Zingerle, Ruth Freudinger, Micheal Gekle and Stefan Silbernagl
Physiologisches Institut, Universität Würzburg, Röntgenring 9, D - 97070 Würzburg

Ochratoxin A (OTA) has a long half life in the body (up to 510 hours in apes after oral uptake) due to plasma protein binding, which prevents effectively filtration in the kidney. Thus, only small amounts of OTA reach the tubular lumen of the nephron by filtration. We studied whether OTA can be reabsorbed along the nephron in rats in vivo and in cultured cells of the renal collecting duct. Reabsorption would contribute to the observed prolonged half-life in the mammalian body. We found that OTA is reabsorbed along the rat kidney collecting duct in a pH-dependent manner. Also MDCK-C11 cells, which resemble intercalated cells of the collecting duct, showed pH-dependent reabsorptive transport. The first step of this reabsorptive process is uptake of the mycotoxin across the apical membrane of the cell. Therefore, we studied this transport in detail using radiolabelled OTA (^{3}H-OTA). We found that uptake was temperature-dependent indicating that entry of OTA into the cell is carrier-mediated and does not occur by diffusion alone. Uptake was also pH-dependent: with decreasing pH on the luminal side (apical cell side) uptake of OTA increased. Thereby an intracellular accumulation of OTA up to 13-fold (to 1 µmol/l cell volume) compared to the extracellular bath solution (84 nmol/l) was observed at pH 5.0 and 37°C. Because of the phenylalanine moiety of OTA and its described interaction with phenylalanine-handling proteins it seems possible that uptake of OTA is mediated by sodium-dependent amino acid cotransporter. But neither amino acids (phenylalanine, glycine or alanine, up to 50 mmol/l) nor replacement of sodium by N-methyl-D-glucamine were able to inhibit the uptake of OTA nor its transepithelial reabsorption. Because of the dipeptide-bond another possible mechanism responsible for uptake of OTA could be proton-coupled dipeptide cotransport. Substrates of these transporter (carnosine, glycylsarcosine and cephalosporine with similar molecular structure as OTA) inhibited both, reabsorption in the rat renal collecting duct and in MDCK-C11 cells as well as uptake in these cells. Although inhibition was not complete, these data show that OTA is taken up into the cell, at least in part, by proton-coupled dipeptide cotransport. The clear pH dependence supports this hypothesis. Consequently, increasing the pH gradient across the apical membrane (by intracellular alkalinization via activation of the Na^+/H^+-exchanger) led to increased OTA uptake and intracellular OTA contents in MDCK-C11 cells. We conclude that the pH of distal urine (where a pH of 5.0 is not unusual) is a crucial parameter for OTA reabsorption along the collecting duct and that avoiding acidic urine consequently should lead to faster elimination of the toxin from the body.

Effect of chronic exposure to Ochratoxin A on organic anion transport systems in OK cells.

Christoph Sauvant, Stefan Silbernagl and Michael Gekle
Physiologisches Institut I, University of Würzburg, Röntgenring 9, 97070 Würzburg

Ochratoxin A (OTA) is a widespread mycotoxin, which is nephrotoxic and carcinogenic. Because a decline in PAH (para-Aminohippurate) secretion after chronic OTA exposure was observed "in vivo", we investigated the effect of OTA on the polyspecific organic anion exchanger in OK cells (proximal tubule derived). PAH is a substrate of the organic anion transport system in the proximal tubules of the kidney. It consists of the basolaterally located organic anion exchanger and an only partially characterized transport step across the apical membrane. The basolateral organic anion transport is tertiary active. OTA itself is a substrate for this transporter. The above mentioned transport steps are of major importance for the elimination of a variety of xenobiotics, drugs and metabolites.

OK cells where cultivated on permeable supports, so that the basolateral and apical side of the epithelium were both accessible. The substrates for the transport systems were marked by [^{14}C] and [^{3}H]-mannit was used as a marker for the tightness of the epithelium, for correction of paracellular fluxes and extracellular water space.

Incubating OK cell epithelia for 3 days with OTA at concentrations of of 10^{-7}, 10^{-6} and 10^{-5} mol/l (equivalent to 10^{-10}, 10^{-9} and 10^{-8} mol/l free OTA) led to a significant decline of both, basolateral uptake (IC_{50}=0,06•10^{-6} mol/l) and secretion (IC_{50}=0,26•10^{-6} mol/l) of PAH up to 10% of control. No effect on total protein content, LDH-release or epithelial tightness was observed at concentrations up to 10^{-6} mol/l OTA. Furthermore, we observed that the activities of the basolateral organic cation transporter and the apical transporter for neutral amino acids did not change after OTA incubation and intracellular substrate enrichment was not decreased. Thus OTA specifically acts on the organic anion transport.

Additionally, the above mentioned incubation led to a decrease in specific PAH-binding on the basolateral side, indicating a decrease of the number of transport proteins in the basolateral membrane. Basolateral transport of [^{14}C]-PAH was fully saturable by an excess of unlabeled PAH. The uptake of [^{14}C]-PAH across the apical membrane was not saturable in control cells. However, after incubation with 10^{-6} mol/l OTA for 3 days the apical uptake showed a saturable component indicating the appearence of a second transport activity. The same treatment led to an increase in specific PAH-binding on the apical side of OK cells. Efflux-experiments on OK cells showed a decrease in efflux to the apical compartment and an increase in PAH remaining in the cells.

Our data show that (i) long-term incubation with OTA in the nanomolar range distinctly and specifically reduces the activity of the organic anion transporter, (ii) without influencing cell viability, general metabolism or other transport systems. (iii) OTA reduces its own elimination by reducing the number of basolateral transporters and by impairing the efflux of organic anions through the apical membrane. Thus, (iiii) the excretion of many xenobiotics and drugs is impaired, whereby OTA exerts indirect toxic actions. (**Supported by DFG-grant Si 170 / 7-2**)

Screening potentiell toxinogener Penicillien mit Hilfe des MTT-Zellkulturtestes

Ralf Rotheneder und Manfred Gareis
Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, BAFF, E.-C.-Baumannstr. 20, 95326 Kulmbach

Eine Vielzahl von Stämmen von *Penicillium spp.* ist als Bildner von Mykotoxinen bekannt. Beim Einsatz von *Penicillium*-Isolaten als Starter- und Schutzkulturen im Lebensmittelbereich (schimmelpilzgereifte Käse und Rohwürste) ist diesem Aspekt Rechnung zu tragen. Es sind daher solche *Penicillium*-Stämmme auszuwählen, die kein oder nur ein geringes toxinogenes Potential besitzen. Die Bildung von sekundären Stoffwechselprodukten von Mikromyceten wird im wesentlichen vom Substrat und externen Faktoren (u.a. pH- und a_w-Wert, Temperatur) beeinflußt. Aus diesen Gründen sind Rückschlüsse zur Toxinogenität von Pilzisolaten sowie deren Eignung für den Lebensmittelbereich nach Anzucht auf künstlichen Medien nur begrenzt möglich. Eine Überprüfung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Isolaten muß daher an den Produkten selbst vorgenommen werden und sollte, da nicht alle toxischen Verbindungen mit physikalisch- und/oder immun-chemischen Methoden erfaßt werden können, biologische Assays mit einbeziehen.

Im Rahmen einer Studie zur Selektion lebensmittelgeeigneter Penicillium-Isolate wurden insgesamt 74 Stämme der Gattung *Penicillium* mit Hilfe des MTT-Zellkulturtestes charakterisiert. Diese Stämme waren vorab im Hinblick auf ihre technologische Eignung als Starterkulturen für schimmelpilzgereifte Salami überprüft worden (Rotheneder, 1996).

Die Isolate (*Penicillium camemberti, P. nalgiovense, P. spp*) wurden sowohl als 3-Punktkulturen 21 Tage auf künstlichen Nährmedien (Malz-Extrakt-Agar, MEA) kultiviert als auch zur Produktion schimmelpilzgereifter Salami (28 Tage Reifezeit) verwendet. Definierte Probenmengen der Nährmedien sowie der Produkte wurden nach Ansäuern auf pH 4,5 mit $CHCl_3$ extrahiert und die Rohextrakte nach Filtration über Na_2SO_4 und Konzentration für den Zellkulturtest mit SK-Zielzellen unter definierten Bedingungen eingesetzt.

Von den untersuchten 74 Isolaten erwiesen sich 24 bzw. 7 Stämme unabhängig von den Kulturbedingungen als nicht toxisch oder zytotoxisch. Bei den restlichen 43 Isolaten waren substratabhängige Einflüsse zu registrieren: 38 Isolate, die nach Anzucht auf MEA zytotoxische Verbindungen produzierten, zeigten sich nach Anzucht auf dem Produkt als nicht toxinogen im MTT-Test. Das Gegenteil wurde für weitere 5 Isolate registriert.

Den Ergebnissen zufolge ist das Vorkommen von zytotoxinproduzierenden Penicillien-Stämmen, die im Lebensmittelbereich eingesetzt werden, nicht selten. Für den vorbeugenden Gesundheitsschutz sollten diejenigen Isolate verwendet werden, die ein möglichst geringes Mykotoxinpotential besitzen. Dabei ist es essentiell, neben bekannten Verfahren zum Mykotoxinnachweis biologische Assays wie Zellkulturteste in das Selektions-Screening zu integrieren. Aufgrund der substrat- und klimaabhängigen Produktion von Mykotoxinen gewährleistet lediglich die Testung schimmelpilzgereifter Produkte eine sichere Aussage über die Eignung definierter Isolate.

Screening von lebensmittelrelevanten Penicillium-Isolaten auf artifiziellen Substraten und Charakterisierung gebildeter Sekundärstoffwechsel-Produkte

Andreas Czwalinna, Isabel Sattler, Ralf Thiericke, Susanne Grabley, Manfred Gareis
Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung, Beutenbergstr. 11, 07745 Jena

In der Lebensmitteltechnologie finden verschiedene Penicillium-Spezies (*P. nalgiovense, P. camembertii, P. roqueforti*) Anwendung als Starterkulturen für fermentierte Lebensmittel z.B. schimmelpilzgereifte Rohwürste. Einige dieser Stämme weisen ein Spektrum an Sekundärstoffwechselprodukten mit zum Teil erheblichem toxinogenem Potential auf (Cyclopiazonsäure, Penicillinsäure, Roquefortine etc.). Die Anforderungen an den Einsatz von Penicillium-Stämmen im Lebensmittelbereich richten sich nach technologischen und verbraucherorientierten Gesichtspunkten. Eine entscheidende Rolle spielt die toxikologische Unbedenklichkeit der durch Pilz-Isolate gebildeten Produkte. Diese Anforderungen zielen auf die Verwendung von Isolaten, die als sicher eingestuft werden können, d.h. mit dem Lebensmittelprodukt als Substrat sollte eine Toxinbildung bis zur Unbedenklichkeits- bzw. Nachweisgrenze ausgeschlossen sein.

Um das Sekundärstoffpotential von lebensmittelrelevanten Penicillium-Isolaten zu charakterisieren, wurden 30 von der Bundesanstalt für Fleischforschung in Kulmbach zur Verfügung gestellte Penicillium-Stämme (*P. nalgiovense, P. camembertii* und andere) auf 6 artifiziellen Substraten mit der Methode des Chemischen Screenings[1] untersucht. Ausgewählte Produzenten[2] wurden im 200 l Maßstab kultiviert. Auf dem Poster werden die Resultate aus dem Chemischen Screening sowie erstmals aus lebensmittelrelevanten Penicillium-Stämmen isolierte Sekundärmetabolite dargestellt (Abb. 1).

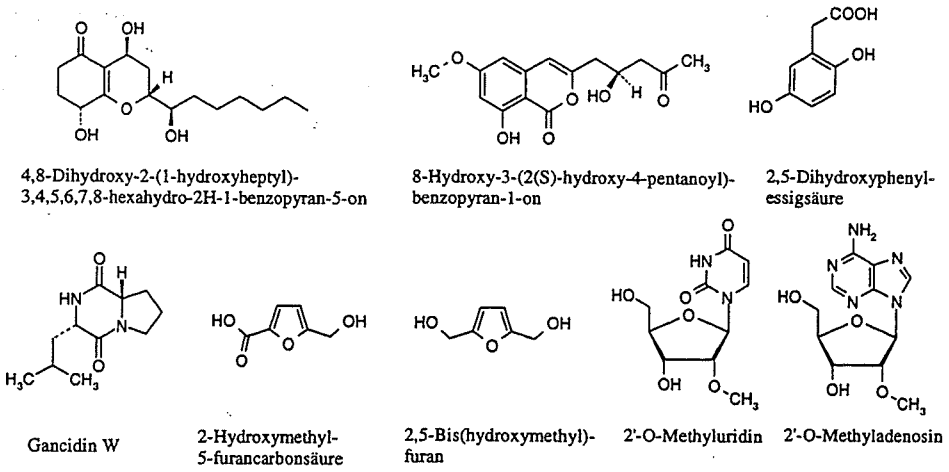


Abb. 1: Isolierte Sekundärmetabolite aus lebensmittelrelevanten Penicillium-Stämmen.

Um das analysierte Produktspektrum unter Anwendungsaspekten näher zu charakterisieren, wurden ausgewählte Stämme auf Rohwurst (Salami) kultiviert. Die hieraus erhaltenen Extrakte wurden vergleichend mit der Methode des Chemischen Screenings sowie der DAD-HPLC analysiert. Es konnten keine der zuvor auf artifiziellen Nährlösungen isolierten Verbindungen aus Salami-Kulturen nachgewiesen werden (Detektionsgrenzen: DC 10-50 µg/ml, DAD-HPLC 5-30 µg/ml). Eine Metabolitenbildung auf der Salami unterhalb dieser Nachweisgrenzen ist jedoch nicht auszuschließen. Die isolierten Substanzen werden zur Zeit auf biologische Aktivitäten hin untersucht und dem Naturstoff-Pool[3] zugeführt.

[1] K. Burkhardt, H.-P. Fiedler, S. Grabley, R. Thiericke & A. Zeeck, 1996, J. Antibiotics, 49, 432-37
[2] R. Rotheneder, Dissertation 1996, Bundesanstalt für Fleischforschung Kulmbach.
[3] C. Koch, T. Neumann, R. Thiericke & S. Grabley 1997, Nachrichten aus Chemie, 45, 16-18.

Lungenhämosiderose in Säuglingen im Zusammenhang mit Innenraum- und Luftkontaminierung mit *Stachybotrys atra* und anderen Schimmelpilzen

R.A. Etzel[1], E. Montana[1], W.G. Sorenson[2], G.J. Kullman[2], T.M. Allan[3], D.R. Olson[1], B.B. Jarvis[4], J.D. Miller[5], und D.G. Dearborn[6]

[1]National Center for Environmental Health, CDC, Atlanta, Georgia, USA, [2]National Institute for Occupational Safety and Health, Morgantown, West Virginia, USA, [3]Cuyahoga County Board of Health, Cleveland, Ohio, USA, [4]Department of Chemistry and Biochemistry, University of Maryland, College Park, Maryland, USA, [5]Agri-Canada, Ottawa, Ontario, Canada, [6] Department of Pediatrics, Rainbow Babies and Childrens Hospital, Case Western Reserve School of Medicine, Cleveland, Ohio USA.

Zwischen Januar 1993 und Dezember 1994 traten zehn Fälle von Lungenhämosiderose bei Säuglingen im Alter von ein bis acht Monaten in einem kleinen Stadtteil von Cleveland, Ohio (USA) auf. Es wurde die Hypothese untersucht, daß die erkrankten Säuglinge wahrscheinlicher ein einem Haus mit *Stachybotrys atra*-Kontaminierung wohnten als in einem Haus ohne *Stachybotrys atra*.

Die Innenräume der Fall-und Kontrollhäuser wurden auf *Stachybotrys atra* und andere Schimmelpilze untersucht. In den Zimmern, in denen die Säuglinge die meiste Zeit verbrachten, wurden Luft- und Oberflächenproben genommen. Die gemessene durchschnittliche Kolonienzahl in der Luft für alle Schimmelpilze betrug 29 227 KBE/m^3 gegenüber den Kontrollhäusern mit 707 KBE/m^3, für *S. atra* betrug sie 43 KBE/m^3 in den Fallhäusern und 4 KBE/m^3 in den Kontrollhäusern. In Luftfilterkassetten wurde *S. atra* in 5 von 9 Fallhäusern und in 4 von 27 Kontrollhäusern nachgewiesen. Die "gematchte Odds Ratio" (Zufallsrate) für eine Änderung von 10 Einheiten bezüglich der mittleren Luftkonzentration von S. atra betrug 9,83 (95% Vertrauensbereich: 1,08 - 3 000 000).

Die durchschnittliche Konzentration von *S. atra* auf den Oberflächenproben betrug 20 000 x 10^3 KBE/g in den Fallhäusern und 7 x 10^3 KBE in den Kontrollhäusern.

Schlußfolgerung: Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Säuglinge ein größeres Risiko hatten an Lungenhämosiderose zu erkranken, wenn sie in einem Haus mit *S. atra* und anderen Schimmelpilzen lebten.

Pasture as a source of *Fusarium* toxins in New Zealand

Neale R Towers
Toxinology and Food Safety Research Group, AgResearch, Ruakura Agricultural Research Centre, Private Bag 3123, Hamilton, NEW ZEALAND

Animal disease problems associated with ingestion of grains and grain-based feedstuffs infected with *Fusarium* species and contaminated with various mycotoxins are well known, particularly the hyper-oestrogenism resulting from ingestion of feedstuffs contaminated with zearalenone. Such problems occur wherever livestock are housed and fed grain-based rations. However in New Zealand farm livestock are kept outdoors throughout the year and fed almost exclusively on grass/clover pastures either grazed directly or conserved as hay or silage. Despite this reproductive problems caused by the ingestion of zearalenone occur throughout the country and the possibility that trichothecene mycotoxins cause animal ill-thrift problems is also under investigation.

Included in the pasture microflora are a number of potentially toxigenic *Fusarium* species (*F. avenacium, F. crookwellense, F. culmorum, F. graminearum, F. graminium, F. oxysporum, F. semitectum, F. tricinctum*). Analysis of pasture samples collected from throughout New Zealand over several years shows that many pastures, especially during autumn (February, March, April) when sheep are mated, contain significant levels of zearalenone. Zearalenone dosing trials have established that daily intakes of more than 1 mg zearalenone depress the ovulation rates of sheep, with the decrease in ovulation rate increasing as both the daily zearalenone intake and the duration of exposure to the toxin increases. Ingestion of zearalenone contaminated pastures can be readily detected by analysing urine for the presence of the metabolites, α- and β-zearalenol, which increase in concentration in proportion to the amount of toxin ingested. Analysis of urine samples from throughout New Zealand suggest that more than 30 percent of sheep flocks are exposed to sufficient zearalenone to reduce ovulation, and thence lamb birth rates, by up to 25 percent causing a significant production losses in affected flocks.

Cattle also graze zearalenone-contaminated pastures and the analysis of blood, urine and pasture samples from herds reported to have fertility problems shows that the zearalenone and zearalenol concentrations in these samples are higher than in similar samples from herds with acceptable reproductive performance. However, as most samples were collected when veterinary examination revealed the low pregnancy rates some months after mating in spring (September, October - when pasture zearalenone levels are low), and no experimental dosing studies have been undertaken to establish the daily dose rates that depress ovulation rates in cattle, a cause and effect relationship between the high zearalenone intakes and the poor fertility has not been established.

In autumn, when pasture zearalenone levels are highest, many young grazing animals suffer from an 'ill-thrift' and fail to grow. The possibility that these pastures contain trichothecene toxins as well as zearalenone is being investigated as many of the *Fusarium* isolated from pastures produce both zearalenone and trichothecene toxins when cultured in the laboratory. This has been hampered by the difficulty of applying HPLC analytical methods to pasture extracts. To overcome this problem, and to facilitate a survey of pasture samples, we are developing ELISA for nivalenol and deoxy-nivalenol.

There have been a number of reports of the presence of zearalenone in conserved forages, often in association with fertility problems in cattle fed the hay or silage, which suggest that zearalenone might occur in the pastures of other countries. This would not be surprising given that the species found in New Zealand pastures occur throughout the world and climatic conditions that favour their growth often lead to the infection of grain crops and the subsequent contamination of the grain with mycotoxins.

Anreicherung und Charakterisierung anaerober, Desoxynivalenol-transformierender Mikroorganismen

G. Schatzmayr[a], J. Binder[a], E.M. Horvath[c], N. Ellend[b], H. Danner[a], R. Krska[b], R. Braun[a]
Interuniversitäres Forschungsinstitut für Agrarbiotechnologie, Abt. Umweltbiotechnologie[a] und Abt. Analytische Chemie[b], Konrad Lorenz Str. 20, A-3430 Tulln
Biomin GTI[c], Industriestr. 21, A-3130 Herzogenburg

Abstrakt (Poster)

Das präsentierte Poster zeigt ein Ablaufschema zur Anreicherung einer aus zwei Bakterienspezies bestehenden Mischkultur, die unter anaeroben Bedingungen das toxische Desoxynivalenol (DON), oder auch Vomitoxin, zum Deepoxy-Desoxynivalenol (DOM-1) transformiert.

Ausgehend von einer Rinderpansenflora wurde eine Anreicherung auf einem standardisierten, Habitat stimulierenden Medium versucht. Da DON jedoch kein ausreichendes Selektionskriterium für die gesuchten Bakterien darstellt - es wird nicht als Kohlenstoffquelle verwertet -, war kein Anreicherungseffekt gegeben.

Aus diesem Grund wurden in der Folge Antibiotika (Nalidixinsäure, Vancomycin, Tetracyclin, Polymyxin und andere) zugesetzt, um unerwünschte Begleitkeime zu entfernen.

Danach führten Medienoptimierungsversuche einerseits zu einer weiteren Selektion der Flora und andererseits zu einer Anreicherung des DON-transformierenden Stammes. Die Variation innerhalb der Nährmedien bestand darin, daß unspezifische Bestandteile, wie Hefeextrakt und Pepton, durch Vitamine, Spurenelemente und unterschiedliche Kohlenstoffquellen (Kohlenhydrate, Fettsäuren und Aminosäuren) ersetzt wurden, um mit definierte Medien arbeiten zu können.

Mittels HPLC konnte das Auftreten diverser Stoffwechselprodukte, die während der DON Umsetzung gebildet oder umgesetzt wurden, detektiert werden. Diese Analysen lieferten auch wichtige Hinweise hinsichtlich der Metabolisierbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen.

Die Umsetzung der, durch die oben genannten Arbeitsschritte gewonnenen Informationen, führte letztendlich zu einer definierten Mischkultur. Mit dieser aus zwei Bakterienspezies bestehenden Kultur wurden Untersuchungen bezüglich Zellwachstum, DON-Transformationsgeschwindigkeit und dem Zusammenhang zwischen DON-Umsetzung und Zellzahl durchgeführt.

Hefehemmtest zur Bestimmung der Toxizität von DON-Metaboliten

J. Binder[a], E.M. Horvath[c], J. Heidegger[a], N. Ellend[b], H. Danner[a], R. Krska[b], R. Braun[a]
Interuniversitäres Forschungsinstitut für Agrarbiotechnologie, Abt. Umweltbiotechnologie[a] und Abt. Analytische Chemie[b], Konrad Lorenz Str. 20, A-3430 Tulln
Biomin GTI[c], Industriestr. 21, A-3130 Herzogenburg

Abstrakt (Poster)

Das Screening nach DON detoxifizierenden Mikroorganismen ist aufgrund der vielen Versuchsansätze mit einem hohen Analysenauaufwand verbunden. Besonders der Bedarf an apparativen Analysen (HPLC; GC) ist hoch und dementsprechend teuer. Meist genügt für Screeningversuche jedoch eine Analyse bezüglich der veränderten Toxizität. Durch Verwendung eines einfachen Hemmtests können Fermentationsüberstände direkt (nur Sterilfiltration nötig) in 96 well Titerplatten analysiert werden. Das Prinzip beruht auf der inhibierenden Wirkung von Trichothecenen auf die Proteinsynthese von Eukaryonten (z.B. Hefen) durch Bindung der 12,13-Epoxy-Gruppe an die 80S Ribosomen. Durch Mitführen einer Standardreihe sind mit diesem Test semiquantitative Auswertungen möglich. Sind Mikroorganismen imstande DON zu transformieren, so verändert sich die Toxizität im Fermentationsmedium. Dies ermöglicht eine rasche Bewertung der dabei entstandenen Metaboliten. Anhand der aeroben Biotransformation von DON zu noch unbekannten Metaboliten soll dieses Testsystem vorgestellt werden..

Hemmversuche wurden auch mit anderen Trichothecenen durchgeführt um in einer späteren Phase auch deren Metaboliten zu untersuchen. Besonders Verrucarin A und T2-Toxin zeigen EC50 Werte die den Einsatz dieses Bioassays für kontaminiertes Getreide realistisch erscheinen lassen.

Der Vorteil dieses Tests liegt in der einfachen Handhabung des Testorganismus und in der hohen Anzahl an Proben die auf einer Platte zugleich analysiert werden können. Weiters ist dieser Test äußerst kostengünstig und unkompliziert.

Auftreten von *F. culmorum* an Winterweizen und Nachweis der Fähigkeit zur Trichothecenbildung

A. SCHÜTZE*, L. NIESSEN**, R.F. VOGEL**, E.-C. OERKE* und H.-W. DEHNE*
* Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Institut für Pflanzenkrankheiten
** Technische Universität München, Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie.

Im Winterweizenanbau führen Blüteninfektionen durch *Fusarium* spp. zur Reduktion des Tausendkorngewichts und zudem zu einer Beeinträchtigung der Qualität des Ernteguts durch die Mykotoxinbildung. Das Auftreten von *Fusarium* spp wurde an Standorten mit unterschiedlichen Anbausystemen erfaßt. Weiterhin wurden die Isolate von *Fusarium culmorum* biochemisch und molekularbiologisch auf ihre Fähigkeit zur Mykotoxinbildung untersucht.

In den Vegetationsperioden 1994/95 und 1995/96 wurden neben *F. culmorum* folgende *Fusarium*-Arten an den Halmbasen im Stadium EC 75 und Körnern nach der Ernte identifiziert: *F. avenaceum, F. graminearum, F. tricinctum, F. sporotrichioides, F. moniliforme, F. oxysporum, F. semitectum F. equiseti* und *M. nivale.* Von den Halmbasen wurde 1995 vor allem *F. avenaceum, M. nivale, F. culmorum* und *F. graminearum* isoliert. Die Karyopsen hingegen waren zusätzlich *mit F. poae, F. tricinctum* und *F. sporotrichioides* befallen.

In vitro Untersuchungen ergaben deutliche Unterschiede zwischen den *F. culmorum*-Isolaten hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Bildung von Deoxynivalenol und Nivalenol. Zur Überprüfung der Pathogenität und der Mykotoxinbildung verschiedener Isolate *in vivo* wurde in der Vegetationsperiode 1995/96 Winterweizen zum Zeitpunkt der Vollblüte inokuliert. Die Ermittlung der Konzentration beider Mykotoxine im Erntegut erfolgte gaschromatographisch (FID). Parallel zu den Mykotoxin-Untersuchungen wurde mit einer PCR-Methode die potentielle Fähigkeit dieser Isolate zur Bildung von Trichothecenen untersucht. Bei einigen Isolaten, die mit Hilfe spezifischer Primer charakterisiert wurden, konnte die Bildung von beiden Toxinen nachgewiesen werden.

Untersuchungen zur Reduktion der Ergotalkaloidgehalte (Ergonovin, Ergotamin, Ergocryptin) von mutterkornhaltigem Getreide durch verschiedene Behandlungen

E. Landes, M. Coenen und J. Kamphues
Institut für Tierernährung Tierärztliche Hochschule Hannover

In den letzten Jahren scheint ein Befall von Getreide mit Mutterkorn in Deutschland wieder häufiger aufzutreten. Für die Toxizität werden allgemein die Ergotalkaloide verantwortlich gemacht, wobei der Alkaloidgehalt sowie das -muster in einzelnen Sklerotien stark variieren kann. Dennoch wird in der Futtermittelverordnung lediglich für den Mutterkorngehalt (1g/kg Getreide), nicht jedoch für den Alkaloidgehalt ein Grenzwert festgelegt. In der Fütterungsberatung bereitet die Einschätzung und die Beurteilung belasteter Futtermittel erhebliche Probleme und Unsicherheiten. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Alkaloidgehalte kontaminierter Futterproben durch verschiedene, in der landwirtschaftlichen Praxis mögliche Behandlungsverfahren zu reduzieren.

Material und Methode

Die Untersuchungen erfolgten mit geschrotetem Getreide (Gemenge: je 1/3 Gerste, Weizen und Roggen), dem Mutterkorn (3 g/kg) zugemischt wurde. Anschließend wurden verschiedene Behandlungsverfahren zur möglichen Reduktion des Alkaloidgehaltes überprüft und danach die Alkaloide (Ergonovin, Ergotamin, Ergocryptin) mit HPLC (Methode nach KLUG 1986, modifiziert) bestimmt.

- Wärme: Erhitzung von Proben mit unterschiedlichem TS-Gehalt für 30, 60 und 120 min auf 96° C
- Säuren: Zusatz von Propion- bzw. Ameisensäure (0,3 %) für 3 Tage bzw. 2 Wochen
- Laugen: Zusatz von 50%iger Natronlauge (3 Tage) bzw. Zubereitung als Sodagrain (häufigere Kontrollen über 8 Tage bzw. 2 Wochen)
- Alkalisch wirkende Stoffe: Zusatz von 0,5 % Monomethylamin (3 Tage) bzw. Begasung mit 1,5 %igem Ammoniak (3 bzw. 6 Tage)

In Abhängigkeit vom Behandlungsverfahren wurden die Alkaloidgehalte in der Getreideprobe (Abb.) reduziert. Als besonders effektiv erwies sich die Behandlung mit Laugen und Ammoniak, während nach Zusatz von Monomethylamin nahezu keine Wirkung erkennbar war. Durch die Einwirkung der Säuren verringerten sich die Alkaloide nur um ca. 30-40 %. Die Erhitzung der Getreideproben bewirkte bei niedrigem TS-Gehalt (60 %) eine schnellere und stärkere Reduzierung als bei hohem TS-Gehalt (90 %). Gleichzeitig stiegen die Anteile der isomeren Formen der o.g. Alkaloide, die pharmakologisch jedoch eine geringere oder keine Wirkung aufweisen, teils deutlich an.

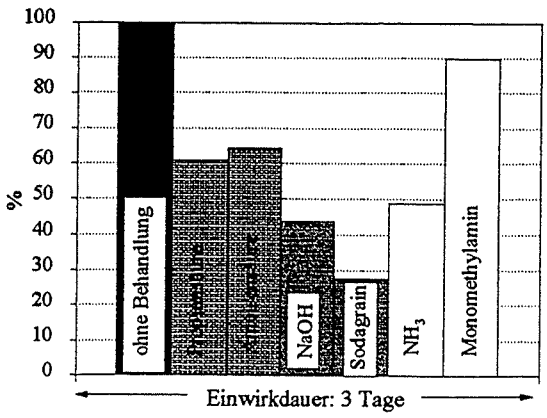


Abb.: Ergotamingehalt (%) nach Verwendung verschiedener Behandlungsverfahren (Ausgangswert=100)

Zur Analytik von Lolitrem B im Blutserum von Schafen

Hana Valenta[1)] und Elisabeth Oldenburg[2)]
Institut für Tierernährung (1) und Institut für Grünland- und Futterpflanzenforschung (2) der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL),
Bundesallee 50, 38116 Braunschweig

Das Neurotoxin Lolitrem B wird in Futtergräsern gebildet, die mit dem endophytischen Pilz *Acremonium lolii* infiziert sind. Es kann bei Weidetieren Symptome von „Ryegrass staggers" auslösen. Für einen Weideversuch mit Schafen auf Lolitrem B-haltigem Deutschen Weidelgras, bei dem u.a. der Übergang des Toxins ins Blut untersucht werden sollte, war es nötig, eine Methode zur Bestimmung von Lolitrem B im Blut zu adaptieren bzw. zu entwickeln.

Die zur Analyse der Proben angewendete Methode bestand aus einer zweimaligen Extraktion von Blutserum mit Diethylether nach Garthwaite (1996) und einer Reinigung der Extrakte über Silicagel-Kartuschen nach Gallagher et al. (1985). Lolitrem B wurde nach Gallagher et al. (1985) mit NP-HPLC mit Fluoreszenzdetektion mit einem leicht modifizierten Eluenten bestimmt. Die Nachweisgrenze der Methode lag bei 0,3 ng/ml Serum, die Wiederfindungsraten betrugen 80,4 % ± 8,4 % im Bereich 1 - 50 ng/ml (n = 19).

Da mit dieser Methode in keiner Serumprobe aus dem Weideversuch Lolitrem B nachgewiesen werden konnte, wurde geprüft, ob das Toxin bei Zugabe zu frischem Schafblut im Serum wiedergefunden wird. In Übereinstimmung mit Garthwaite (1996) wurde das zugegebene Lolitrem B fast vollständig im Serum wiedergefunden. Auch eine 2-monatige Lagerung von mit 2 ng/ml gespikten Serumproben bei -18°C bewirkte keine Abnahme der Lolitrem B-Konzentration. Es wurden weiter Versuche zur Inkubation mit ß-Glucuronidase, zur Modifikation der Extraktion und - zur Bestätigung von positiven Befunden - mit anderen HPLC-Eluenten durchgeführt. Über die Ergebnisse wird im Poster berichtet.

Literatur

GALLAGHER, R.T., HAWKES, A.D. und STEWART, J.M. (1985): Rapid determination of the neurotoxin lolitrem B in perennial ryegrass by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Chromatogr. **321**, 217-226.
GARTHWAITE, I. (1996): persönliche Mitteilung.

Bestimmung von 8 Trichothecenen mittels GC/MS (Ion Trap) nach Festphasenextraktion

M. Schollenberger, U. Lauber, H. Terry, H.-M. Müller, W. Drochner
Institut für Tierernährung, Universität Hohenheim, Emil-Wolff-Strasse 10, 70599 Stuttgart

Im Rahmen einer an der Universität Hohenheim etablierten Forschergruppe "Fusarientoxine, Vorkommen, Wirkung und Prophylaxe", soll eine große Anzahl von Getreideproben auf die Fusarientoxine DON, 3-ADON, 15-ADON, NIV, FUS-X, DAS, HT-2 und T-2 untersucht werden.
Zur sicheren Identifizierung und quantitativen Bestimmung der Trichothecene steht ein empfindliches GC/MS-System zur Verfügung.

Problemstellung:

- Analyse von nahezu unbelastetem (natürliche Infektion), als auch stark belastetem Getreide (künstliche Infektion)
- Untersuchung von chlorophyll- und spreuhaltigen Proben, sowie von Lebensmitteln auf Getreidebasis
- In Abhängigkeit von Infektion und Pilzisolat resultieren z.B. sehr hohe DON-Gehalte neben sehr niedrigen NIV-Gehalten in derselben Probe (unter 10 µg/kg bis zu 700 mg/kg)

Zielsetzung:

- Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der genannten 8 Trichothecene aus Getreide und Lebensmitteln
- Vermeidung halogenierter Lösungsmittel; Reduktion der Lösungsmittelmengen
- Verwendung eines empfindlichen Ion-Trap-GC/MS-Systems
- hoher Probendurchsatz

Bedingt durch diese Anforderungen war es notwendig geworden, die am Institut für Tierernährung etablierte Methode (Tanaka, modifiziert) nahezu vollständig zu ersetzen.
Nach einer Extraktion der Probe mit einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser erfolgt die Entfernung unpolarer Anteile mit Hexan. Polare Matrixbestandteile werden durch Ausfällen mit Ethylacetat und Festphasenextraktion an Florisil eliminiert. Zur selektiven Entfernung mittelpolarer Probeninhaltsstoffe folgt nun eine Festphasenextraktion an einem Kationentauscher.
Das Eluat wird mit Tri-Fluor-Essigsäureanhydrid derivatisiert, die qualitative und quantitative Bestimmung erfolgt mittels GC/MS über die charakteristischen Molekülfragmente. Zur chemischen Ionisation wird Isobutan als Reaktandgas eingesetzt.

Mit der vorgestellten Methode können acht Trichothecene aus den unterschiedlichsten Matrices bestimmt werden. Die Wiederfindungen liegen im Bereich von 50 bis 1000 µg/kg bei 70 - 120 %. Die Nachweisgrenzen betragen in Abhängigkeit des jeweiligen Toxins 20 - 120 pg absolut. Dies entspricht Gehalten von 2 - 12 µg/kg Getreide.

Untersuchungen zum Verhalten von *Fusarium*-Toxinen während der Mälzung

Michaela Böhm-Schraml[1], Gabriele Engelhardt[2], E. Geiger[1]
[1]Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II, Technische Universität München
85350 Freising - Weihenstephan
[2]Bayerische Landesanstalt für Ernährung, Menzingerstraße 54, 80638 München

Einleitung

Die Infektion von Braugetreide mit Fusarien ist in zweifacher Hinsicht als kritisch einzustufen: Zum einen können Fusarien in Mälzereien und Brauereien durch deutliche Verminderung der Malzqualität sowie evtl. durch auftretendes Gushing, d.h. spontanes Überschäumen von Bier beim Öffnen der Flasche, zu erheblichen finanziellen Schäden führen; zum anderen können sie im Getreide- oder Malzkorn Mykotoxine anreichern.

Bislang sind keine ausreichenden Möglichkeiten vorhanden, eine Fusarieninfektion maßgeblich zu kontrollieren. Deshalb muß untersucht werden, inwieweit im Verlauf der Verarbeitung von Getreide **nach** der Ernte technologisch Einfluß auf den Toxingehalt genommen werden kann.

Wie anhand von Kleinsudversuchen bereits festgestellt wurde, kann eine mit dem Malz eingebrachte Toxinmenge nahezu quantitativ durch den Brauprozeß bis ins Endprodukt Bier gelangen. In weiterführenden Versuchsreihen wurde daher untersucht, wie sich Fusarientoxine während der Malzherstellung verhalten.

Methodik

Verschiedene Gersten- und Weizenmuster wurden vor und nach der Mälzung auf ihren Gehalt an Deoxynivalenol, Nivalenol und Zearalenon mit entsprechenden HPLC- Methoden untersucht. Vermälzt wurden die Proben unter folgenden Bedingungen: 3 Naß-, 2 Trockenweichen, 5 Keimtage und 24 Std Darren; Temperatur: 12 °C bis 18 °C, Wassergehalt 38 % bis 52 %.

Ergebnisse

In einigen Fällen konnten deutliche Zunahmen des Toxingehalts, ausgehend von der Rohware bis zum fertigen Braumalz, beobachtet werden. So wurde z. B. für Zearalenon ein Anstieg der Konzentration bis zu einem Faktor 18 ermittelt; für Deoxynivalenol und Nivalenol wurden Konzentrationszunahmen um das Zwei- bis Dreifache festgestellt.

HPLC-Methoden zur Bestimmung der Fumonisine B_1, B_2 und B_3 in Lebensmitteln mit Vor- oder Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszensdetektion

Claus Reusch und Gerhard Thielert
Chemische Landesuntersuchungsanstalt Sigmaringen, Fidelis-Graf-Straße, 72488 Sigmaringen

Im Rahmen eines Untersuchungs- und Forschungsprojektes "Fumonisine in Lebensmitteln", das vom Ministerium für Umwelt, Baden-Württemberg gefördert wurde, führte die Chemische Landesuntersuchungsanstalt Sigmaringen Untersuchungen von Lebensmitteln auf die Fumonisne B_1, B_2 und B_3 durch. In die Untersuchungen wurden Lebensmittel aus dem Handel einbezogen, um ein möglichst wirklichkeitsgerechtes Bild der Belastung der Lebensmittel und damit des Verbrauchers, dem diese Lebensmittel zum Verzehr zur Verfügung stehen, zu erhalten.

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.

Für die quantitativen Bestimmungen kamen chromatographische Verfahren zum Einsatz. Die Anwendung der Dünnschichtchromatographie (DC) konnte nicht überzeugen, so daß als Methode der Wahl die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Fluoreszenzdetektion angewendet wurde.

In Anlehnung an Sydenham et al. (1) wurde für den Routineeinsatz eine Methode für die HPLC mit Vorsäulenderivatisierung der Fumonisine und Fluoreszenzdetektion erarbeitet.
Eine weitere Möglichkeit der Bestimmung der Fumonisine ergibt sich durch die Trennung der underivatisierten Fumonisine auf der Trennsäule mit Ionenpaarchromatographie und anschließender Derivatisierung der Toxine zu fluoreszierenden Substanzen vor der Fluoreszenzdetektion (Nachsäulenderivatisierung).

Literatur:

Sydenham, E.W., Shephard, G.S. und Thiel, P.G. (1992): Liquid Chromatographic Determination of Fumonisins B1, B2, and B3 in Foods and Feeds. J. AOAC Intern. 75, 313-318.

Verzeichnis der angemeldeten Teilnehmer (Stand 21.05.1997)

Dr. David Abramson, Agriculture and Agri-Food Canada Winnipeg Research Center, 195 Dafoe Road, Winnipeg Manitoba R3T 2M9, Canada
Margit Backes, Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, Adickesallee 40, 60322 Frankfurt/Main
Prof. Dr. Johann Bauer, TU München, Lehrstuhl für Tierhygiene, Hohenbachernstraße 15, 85354 Freising
Dipl.-Ing. Johann Binder, IFA-Tulln, Abt. Umweltbiotechnologie, Konrad-Lorenz-Straße 20, A-3430 Tulln
Dr. J. Böhm, Institut für Ernährung der Veterinärmedizinischen Universität Wien, Johann-Baumanngasse 1, A-1210 Wien
Dr. Michaela Böhm-Schraml, Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II, TU München, 85350 Freising
Dr. Bomberg, Difco Laboratories GmbH, Ulmer Straße 160 a, 86156 Augsburg
Dr. Horst Bresch, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Engesserstraße 20, 76131 Karlsruhe
Karen Brösigke, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Universität München, Veterinärstraße 13, 80539 München
Claus Buck, CLUA Sigmaringen, Fidelis-Graf-Straße 2, 72488 Sigmaringen
Dr. Christine Bürk, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Universität München, Veterinärstraße 13, 80539 München
Dr. B. Clauß, Milupa AG, Schleyerstraße 4, 36041 Fulda-Rodges
Andreas Czwalinna, Hans-Knoll-Institut, Beutenbergstraße 11, 07745 Jena
Dr. Gisela Degen, Institut für Arbeitsphysiologie, Ardeystraße 67, 44139 Dortmund
Yvonne Diehl, Fa. Transia GmbH, Dieselstraße 9A, 61239 Ober-Mörlen
Dr. Richard Dietrich, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Veterinärstraße 13, 80539 München
Prof. Guy Dirheimer, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du C.N.R.S. 15, Rue René Descartes, F - 67084 Strasbourg
Frank Dittmar, Staatliches Medizinal-Lebensmittel- und Untersuchungsamt Nordhessen, Druseltalstraße 67, 34131 Kassel
Prof. Dr. Dr. W. Drochner, Institut für Tierernährung der Universität Hohenheim, Emil-Wolff-Straße 10, 70593 Stuttgart
Dr. S. El-Dessouki, Chemische Landesuntersuchungsanstalt Stuttghart, Schaflandstraße 3, 70736 Fellbach
Dipl.-Chem. Nina Ellend, IFA-Tulln, Analytikzentrum, Konrad-Lorenz-Straße 20, A-3430 Tulln
Frank Ellner, Biologische Bundesanstalt, Institut für Ökologische Chemie, Königin-Luise-Straße 19, 14195 Berlin
Dr. Günter Engel, Bundesanstalt für Milchforschung, Institut für Mikrobiologie, Hermann-Weigmann-Straße 1 24103 Kiel
Dr. Gabriele Engelhardt, Bayerische Landesanstalt für Ernährung, Abt. Ernährung, Menzinger Straße 54, 80638 München
Dr. Steffen Engelhart, Hygiene-Institut der Universität Bonn, Sigmund-Freud-Straße 25, 53105 Bonn
Marina Ewert, Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Thüringen, Tennstedter Straße 9, 99947 Bad Langensalza

Dr. Wolfram Föllmann, Institut für Arbeitsphysiologie, Universität Dortmund, Ardeystraße 67, 44139 Dortmund
Dr. Joel Franco, c/o VICAM L.P., 313 Pleasant Street, Watertown MA 02172/USA
Prof. Dr. H. K. Frank, Hans-Sachs-Straße 3, 76275 Ettlingen
Prof. Dr. Manfred Gareis, Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, Bundesanstalt für Fleischforschung, E.-C.-Baumannstraße 20, 95326 Kulmbach
Dr. R. Geisen, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Engesserstraße 20, 76131 Karlsruhe
Dr. Michael Gekle, Universität Würzburg, Physiologisches Institut, Röntgenring 9, 97070 Würzburg
Thomas Gerstmann, Staatl. Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt, Pappelallee 20, 14469 Potsdam
Dipl.-Biol. Susanne Gilges, Universität Bonn, Hygiene-Institut, Sigmund-Freud-Straße 25, 53105 Bonn
Simone Götz-Schröm, Universität Hohenheim, Institut für Tierernährung, Emil-Wolff-Straße 10, 70599 Stuttgart
Michael Goll, Institut für Tierernährung, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Bundesallee 50, 38116 Braunschweig
Dr. Jan Grajewski, Katedra Biologii i Ochrony Srodowiska, Ul. Chodkiewicza 30, PL - 85-064 Bydgoszcz
Dr. Ebba Griem-Marzahn, Hipp-Werk, Hauptlabor, Münchener Straße 58, 85276 Pfaffenhofen
Kerstin Groß, Knoll AG., Abt. MPS-EBM, Knollstraße 50, 67061 Ludwigshafen
Dr. Sigrid Haas-Lauterbach, R-Biopharm GmbH, Dolivostraße 10, 64293 Darmstadt
Sabine Hauck, Fraunhofer-Institut Festkörpertechnologie, Hansastraße 27 d, 80686 München
Matthias Hennel, Staatl. Lebensmitteluntersuchungsamt Braunschweig, Dresdenstraße 2, 38124 Braunschweig
Dr. Martin Höltershinken, Tierärztliche Hochschule Hannover, Rinderklinik, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover
Dr. Eva Maria Horvath, Firma Biomin, Indutriestraße 21, A-3130 Herzogenburg
Dr. Hans-Ulrich Humpf, Universität Würzburg, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Am Hubland, 97074 Würzburg
Dr. Hans J. Jacobsen, Immunolab GmbH, Lilienthalstraße 25, 34123 Kassel
Dipl.-Chem. Ralf Josephs, IFA-Tulln, Analytikzentrum, Konrad-Lorenz-Straße 20, A-3430 Tulln
Dr. P. Karlovsky, Universität Höhenheim, Otto-Sander-Straße 5, 70599 Stuttgart
Prof. Dr. P. Kielstein, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Naumburger Straße 96a, 07743 Jena
Annett Klatt, Riedel-de Haën AG, LC-Produktentwicklung, Wunstorfer Straße 40, 30926 Seelze
Helmut Kremer, Coring-System Dr. R. Lichtel, Robert-Bunsen-Straße 4, 64579 Gernsheim
Dr. Rudolf Krska, IFA Tulln Alalytikzentrum, Konrad-Lorenz-Straße 20, A-3430 Tulln
Dr. Sabine Kruse, Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, Rochusstraße 1, 53123 Bonn
Carola Kuss, Mälzerei Meußdoerffer GmbH & Co. KG, Wilhelm-Meußdoerffer-Straße 19, 95326 Kulmbach

Dr. Elisabeth Landes, Institut für Tierernährung, Tierärztliche Hochschule Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover
Dr. Eva Lassek, Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern, Veterinärstraße 2, 85762 Oberschleißheim
Dr. Uwe Lauber, Institut für Tierernährung der Universität Hohenheim, Emil-Wolff-Straße 10, 70599 Stuttgart
Nicola Leinwetter, Chemische Landesuntersuchungsanstalt Karlsruhe, Hoffstraße 3, 76133 Karlsruhe
Dr. J. Lepschy, Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Vöttinger Straße 38, 85354 Freising
Dr. Hans Lew, Bundesamt für Agrarbiologie, Wieningerstraße 8, A - 4020 Linz
Dr. Roland Lichtel, CORING-SYSTEM Dr. R. Lichtel, Robert-Bunsen-Straße 4, 84579 Gernsheim
Heike Lingelbach, Zymark GmbH, Black & Decker-Straße 17, 65510 Idstein
Klaus Lobeck, Coring-System Dr. R. Lichtel, Robert-Bunsen-Straße 4, 64579 Gernsheim
Prof. Dr. Klaus Lusky, Institut für Veterinär-Pharmakologie und Toxikologie, Weißenseestraße 36, 16321 Bernau
Prof. Dr. Erwin Märtlbauer, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Universität München, Veterinärstraße 13, 80539 München
Dr. Wolf Martin Maier, Novartis Crop Protection AG., Postfach, CH - 4002 Basel
Paul Majerus, Chemisches Untersuchungsamt Trier, Maximineracht 11a, 54295 Trier
Dr. Hans Marx, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs, Universität München, Veterinärstraße 13, 80539 München
Dr. Gunther Matthiaschk, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Thielallee 88-92, 14195 Berlin
Ute Meister, Institut für Getreideverarbeitung GmbH, Abt. Analytik, A.-Scheunert-Allee 40-41, 14558 Bergholz-Rehbrücke
Prof. Dr. Franz Meußdoerffer, Mälzerei Meußdoerffer GmbH & Co. KG, Wilhelm-Meußdoerffer-Straße 19, 95326 Kulmbach
Dr. Rolf Meyer, LUA für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen, Postfach 200 274, 01192 Dresden
Dr. Evelyn Möller, Universität Hohenheim (350), Fruwirthstraße 21, 70599 Stuttgart
Prof. Dr. H.-M. Müller, Universität Hohenheim, Institut für Tierernährung, Emil-Wolff-Straße 10, 70599 Stuttgart
Sven Mulfinger, Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, TU-München, 85350 Freising-Weihenstephan
Dr. Ludwig Niessen, Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, TU-München, 85350 Freising-Weihenstephan
Sophie Obrecht-Pflumio, Institut de Biologie Moleculaire C.N.R.S., 15, Rue René Descartes, F-67084 Strasbourg
Dr. Stefan Ochs, Seeberger KG, Postfach 3540, 85025 Ulm
Dr. Haydar Özpinar, Universität Höhenheim, Institut für Tierernährung, Emil-Wolff-Straße 10, 70599 Stuttgart
Dr. E. Oldenburg, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Bundesallee 50, 38116 Braunschweig
Dr. Herbert Otteneder, Chemisches Untersuchungsamt Trier, Maximeracht 11a, 54295 Trier

Gerd Peter, Gesamthochschule Kassel, FG Ökologischer Landbau, An der Bohlenbrücke 7, 37213 Witzenhausen
Ing. Marino Petracco, Illycaffè SpA, Via Flavia, 110, I-34147 Trieste
Prof. Dr. Ernst Petzinger, Universität Gießen, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Frankfurter Straße 107, 35392 Giessen
K. Pieczonka, Privatbrauerei Erdinger Weißbräu GmbH, Franz-Brombach-Straße 1, 85435 Erding
Dr. Renate Pusch-Beier, ABC- und Selbstschutzschule, Mühlenweg 12, 87527 Sonthofen
Dr. Annett G. Rehfeldt, Tchibo Frisch-Röst-Kaffee GmbH, Süderstraße 293, 20537 Hamburg
Claus Reusch, CLUA Sigmaringen, Hedingerstraße 2/1, 72488 Sigmaringen
Dr. M. Reutter, Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt Kiel, Gutenbergstraße 75-77, 24116 Kiel
Dr. Wolfgang Richter, Bayerische Landesanstalt für Tierzucht, Prof. Dürrwaechter-Platz 1, 85586 Poing
Dr. Heino Rosner, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Naumburger Straße 96a, 07743 Jena
Dr. Ralf Rotheneder, Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, Bundesanstalt für Fleischforschung, E.-C.-Baumann-Straße 20, 95326 Kulmbach
Dr. Monika Ruhland, Bayerische Landesanstalt für Ernährung, Abt. Ernährung, Menzinger Straße 54, 80638 München
Klaus Ruttmann, Marketing und Vertrieb (VICAM-Vertretung), Rupertistraße 54, 22609 Hamburg
Süleyman Sami, SLT I TECAN Deutschland GmbH., Theodor-Storm-Straße 17, 74564 Crailsheim
Christoph Sauvant, Universität Würzburg, Physiologisches Institut I, Röntgenring 9, 97070 Würzburg
Elke Schaffer, Industriestraße 21, A-3130 Herzogenburg
Dr. Barbara Schalch, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs, Universität München, Veterinärstraße 13, 80539 München
Dr. Gerd Schatzmayr, IFA-Tulln, Abt. Umweltbiotechnologie, Konrad-Lorenz-Straße 20, A-3430 Tulln
Dr. H. Schenkel, Universität Hohenheim, Landesanstalt für Landw. Chemie (710), Emil-Wolff-Straße 14, 70599 Stuttgart
Dr. Rainer Scheuer, Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, Bundesanstalt für Fleischforschung, E.-C.-Baumann-Straße 20, 95326 Kulmbach
Dipl.-Ing. Klaus-Josef Schmerbauch, Institut für Agrartechnik Bornim e.V., Max-Eyth-Allee 100, 14469 Potsdam-Bornim
Dr. Rainer Schmitt, HWS Mycotoxin Research, Saarstraße 52, 55122 Mainz
Dr. Elisabeth Schneider, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Universität München, Veterinärstraße 13, 80539 München
Dr. B. Schöber-Butin, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig
Dr. M. Schollenberger, Institut für Tierernährung, Universität Hohenheim, Emil-Wolff-Straße 10, 70599 Stuttgart
Dipl.-Ing. Agr. Anja Schütze, Institut für Pflanzenkrankheiten, Universität Bonn, Nußallee 9, 53115 Bonn

Dr. M. Schuster, Bayerische Landesanstalt für Tierzucht Grub, Postfach 1180, 85580 Poing
Eberhard Schwedler, Landesveterinäruntersuchungsamt Mecklenburg-Vorpommern, Thierfelder Straße 18, 18059 Rostock
Dr. Gerald Schwerdt, Universität Würzburg, Physiologisches Institut, Röntgenring 9, 97070 Würzburg
Daniela Soprani, R-Biopharm GmbH, Dolivostraße 10, 64293 Darmstadt
Dr. William G. Sorenson, NIOSH/CDC, 1095 Willowdale Road, Morgantown, WV 26505, USA
Dr. J.-B. Speakman, BASF AG, Landw. Versuchsstation APE/FM - Li 470, Postfach 120, 67114 Limburgerhof
Georg Stettner, Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II, TU München, 85350 Freising
S. Stock, Institut für Arbeitsphysiologie der Universität Dortmund, Ardeystraße 67, 44139 Dortmund
Dr. H. Taschan, Staat. Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Mittelhessen, Marburgerstraße 54, 35396 Giessen
Dr. Alfred Thalmann, Staatliche Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt Augustenberg, Postfach 430230, 76217 Karlsruhe
Dr. Gerhard Thielert, Chemische Landesuntersuchungsanstalt, Fidelis-Graf-Straße 1, 72488 Sigmaringen
Dr. Neale Towers, Toxinology and Food Safety Research, Ruakura Agricultural Research Centre, Private Bag 3123, Hamilton, New Zealand
Angelika Tritscher, Nestlé Forschungszentrum, Postfach 44, CH-1000 Lausanne
Dr. Ewald Usleber, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Universität München, Veterinärstraße 13, 80539 München
Dr. Hana Valenta, Institut für Tierernährung, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Bundesallee 50, 38116 Braunschweig
Prof. Dr. Wallnöfer, Bayerische Landesanstalt für Ernährung, Postfach 950140, 81517 München
Dr. Rudolf Weber, BgVV, Thielallee 88-92, 14195 Berlin
Dr. Dieter Wild, Bundesanstalt für Fleischforschung, Institut für Mikrobiologie, E.-C.-Baumann-Straße 20, 95326 Kulmbach
Elisabeth Wöhner, Riedel-de Haën AG, Wunstorfer Straße 40, 30918 Seelze
Katrin Woese, Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Magdeburg, Walloner Berg 2, 39104 Magdeburg
Dr. HannaWolf, Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt, Außenstelle Neubrandenburg, Demminer Straße 46-48, 17034 Neubrandenburg
Dr. Joachim Wolff, Bundesanstalt für Getreide, Kartoffel- und Fettforschung, Institut für Biochemie und Analytik des Getreides, Schützenberg 2, 32756 Detmold
Dr. Otmar Zoller, Bundesamt für Gesundheit, Abt. Lebensmittelwissenschaft, CH-3003 Bern