



LfL

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft

**26. Mykotoxin-Workshop
17. - 19. Mai 2004**

Herrsching am Ammersee

Tagungsband



Schriftenreihe

**3
2004
ISSN 1611-4159**

Impressum

Herausgeber: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL),
Vöttinger Straße 38, 85354 Freising, Internet: <http://www.LfL.bayern.de>

Institut für Tierernährung
Prof.-Dürrwächter-Platz 3 , 85586 Poing

email: Tierernaehrung@LfL.bayern.de

Redaktion: Abteilung Information, Wissensmanagement

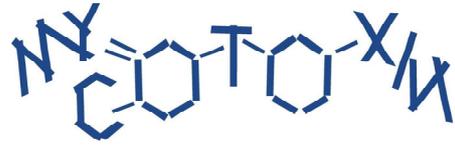
Vöttinger Straße 38, 85354 Freising, email aiw@LfL.bayern.de

1. Auflage Mai 2004

Druck: Direkt Marketing & Digitaldruck, 85356 Freising

© LfL

Die Beiträge in dieser Schriftenreihe geben die Meinung des Autors wieder.



26. Mykotoxin-Workshop

17. – 19. Mai 2004

Bildungsstätte des Bayerischen Bauernverbandes,
Rieder Straße 70, 82211 Herrsching

Programm

Kurzfassungen/Abstracts

Teilnehmerverzeichnis

Organisation:

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
Institut für Tierernährung

&

Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V.

Programm

Vorträge

Montag, 17.05.2004

- 08:00 Registrierung
- 08:45 Begrüßung
PROF. DR. DR. H.C. HANS SCHÖN
Präsident der Landesanstalt für Landwirtschaft
- 09:00 TWARUZEK M, GRAJEWSKI J, GAREIS M, DIETRICH R, MIKLASZEWSKA B,
KUZMINSKA K (Bydgoszcz):
Toxicity screening of materials and air quality from fungi contaminated dwellings
- 09:20 LAUBER U (Fellbach):
„Probenahme, Messunsicherheit und Wiederfindungsrate“ – die wirklichen Probleme in der Mykotoxinanalytik?
- 09:40 JOSEPHS RD (Mol):
Interlaboratory study for the certification of reference materials for aflatoxin M₁ in milk powders
- 10:00 BRODACZ W (Linz):
Auswahl von GC-Phasen und Optimierung von Trichothecen-Trennungen mittels Computersimulation
- 10:20 *Kaffeepause*
- 10:40 BISELLI S, HARTIG L (Hamburg):
Fusarientoxine in Getreide, Getreideprodukten und Futtermitteln – Ein Multianalyseverfahren unter Verwendung der LC/MS/MS –
- 11:00 SCHUHMACHER R, BERTHILLER F, BUTTINGER G, KRŠKA R (Tulln):
Quantitative Bestimmung von A-Trichothecenen, B-Trichothecenen und Zearaleon in Getreide mittels LC/MS/MS
- 11:20 ADAM G, BERTHILLER F, POPPENBERGER B, LUCYSHYN D, SCHUHMACHER R, KRŠKA R (Wien):
Identifizierung von DON- und ZON-Glucosyltransferase-Genen von *Arabidopsis thaliana* und deren heterologe Expression zur Herstellung von Mykotoxin-Glucosid Referenzsubstanzen
- 11:40 WOLF H, SCHWEDLER E, STEINBACH P (Neubrandenburg):
5 Jahre Fusarien- und Mykotoxinmonitoring in Mecklenburg-Vorpommern – ein Nutzen für die Praxis ?
- 12:00 *Mittagspause*

- 13:00 OTTENEDER H, MAJERUS P (Trier):
Qualitätsmanagement in der Mykotoxinanalytik
- 13:20 OLDENBURG E, ELLNER F (Braunschweig):
Fusarientoxine in Silomais – Analytik und Bewertung
- 13:40 ÖHLINGER R (Linz):
Zur Mykotoxinsituation bei Getreide und Futtermitteln in Österreich
- 14:00 MÜLLER M, BEHRENDT U (Paulinenaue):
Vorkommen von Mykotoxinen und Endotoxinen im extensiv genutzten Grünland
und auf der Winterweide
- 14:20 CURTUI V, BROCKMEYER A, DIETRICH R, KAPPENSTEIN O, KLAFFKE H, LEPSCHY
J, MÄRTLBAUER E, SCHNEIDER E, SEIDLER C, THIELERT G, USLEBER E, WEBER R,
WOLFF J (Gießen):
Deoxynivalenol in Lebensmitteln
- 14:40 KAPPENSTEIN O, BROCKMEYER A, DIETRICH R, CURTUI V, KLAFFKE H, LEPSCHY
J, MÄRTLBAUER E, SCHNEIDER E, SEIDLER C, THIELERT G, USLEBER E, WEBER R,
WOLFF J (Gießen):
Zearalenon in Lebensmitteln

15:00 – 18:00 Kaffeepause – Posterpräsentation / Industrieausstellung

19:00 *Abfahrt zum gemeinsamen Abendessen im Klostergasthof von Andechs*

VERLEIHUNG DES BRIGITTE GEDEK WISSENSCHAFTSPREISES

Dienstag, 18.05.2004

- 08:30 VOGELGSANG S, HECKER A, FORRER HR (Zürich):
Fusarium Head Blight and Mycotoxin Contamination of Wheat:
Cropping System, Disease Assessment and Possible Control Strategies
- 08:50 ELLNER, FM (Berlin):
Ergebnisse mehrjähriger Feldversuche zur Wirkung Strobilurin-haltiger Fungizide auf die Mykotoxin-Bildung in unterschiedlichen Weizensorten
- 09:10 BRETZM, GÖCKLER S, HUMPF HU (Münster):
Structural elucidation and analysis of thermal degradation products of *Fusarium* mycotoxins
- 09:30 WOLFF J (Detmold):
Untersuchung der Gehaltsveränderungen der Fusariumtoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA) durch Be- und Verarbeitungsprozesse in Getreide und Getreideprodukten
- 10:00 BUTTINGER G, KNAPP H, FUCHS E, BINDER E-M, KRŠKA R:
A new method for Ochratoxin A determination in various matrices by HPLC-FLD
- 10:20 *Kaffeepause*
- 10:40 GUTZWILLER A, CZEGLÉDI L, STOLL P, BRUCKNER L (Posieux):
Apple pomace possibly alleviates the growth depressing effect of DON in piglets
- 11:00 SPRING P, STRICKLER B (Zollikofen):
Effect of Bedding with Mycotoxin Contaminated Straw and low Levels of Dietary Mycotoxin on Piglet Performance
- 11:20 GOYARTS T, DÄNICKE S (Braunschweig):
On the effects of a chronic deoxynivalenol (DON) intoxication on performance of pigs when feed is offered for *ad libitum* consumption or fed restrictive
- 11:40 REISCHAUER A, DÖLL S, ELLENBERGER CH, DÄNICKE S, SCHNURRBUSCH U, SCHOON HA (Leipzig):
Funktionelle Pathologie des weiblichen Genitale beim praematuren Schwein nach definierter Zearalenon-Belastung
- 12:00 MATTHÄUS K, DÄNICKE S, LEBZIEN P, VALENTA H, UEBERSCHÄR KH, FLACHOWSKY G (Braunschweig):
Einfluss eines Fusarium-kontaminierten Weizens und des Futteraufnahmeniveaus auf die Pansenfermentation und den Toxinsatz bei Kühen
- 12:20 *Mittagspause*

13:20 ELSINGER M (München):
Mykotoxine - Aktuelle Situation im Futtermittelrecht

13:40 GAREIS M (Kulmbach):
Mykotoxine und Verbraucherschutz

14:00 Mitgliederversammlung der Gesellschaft für Mykotoxinforschung

16:30 Abfahrt zur Residenz in München

18:15 Besichtigung der Residenz

**19:00 *Staatsempfang des Bayerischen Staatsministers
für Landwirtschaft und Forsten Josef Miller
im Vierschimmelsaal der Residenz in München***

Mittwoch, 19.05.2004

- 08:30 BLANK R, WOLFFRAM S (Kiel):
Zum Einfluss einer Natriumhydrogencarbonat-Zulage auf die Toxikokinetik von Ochratoxin A beim Schwein
- 08:50 DEGEN G, LEBRUN S, LEKTARAU Y, FÖLLMANN W (Dortmund):
Modulation of Ochratoxin A-induced DNA damage in urothelial cell cultures
- 09:10 OSTRY V, MALIR F, ROUBALT, SKARKOVA J, RUPRICH J, CERNA M, CREPPY EE (Brno):
Monitoring of mycotoxins biomarkers in the Czech Republic

9:30 – 11:00 Kaffeepause – Posterpräsentation / Industrieausstellung

- 11:00 SCHMIDT H, NIESSEN L, VOGEL RF (Freising):
Molekulare Diagnose ochratoxinogener *Aspergillus*-Arten
- 11:20 NIESSEN L, SCHMIDT H, VOGEL RF (Freising):
PCR-Based Diagnosis of Trichothecene Producers in the *Fusarium*-Section Sporotrichiella
- 11:40 GAREISM (Kulmbach):
Bildung von Mykotoxinen in Guttationströpfchen
- 12:00 Verabschiedung, Schlussworte

Ende der Veranstaltung, ca. 12:20 Uhr

Inhaltsverzeichnis

Vorträge

Twaruzek M, Grajewski J, Gareis M, Dietrich R, Miklaszewska B, Kuzminska K (Bydgoszcz): Toxicity screening of materials and air quality from fungi contaminated dwellings	15
Lauber U (Fellbach): „Probenahme, Messunsicherheit und Wiederfindungsrate“ – die wirklichen Probleme in der Mykotoxinanalytik?	16
Josephs RD (Mol): Interlaboratory study for the certification of reference materials for aflatoxin M ₁ in milk powders.....	17
Brodacz W (Linz): Auswahl von GC-Phasen und Optimierung von Trichothecen-Trennungen mittels Computersimulation	18
Biselli S, Hartig L (Hamburg): Fusarientoxine in Getreide, Getreideprodukten und Futtermitteln – Ein Multianalyseverfahren unter Verwendung der LC/MS/MS.....	19
Schuhmacher R, BERTHILLER F, BUTTINGER G, KRŠKA R (Tulln): Quantitative Bestimmung von A-Trichothecenen, B-Trichothecenen und Zearalenon in Getreide mittels LC/MS/MS.....	20
Adam G, Berthiller F, Poppenberger B, Lucyshyn D, Schuhmacher R, Krška R (Wien): Identifizierung von DON- und ZON-Glucosyltransferase-Genen von <i>Arabidopsis thaliana</i> und deren heterologe Expression zur Herstellung von Mykotoxin-Glucosid Referenzsubstanzen.....	21
Wolf H, Schwedler E, Steinbach P (Neubrandenburg): 5 Jahre Fusarien- und Mykotoxinmonitoring in Mecklenburg-Vorpommern – ein Nutzen für die Praxis ?	22
Otteneder H, Majerus P (Trier): Qualitätsmanagement in der Mykotoxinanalytik.....	23
Oldenburg E, Ellner F (Braunschweig): Fusarientoxine in Silomais – Analytik und Bewertung.....	24
Öhlinger R (Linz): Zur Mykotoxinsituation bei Getreide und Futtermitteln in Österreich	25
Müller M, Behrendt U (Paulinenaue): Vorkommen von Mykotoxinen und Endotoxinen im extensiv genutzten Grünland und auf der Winterweide	26
Curtui V, Brockmeyer A, Dietrich R, Kappenstein O, Klaffke H, Lepschy J, Märtlbauer E, Schneider E, Seidler C, Thielert G, Usleber E, Weber R, Wolff J (Gießen): Deoxynivalenol in Lebensmitteln	27
Kappenstein O, Brockmeyer A, Dietrich R, Curtui V, Klaffke H, Lepschy J, Märtlbauer E, Schneider E, Seidler C, Thielert G, Usleber E, Weber R, Wolff J (Gießen): Zearalenon in Lebensmitteln.....	28
Vogelsgang S, Hecker A, Forrer HR (Zürich): Fusarium Head Blight and Mycotoxin Contamination of Wheat: Cropping System, Disease Assessment and Possible Control Strategies	29
Ellner, FM (Berlin): Ergebnisse mehrjähriger Feldversuche zur Wirkung Strobilurin-haltiger Fungizide auf die Mykotoxin-Bildung in unterschiedlichen Weizensorten.....	30

Bretz M, Göckler S, Humpf HU (Münster): Structural elucidation and analysis of thermal degradation products of <i>Fusarium</i> mycotoxins	31
Wolff J (Detmold): Untersuchung der Gehaltsveränderungen der Fusariumtoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA) durch Be- und Verarbeitungsprozesse in Getreide und Getreideprodukten	32
Buttinger G, Knapp H, Fuchs E, Binder E-M, Krska R: A new method for Ochratoxin A determination in various matrices by HPLC-FLD	33
Gutzwiller A, Czeglédi L, Stoll P, Bruckner L (Posieux): Apple pomace possibly alleviates the growth depressing effect of DON in piglets	34
Spring P, Strickler B (Zollikofen): Effect of Bedding with Mycotoxin Contaminated Straw and low Levels of Dietary Mycotoxin on Piglet Performance	35
Goyarts T, Dänicke S (Braunschweig): On the effects of a chronic deoxynivalenol (DON) intoxication on performance of pigs when feed is offered for <i>ad libitum</i> consumption or fed restrictive	36
Reischauer A, Döll S, Dänicke S, Ellenberger Ch, Schnurrbusch U, Schoon HA (Leipzig): Funktionelle Pathologie des weiblichen Genitale beim praematuren Schwein nach definierter Zearalenon-Belastung	37
Matthäus K, Dänicke S, Lebzien P, Valenta H, Ueberschär KH, Flachowsky G (Braunschweig): Einfluss eines Fusarium-kontaminierten Weizens und des Futteraufnahmeniveaus auf die Pansenfermentation und den Toxinumsatz bei Kühen	38
Elsinger M (München): Mykotoxine - Aktuelle Situation im Futtermittelrecht	39
Gareis M (Kulmbach): Mykotoxine und Verbraucherschutz	40
Blank R, Wolfram S (Kiel): Zum Einfluss einer Natriumhydrogencarbonat-Zulage auf die Toxikokinetik von Ochratoxin A beim Schwein	41
Degen G, Lebrun S, Lektarau Y, Föllmann W (Dortmund): Modulation of Ochratoxin A-induced DNA damage in urothelial cell cultures	42
Ostry V, Malir F, Roubal T, Skarkova J, Ruprich J, Cerna M, Creppy EE (Brno): Monitoring of mycotoxins biomarkers in the Czech Republic	43
Schmidt H, Niessen L, Vogel RF (Freising): Molekulare Diagnose ochratoxino gener <i>Aspergillus</i> -Arten	44
Niessen L, Schmidt H, Vogel RF (Freising): PCR-Based Diagnosis of Trichothecene Producers in the <i>Fusarium</i> -Section Sporotrichiella	45
Gareis M (Kulmbach): Bildung von Mykotoxinen in Guttationströpfchen	46

Poster

1 AL-Anati, Petzinger E (Giessen): Interference of Arachidonic acid and its Metabolites in TNF- α Release by Ochratoxin A from Rat Liver	48
2 Bauer J, Meyer K, Neubauer K, Polster J, Feucht W (Freising): Hemmung der aflatoxininduzierten Mikronucleusbildung in V79 Zellen durch monomere Catechine.....	49
3 Birzele B, Prange A. (Bonn): Cleaver seeds and their possible impact on Fusarium infection and mycotoxin contamination of wheat	50
4 Bockhorn I, Drinda H (Berlin): Untersuchung von Mutterkornalkaloiden mit LC-MS/MS in Getreideprodukten des Handels.....	51
5 Böhm J, Razzazi E, Zentek J, Wiedner G (Wien): Das Vorkommen der Fusarien-toxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) in österreichischen Futtermitteln der Ernte 2002.....	52
6 Brinkmeyer U, Dänicke S, Lehmann M, Valenta H, Lebzien P, Flachowsky G (Braunschweig): Zum Einfluss einer Inokulation von Weizen mit <i>Fusarium culmorum</i> auf den ruminalen Trockensubstanzabbau von Stroh und Kaff.....	53
7 Brinkmeyer U, Dänicke S, Valenta H, Flachowsky G (Braunschweig): Verlauf der Deoxynivalenol- und Zearalenon-Konzentrationen in Stroh von mit <i>Fusarium culmorum</i> inokuliertem Weizen	54
8 Curtui V, Seidler C, Schneider E, Usleber E (Gießen): Bestimmung von Deoxynivalenol und Deepoxy-Deoxynivalenol in Milch.....	55
9 Dall Asta C, Berhiller F, Schuhmacher R, Adam G, Lemmens M, Krska R (Tulln): DON-Glycosides: Characterisation of synthesis products and their occurrence in DON-inoculated wheat samples.....	56
10 Dancea Z, Baba A I, Macri A, Drochner W, Schollenberger M, Morar M V, Catoi C (Cluj-Napoca): Untersuchungen zum Einfluß von natürlich mit Mykotoxinen kontaminiertem Mais bei Broilern.....	57
11 Dänicke S, Döll S, Valenta H, Flachowsky G (Braunschweig): On the effects of supplementing a deoxynivalenol (DON) contaminated piglet diet with a probiotic feed additive on performance of piglets	58
12 Dänicke S, Valenta H, Gareis M, Lucht H W, Graf von Reichenbach H (Braunschweig): Hydrothermal treatment of deoxynivalenol (DON) contaminated wheat and its effects on piglets	59
13 Devegowda G, Girish C K (Bangalore): Efficacy of modified glucomannan (Mycosorb [®]) and HSCAS to alleviate the individual and combined toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens.....	60
14 Drochner W, Götz S, Schollenberger M, Lauber U, Piepho H-P (Stuttgart): Untersuchungen zum Intermediärstoffwechsel nach Gabe mäßiger DON-Dosierungen am wachsenden Schwein	61
15 Färber P, Herrmann A, Geisen R (Karlsruhe): Untersuchung der Ochratoxin A Biosynthese durch <i>A. ochraceus</i> beim Wachstum auf Kaffee.....	62
16 Faulk K, Böhm J, Razzazi E (Wien): Vitaminbestimmungen in Geweben von DON-gefütterten Broilern.....	63

17 Fog Nielsen K, Larsen T O (Lyngby): LC-UV-high resolution orthogonal time of flight mass spectrometry for screening of > 500 mycotoxins and fungal metabolites	64
18 Föllmann W, Lebrun S (Dortmund): Effects of co-incubation of bile acids and methotrexate on ochratoxin A.-induced DNA damage in vitro.....	65
19 Geisen R, Karolewicz A, Bogs C, Färber P (Karlsruhe): Genetische Grundlagen der OTA Bildung in Penicillien	66
20 Grajewski J, Potkanski A, Raczkowska-Werwinska K, Twaruzek M, (Bydgoszcz): Moulds and mycotoxins in ensiled maize with biological and chemical additives.....	67
21 Hanschmann G, Krieg D (Leipzig): Grundfutterqualität in Sachsen: Ergebnisse der mykotoxikologischen Untersuchungen an Silomais der Jahre 1998-2003.....	68
22 Hartung H, Kinast C, Kirchheim U, Eckert G, Meixner B, Schöne F (Jena): Deoxynivalenol (DON) in Thüringer Brot und feinen Backwaren - Erste Untersuchungsergebnisse aus den Jahren 2001 bis 2003.....	69
23 Häuser-Hahn I., Suty-Heinze A., Dutzmann St. (Monheim): Fusarium Head Blight: A Strength of Prothioconazole	70
24 Hennel M, Beinling B, Eppert D, Meyer D, Schöning G (Braunschweig): Ochratoxin A in getrockneten Weinbeeren	71
25 Hinkel C, Kölling-Speer I, Speer K (Dresden): Anwendung der automatisierten Festphasenextraktion bei der Bestimmung von Ochratoxin A	72
26 Kappenstein O, Klaffke H St, Weber R, Tiebach R (Berlin): Bestimmung von Zearalenon in Speiseölen mit GPC und LC-ESI-MS/MS.....	73
27 Klötzl M, Schmidt S, Lauber U, Thielert G, Humpf H-U (Fellbach): Vergleich verschiedener clean-up-Verfahren bei der Analytik von DON.....	74
28 Köller G, Rolle-Kampczyk U, Popp P, Herbarth O (Leipzig): Bestimmung von Ochratoxin A, Citrinin und Patulin in Hausstaub.....	75
29 Korn U, Müller M, Behrendt U, Gossmann M, Ditz M. (Paulinenaue): Nachweis von Fusarien und deren Mykotoxinen in Futterkonservaten aus Grünlandbeständen mit differenzierter Bewirtschaftungsintensität.....	76
30 Lang Ch, Sipos W, Schuh M, Schmoll F. (Wien): Untersuchung österreichischer Futtermittel der Erntejahre 2002 und 2003 auf die Fusarientoxine Desoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON).....	77
31 Larsen T O, Fog Nielsen K (Lyngby): An integrated approach for the detection and analysis of mycotoxins.....	78
32 Lepschy v. Gleisenthall J (Freising): Vergleich verschiedener DON-Standards	79
33 Macri A, Schollenberger M, Morar M V, Drochner W (Cluj-Napoca): Zum Zearalenonabbau in Pansensaft; "In-Vitro-Untersuchungen" nach dem HFT-Verfahren	80
34 Mainka S, Dänicke S, Ueberschär K-H, Graf v. Reichenbach H, Flachowsky G. (Braunschweig): Zum Einfluß einer hydrothermischen Behandlung auf den Ergotalkaloidgehalt von mutterkornbelastetem Roggen	81
35 Masloff S, Wolff J (Detmold): DON- und ZEA-Gehalte in Weizen, Roggen und Gerste-Ergebnissen aus der Besonderen Erntermittlung 2003	82

36 Meyer K, Motawee M M, Bauer J (Freising): Vorkommen von Aflatoxin M ₁ in Milch und Molkereiprodukten aus Ägypten.....	83
37 Nitsch S, Fuchs E, Binder E-M, Schatzmayr G (St. Pölten): Effects on performance parameters of weaning piglets fed a diet containing Ochratoxin A	84
38 Ostry V, Skarkova J, Nedelnik J, Ruprich J, Moravcova H (Brno): Occurrence of <i>Alternaria</i> and <i>Fusarium</i> mycotoxins in winter wheat from domestic crop in year 2003	85
39 Ostry V, Skarkova J, Prochazkova I, Ruprich J (Brno): The system approach to the identification of toxigenic microfungi in foodstuffs.....	86
40 Ostry V, Skarkova J, Ruprich J (Brno): Occurrence of <i>alternaria</i> mycotoxins and <i>Alternaria</i> spp. in lentils and human health	87
41 Parich A, Krska R (Tulln): DON Calibrant: Towards the production of certified B-trichothecene calibrants	88
42 Prange A, Birzele B, Köhler P, Modrow H (Bonn): Influence of mycotoxin producing fungi on sulfur speciation in LMW subunits of glutenin in different suboptimally stored wheat samples.....	89
43 Rohde S, Rabenstein F (Aschersleben): Standardisierung eines indirekten PTA-ELISA zum Nachweis von <i>Fusarium</i> ssp. in infizierten Getreidekörnern.....	90
44 Rolle-Kampczyk U, Köller G, Popp P, Herbarth O (Leipzig): Bestimmung von Ochratoxin A in kleinvolumigen Serumproben.....	91
45 Santin E, Maiorka A, Fischer da Silva A V, Alfaro D, Schmidt-Popazoglo E M S, Paulillo A C (Curitiba): Interference of Mycotoxins on immune response to coccidiosis Vaccine	92
46 Schollenberger M, Müller H-M, Drochner W (Stuttgart): Fusarientoxingehalte in Mais und Produkten auf Maisbasis.....	93
47 Schumacher D, Wagner J, Lehmann L, Metzler M (Karlsruhe): Influence of reduced cellular glutathione level on the mutagenicity of patulin in cultured mouse lymphoma cells.....	94
48 Songsermsakul P, Böhm J, Razzazi E, Zentek J (Wien): Occurrence of Deoxynivalenol (DON) and Ochratoxin (OTA) in dog foods.....	95
49 Theisen S, Berger S, (Freising): Screening von Epoxidhydrolase-bildenden Mikroorganismen auf Deoxynivalenol-Transformation	96
50 Toepfer I, Petersen K (Oldenburg): Mykotoxine in Innenräumen - Nachweis im Staub	97
51 Valenta H, Dänicke S (Braunschweig): Gibt es einen Carry-over von Deoxynivalenol in Hühnereier?.....	98

Vorträge

Toxicity screening of materials and air quality from fungi contaminated dwellings

Magdalena Twarużek¹, Jan Grajewski¹, Manfred Gareis², Richard Dietrich³,
Beata Miklaszewska¹, Katarzyna Kuźmińska¹

¹ Bydgoszcz University of Kazimierz Wielki, Institute of Biology and Environmental Protection, Chodkiwicza Street 30, PL-85-064 Bydgoszcz

² Institute for Microbiology and Toxicology, Federal Research Center for Food and Nutrition, E.-C. Baumann Str. 20, D-95326 Kulmbach

³ Ludwig-Maximilians-University, Institute for Hygiene and Technology of food of Animal Origin, Schönleutner Str. 8, D-85764 Oberschleißheim

A field investigation in Poland, following a severe period of flooding was carried out in 2002. For that purpose moulded samples of building materials and corresponding controls were taken from dwelling pavilions and houses from the post-flooded areas of cities/towns of southern (Zembrzyce, Budzów, Baczyn, Maków Podhalański) and northern (Gdańsk) Poland.

Mycological analyses of these samples revealed a high contamination with different fungi of the genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Stachybotrys*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Trichoderma*, *Ulocladium*, which were known to occur in water-damaged building materials.

A vast number of samples taken from the walls (wallpaper and plaster) were extracted and the crude extracts tested in the MTT-cell culture bioassay with swine kidney target cells. In parallel, extracts were analyzed by an enzyme immune assay (EIA) for occurrence of macrocyclic trichothecenes produced by toxigenic *Stachybotrys chartarum* isolates.

Different levels of cytotoxicity were detected in samples visibly contaminated with moulds, indicating the presence of cytotoxic mycotoxins in these particular samples. The results of the cytotoxicity testing correlated with the findings of the EIA and demonstrated the presence of macrocyclic trichothecenes in moulded samples from the post-flooded areas.

The data and results of this Polish field investigation, carried out in cooperation with German research facilities will be presented and discussed.

* Parts of the experimental work were carried out in context of the Munich Mycotoxin Scholarship 2002/2003 awarded to M.Twarużek.

Probenahme, Messunsicherheit und Wiederfindungsrate – die wirklichen Probleme in der Mykotoxinanalytik?

U. Lauber

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, Schaflandstr. 3/2, 70376 Fellbach

Für sämtliche im Rahmen der EU-Kontaminanten-Verordnung reglementierten Mykotoxine existieren zwischenzeitlich komplexe Richtlinien mit Ausführungsbestimmungen zur Probenahme (in Abhängigkeit von Toxin und Matrix) sowie Anforderungen an die jeweiligen Analyseverfahren (u. a. Reproduzierbarkeit, Wiederfindungsraten, usw.).

Im Rahmen dieser Richtlinien werden u.a. die ausschließlich für die amtliche Lebensmittelüberwachung gültigen Anforderungen an eine „repräsentative“ Probenahme definiert.

Die Möglichkeiten und Grenzen bei der Umsetzung der theoretischen Vorgaben in der Praxis werden im Rahmen des Vortrages dargestellt (u.a. Ort der Probenahme, Problematik Gegenprobe, Einfluss der Probenahme auf das Analyseergebnis, usw.).

Nach den o.g. Richtlinien ist vor einer rechtlichen Beurteilung der Mykotoxingehalte der Analysenwert um die erweiterte Messunsicherheit **und** die Wiederfindungsrate zu korrigieren. Hierdurch soll laut EU zukünftig eine „Harmonisierung“ der von den einzelnen Mitgliedsstaaten übermittelten Mykotoxingehalte sichergestellt werden.

In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass seitens der EU keinerlei Vorgaben existieren nach welchem Verfahren die Messunsicherheit und Wiederfindungsrate zu bestimmen ist. So kann die Messunsicherheit beispielsweise aus Ringversuchsdaten, Validierungsversuchen oder durch Mehrfachbestimmung der aktuellen Probe nach unterschiedlichen Berechnungsverfahren ermittelt werden. Auch die Wiederfindungsrate kann aus Kenndaten der Methode (ermittelt im Rahmen von Validierungsversuchen) oder aber z.B. durch Dotierung der aktuellen Probe (native Probe, Extraktionsmittel, Extrakt) bestimmt werden. Hierbei ist grundsätzlich zu berücksichtigen, dass eine natürliche Kontamination einer Probe durch keine Art einer künstlichen Dotierung umfassend simuliert werden kann.

In jedem Fall resultieren in Abhängigkeit des angewandten Verfahrens unterschiedliche Gehalte, wodurch eine „Harmonisierung“ der Mykotoxinergebnisse in den unterschiedlichen Mitgliedsstaaten in Frage gestellt werden muss.

Insbesondere die Berücksichtigung der Wiederfindungsrate (nicht deren Bestimmung und Angabe) wurde daher von sämtlichen deutschen Fachgremien abgelehnt. Da die anderen Mitgliedsstaaten diesbezüglich jedoch keine Bedenken äußerten wurden die Richtlinien entsprechend (d.h. die Berücksichtigung der Wiederfindungsrate wird verbindlich vorgeschrieben) verabschiedet.

Neben den unterschiedlichen Anforderungen an die amtliche Lebensmittelüberwachung im Vergleich zum privatwirtschaftlichen Laboratorium wird anhand von Praxisbeispielen die Problematik einer Beurteilung von Mykotoxingehalten (im Bereich der jeweiligen Grenzwerte) nach den o.g. Vorgaben dargestellt.

Interlaboratory study for the certification of reference materials for aflatoxin M₁ in milk powders

R. D. Josephs

European Commission – Joint Research Centre
Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)
Reference Materials Unit
Retieseweg 111, B - 2440 Geel
<http://www.irmm.jrc.be>

Aflatoxin M₁ (AfM₁) is a hydroxylated derivative of the mycotoxin Aflatoxin B₁ (AfB₁), which is formed and excreted in the milk of lactating animals after the ingestion of AfB₁ contaminated feed. The frequent occurrence of AfM₁ in milk and products thereof, the high consumption of these products and the high risk associated herewith led to the establishment of measures to control the AfM₁ contamination. The importance of AfM₁ as a food safety hazard is reflected in the existence of regulations controlling the maximum limits for AfM₁ at national and European Commission (EC) level.

Analytical difficulty and economic importance of controlling AfM₁ levels led the EC to fund projects on the production of certified reference materials (CRMs) for AfM₁¹⁾. Because of the good acceptance of these CRMs and the ability to ensure comparability and traceability further on it was required to prepare and certify three new materials for AfM₁ in milk powder.

In the frame of this project twelve expert laboratories from seven European countries participated in the interlaboratory study with the aim to characterise and certify the new reference materials. Four different types of materials were distributed. The participants received a standard solution (9.93 µg/mL AfM₁ in chloroform), blank milk powder (BCR-282R) and two naturally contaminated milk powder materials with different mass fractions of AfM₁ (BCR-283R and -284R). For the determination of AfM₁ in milk powder the participants mainly employed slightly modified methods based on standards EN ISO 14501:1999 or IDF 171:1995. The methods are carried out by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) followed by fluorescence detection (FLD) subsequent to an immunoaffinity column (IAC) clean-up.

Means of laboratory means of 0.111 and 0.442 µg/kg were obtained for AfM₁ in the milk powders BCR-283R and -284R, respectively. BCR-282R was found to contain less than 0.02 µg/kg AfM₁. The relative standard deviations between laboratory mean results were 5.9 and 4.8 % for BCR-283R and -284R, respectively. Average recoveries of the reported results ranged from 72.1 to 98.4 %.

¹⁾ Van Egmond HP, Wagstaffe PJ (1992) The certification of aflatoxin M₁ in 4 milk powder samples, BCR-282, -283, -284, and -285, BCR Information, EUR 10312 EN, Brussels

Auswahl von GC-Phasen und Optimierung von Trichothecen-Trennungen mittels Computersimulation

Wolfgang Brodacz

Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Kompetenzzentrum Cluster-Chemie Linz, Wieningerstraße 8, A-4021 Linz

Die Gaschromatographie vereint hohe Trennleistung mit empfindlicher Detektion (ECD) und wird daher in der Trichothecen-Analytik für Multitoxin-Bestimmungen eingesetzt. Dabei müssen die silylierten B-Trichothecene Deoxynivalenol, Nivalenol, Fusarenon X, 3-Acetyldoxynivalenol und 15-Acetyldoxynivalenol, beziehungsweise die mit HFBI derivatisierten A-Trichothecene T-2 Toxin, HT-2 Toxin, 15-Monoacetoxyscirpenol und Diacetoxyscirpenol vollständig aufgetrennt werden. Beim Einsatz der GC-Simulation mit thermodynamischen Retentionsindizes (TRI) können für einen bestimmten Phasentyp alle relevanten Trennparameter (Temperaturprogramm, Säulendimension und Pneumatik) computergestützt optimiert werden. Nach Simulation von Millionen von Parameterkombinationen mit dem gängigsten unpolaren Phasentyp Methyl-Polysiloxan (MPS) mit 5% Phenylanteil lassen sich jene Bedingungen selektieren, welche maximale Auftrennung bei minimaler Analysenzeit erlauben. Für die Auswahl polarerer Typen zur Verifizierung kommen grundsätzlich MPS-Phasen, die mit Phenyl- bzw. Cyanopropyl-Gruppen modifiziert sind, für die Trichothecen-Analytik in Frage. Neben der Erhöhung des Phenylanteils auf 35% stehen noch die Phasentypen 1301 und 1701 zur Verfügung, die Anteile von 6 bzw. 14% an Cyanopropyl/Phenyl-Substituenten enthalten. Mit diesen polareren Phasen werden - in Analogie zur unpolaren Variante - für alle Zielanalyten die jeweiligen TRIs berechnet und nach Trichothecen-Typ getrennt jeweils umfangreiche Trennungsoptimierungen (mehrere Millionen Varianten) durchgeführt. Letztlich stehen sowohl für die A- als auch für die B-Trichothecene die jeweils optimierten Trennbedingungen für alle 4 Phasentypen zur Verfügung. Aus diesen Daten erfolgt abschließend die Auswahl der zwei am besten geeigneten und sich komplementär ergänzenden Trennsysteme. Die Hauptkriterien für die Auswahl als Absicherungskombination sind die jeweils vollständige Auftrennung aller Zielanalyten sowie möglichst unterschiedliche Elutionsmuster.

Die besten Ergebnisse werden bei der Kombination von Methyl-Polysiloxan-Säulen mit 5 % u. 35 % Phenylanteil erzielt. Beide Phasen können jeweils alle Analyten gut separieren und die optimierten Trennungen weisen erhebliche Unterschiede bei den Elutionsreihenfolgen auf. Mit der Computersimulation ist es auch möglich die Trennbedingungen der polaren Säule so zu optimieren, dass sowohl die 4 A-Trichothecene als auch die 5 B-Trichothecene gemeinsam silyliert in einem GC-Lauf aufgelöst werden. Durch die Verwendung der Referenzsubstanz Mirex zur Retentionszeit-Feinanpassung wird die Peakzuordnung abgesichert und das gesamte chromatographische System inklusive Detektor bei jedem Lauf auf Reproduzierbarkeit überprüft. Obwohl es technische möglich ist, beide Säulen in einem GC an einem Injektor angeschlossen mit zwei ECDs zu betreiben, muss der Variante mit zwei GCs der Vorzug gegeben werden. Nur so kann kompromisslos das jeweils optimale Temperaturprogramm eingesetzt und die geeignetsten Säulendimensionen verwendet werden. Dies gewährleistet auch zwei unabhängige Injektionen, wodurch eventuell auftretende Probleme bei der Probenaufgabe (sogen. Matrixerhöhung) sofort erkannt werden können.

Der parallele Einsatz von zwei GCs mit unterschiedlich polaren Kapillarsäulen und computergestützt optimierten Trennparametern gewährleistet neben höchster Identifizierungssicherheit auch eine Absicherung der Quantifizierung.

Fusarientoxine in Getreide, Getreideprodukten und Futtermitteln - Ein Multianalyseverfahren unter Verwendung der LC/MS/MS –

Scarlett Biselli, Lutz Hartig

Eurofins Wiertz-Eggert-Jörissen, Stenzelring 14b, D-21107 Hamburg

Die Änderung der Mykotoxin Höchstmengen Verordnung (Deutschland) im Februar 2004 legt für Getreideprodukte nun neben der bisher notwendigen Kontrolle auf Aflatoxine und Ochratoxin A ebenfalls Höchstmengen für die Gruppe an *Fusariumtoxinen* fest. Basierend auf diesen Werten müssen zukünftig vermehrt Lebensmittel und Futtermittel auf Mykotoxine kontrolliert werden. Hier bietet es sich an herkömmliche Analysenverfahren für die Nahrungsmittelkontrolle, die bisher für Einzelstoffbestimmungen optimiert sind, durch Multianalyseverfahren zu ergänzen.

Für die quantitative Analyse von verschiedenen *Fusarium* Toxinen in Futtermitteln, Getreide- und Getreideprodukten wurde eine sichere, schnelle und empfindliche Methode auf Basis der LC/MS/MS entwickelt. Es werden maximal 15 Toxine in einer Messung erfaßt. Ein Schwerpunkt der Methodenoptimierung lag in der simultanen Bestimmung der Toxine der Trichothecengruppe (Deoxynivalenol DON, HT2- und T2-Toxin) und Zearalenon (ZEA). Gerade für ZEA und DON ist ein kombiniertes Verfahren aufgrund des häufigen gemeinsamen Vorkommens und ihrer weiten Verbreitung sehr nützlich. Die einzelnen ausgewählten Mykotoxine treten zumeist in sehr unterschiedlichen Konzentrationen in den belasteten Nahrungsmitteln auf. Entsprechend ihrer ebenfalls stark variierenden Toxizität sind Höchstmengen von 20 ppb bis zu 500 ppb zu berücksichtigen. Die große Herausforderung für ein Multiverfahren liegt in den sehr unterschiedlichen Strukturen der Analyten und in der Anwendbarkeit der Methode auf unterschiedlichste Matrices.

Die in diesem Beitrag vorgestellte Methode stützt sich zunächst auf bewährte Einzelmethoden (1-4). Nach einem einheitlichen Extraktionsschritt folgt zum einen die Probenvorbereitung mit Hilfe des MultiSep[®] Verfahrens, zum anderen wird für die Anreicherung und Extraktaufreinigung eine kombinierte Immuno-Affinitätssäule eingesetzt, welche die Antikörper für Zearalenon, Ochratoxin A und die Gruppe der Aflatoxine vereint (2,3). Zur Erleichterung der quantitativen Analyse und für weitgehend matrixunabhängige Detektion wurden zwei interne Standards getestet und verwendet (1, 4). Die erzielten Wiederfindungen für das Gesamtverfahren liegen zwischen 56 % für Nivalenol bis zu 100 % für die restlichen Trichothecene und Zearalenon. Es wurde eine hohe Linearität der Gesamtmethode ermittelt, die Bestimmungsgrenzen von 10 ppb für die Trichothecene und Zearalenon sind auch für die Untersuchung von Diät- und Kindernahrung geeignet. Die Ergebnisse der Untersuchungen diverser Probenmatrices in der Routineanalytik zeigen die Anwendbarkeit der Methode insgesamt und verdeutlichen zudem die Notwendigkeit interner Standards für die Quantifizierung mit Hilfe der LC/MS/MS.

1. U. Berger et al.: *J. Agr. Food Chem.* **1999**, 47, 4240-45
2. R. Göbel et al.: 22. Mycotoxin Workshop, **2000**.
3. Vicam: AOZ HPLC Instruction Manual
4. P. Zöllner et al.: *J. of Chromatogr. A*, **1999**, 858, 167-174

Quantitative Bestimmung von A-Trichothecenen, B-Trichothecenen und Zearalenon in Getreide mittels LC/MS/MS

Rainer Schuhmacher, Franz Berthiller, Gerhard Buttinger, Rudolf Krska

Interuniversitätes Forschungsinstitut für Agrarbiotechnologie (IFA-Tulln), Christian

Doppler Labor für Mykotoxinforschung, Konrad Lorenz Str. 20, A-3430 Tulln, Österreich

Die Kontamination von Lebens- und Futtermitteln mit Pilzgiften stellt weltweit ein ernstes Problem dar. Pilze der Gattung *Fusarium* produzieren eine Vielzahl giftiger Substanzen, wie zum Beispiel die Fumonisine, Moniliformin, Fusarinsäure, Trichothecene und Zearalenon. Unter diesen Verbindungen kommen in Zonen mit gemäßigttem Klima (z.B. Österreich und Deutschland) der Gruppe der Trichothecene und Zearalenon hinsichtlich der Häufigkeit ihres Vorkommens besondere Bedeutung zu. Zur effizienten Überprüfung der Einhaltung von Grenz- und Richtwerten und zur Sicherstellung der Qualität von Lebens- und Futtermitteln werden empfindliche und selektive Analyseverfahren benötigt.

Im vorliegenden Beitrag wird ein Analyseverfahren zum simultanen und quantitativen Nachweis von Nivalenol (NIV), Deoxynivalenol (DON), 3-Acetyl-DON (3-Ac-DON), 15-Acetyl-DON (15-Ac-DON), Fusarenon-X (FUS-X) Diacetoxyscirpenol (DAS), HT-2 Toxin (HT-2), T-2 Toxin (T-2) und Zearalenon (ZON) in Mais und Weizen vorgestellt. Das Verfahren verwendet Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) zur Auftrennung der Mykotoxine in Kombination mit einem Tandem-Massenspektrometer zu deren selektiven und empfindlichen Nachweis. Die gemahlten Getreideproben werden zuvor mit einem Gemisch aus Acetonitril/Wasser extrahiert. Anschließend wird ein Aliquot des filtrierten Rohextrakts über MycoSep® Säulchen aufgereinigt und per HPLC/MS/MS im Multiple Reaction Monitoring Modus (MRM) analysiert. Das eingesetzte Q Trap® Tandem Massenspektrometer wird hierzu mit einer Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI)-Inonenquelle betrieben. Für ZON wird zur Kompensation von Matrixeffekten (bei der Ionisierung) Zearalanon (ZAN) als interner Standard verwendet.

Zur Ermittlung der Verfahrenskenndaten wurden unbelastete Mais- und Weizenproben mit den Analysesubstanzen wiederholt aufgestockt (10 - 1000 µg/kg je Mykotoxin) und analysiert. Dabei wurden je nach Toxin Nachweisgrenzen zwischen 1 und 5 µg/kg erhalten. Die Richtigkeit des ausgearbeiteten Verfahrens wurde für DON und ZON mit Hilfe zertifizierter Referenzmaterialien überprüft. Zusätzlich wurden für natürlich kontaminierte Mais- und Weizenproben die nach HPLC/MS/MS-Bestimmung erhaltenen Toxinkonzentrationen mit den Ergebnissen nach Quantifizierung per HPLC-FLD (ZON) und GC-ECD (B-Trichothecene) verglichen und so die Anwendbarkeit des entwickelten Analyseverfahrens zum quantitativen Nachweis der Mykotoxine im unteren µg/kg-Bereich abgesichert.

Identifizierung von DON- und ZON-Glucosyltransferase-Genen von *Arabidopsis thaliana* und deren heterologe Expression zur Herstellung von Mykotoxin-Glucosid Referenzsubstanzen

Gerhard Adam¹, Franz Berthiller², Brigitte Poppenberger¹, Doris Lucyshyn¹, Rainer Schuhmacher², Rudolf Krska²

¹Institut für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Department für Angewandte Pflanzenwissenschaften und Pflanzenbiotechnologie, Universität für Bodenkultur, Muthgasse 18, A-1190 Wien; ²Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung - Department IFA Tulln, Universität für Bodenkultur, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln

Bei Befall von Getreide und Mais durch *Fusarium graminearum* und verwandte Arten kann es zur Akkumulation von gesundheitsrelevanten Mengen der vom Pilz *in planta* produzierten Metaboliten Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) kommen. Produktion von DON, das wie andere Trichothecene als Inhibitor der Proteinbiosynthese in Pflanzen und Tieren wirkt, ist ein nachgewiesener Virulenzfaktor des Pilzes. Derzeit noch unbekannt ist, ob das im Säugetier sehr stark östrogen wirksame ZON für die Krankheitsentwicklung auf der Pflanze relevant ist. Für beide Mykotoxine wurde beschrieben, dass Mais-Suspensionskulturen in der Lage sind Glucoside zu bilden. Die dafür verantwortlichen Enzyme waren bisher unbekannt.

Mit Hilfe eines genetisch modifizierten DON-sensitiven Hefestammes konnte eine cDNA von *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden, deren Expression in Hefe zu erhöhter DON-Resistenz führt. Das klonierte Gen kodiert für eine DON:UDP-Glucosyltransferase (*DOGTI*). Die Expression dieses Gens in Hefe vermittelt Resistenz gegen DON und 15-Acetyl-DON, nicht jedoch gegen Nivalenol und andere Trichothecene. Durch Vergleich der von transformierter Hefe gebildeten Substanz mit chemisch synthetisierten DON-Glucosiden konnte mittels LC-MS/MS gezeigt werden, dass das DON-3O-Glucosid gebildet wird. Diese Substanz ist wesentlich weniger inhibitorisch für Ribosomen als DON, wie Mithilfe eines *in vitro*-Translationssystemes auf Weizenkeimbasis gezeigt werden konnte. Überexpression des klonierten Gens in *Arabidopsis* führt zu erhöhter Toxinresistenz von Keimlingen. Die Bildung von Glucosiden könnte somit ein relevanter Resistenzmechanismus der Pflanze gegen *Fusarium* sein. Jedoch könnte in der Pflanze gespeichertes DON-Glucosid als « maskiertes Mykotoxin » im Verdauungstrakt von Tier und Mensch reaktivierbar sein.

In einem ähnlichen Forschungsansatz wurden Hefe-Indikatorstämme hergestellt, die den humanen Östrogenrezeptor exprimieren und mit phänotypischen Veränderungen auf die Anwesenheit von östrogen wirksamen Substanzen reagieren. Mit Hilfe eines Stammes, der ein östrogen-induzierbares *ADE2* Gen enthält, wurde eine UDP-Glucosyltransferase (UGT) cDNA von *Arabidopsis thaliana* identifiziert, die den Farbumschlag von rot auf weiß bei Zugabe von 4 ppb ZON unterdrückt, da ZON inaktiviert wird. Der gebildete Metabolit wurde durch Vergleich mit einer chemisch synthetisierten Referenzsubstanz als ZON-4O-Glucosid identifiziert. ZON-Glucosid bindet *in vitro* nicht mehr an den Östrogenrezeptor. Von einer ZON-Glucosyltransferase exprimierenden Hefe wird ZON nahezu quantitativ in das ZON-Glucosid umgewandelt. Die Herstellung der Substanz *in vivo* und anschließende Aufreinigung sind eine attraktive Alternative zur aufwendigen chemischen Synthese.

Die Genomsequenzen von *Arabidopsis* und Reis zeigen, dass die UDP-Glycosyl-transferasen eine extrem große Genfamilie mit mehr als 100 Mitgliedern bilden. *DOGTI* liegt z.B. in einem Cluster von 6 sehr sequenz-ähnlichen UGT-Genen, die höchstwahrscheinlich durch Genduplikationen aus einem Vorläufer evolutionär hervorgegangen sind. Trotz der großen Sequenzähnlichkeit bestehen große Unterschiede hinsichtlich der Fähigkeit zur Mykotoxin-Inaktivierung. Durch Analyse von chimären Genkonstrukten konnte gezeigt werden, dass der N-terminale Bereich für die Substratspezifität verantwortlich ist.

Gefördert durch Mittel des österreichischen Genomforschungsprogrammes GEN-AU.

5 Jahre Fusarien- und Mykotoxinmonitoring in Mecklenburg-Vorpommern - ein Nutzen für die Praxis ?

Hanna Wolf, Eberhard Schwedler
Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt M-V,
Thierfelder Str. 18; D-18559 Rostock

Peter Steinbach
Landespflanzenenschutzamt M-V, Graf-Lippe-Str. 1; D-18559 Rostock

Seit 1999 wird die jährliche Getreideernte in Mecklenburg-Vorpommern (M-V) systematisch auf Mykotoxine untersucht. Das Monitoring folgt somit dem Grundgedanken des Verbraucherschutzes, das Risiko schon zu Beginn der Lebensmittel-/ Futtermittelkette zu erkennen und zu bewerten. Es soll auch dazu dienen, bei der Abklärung von Tierverlusten den Verdacht einer Beteiligung von Mykotoxinen objektiv einschätzen zu können.

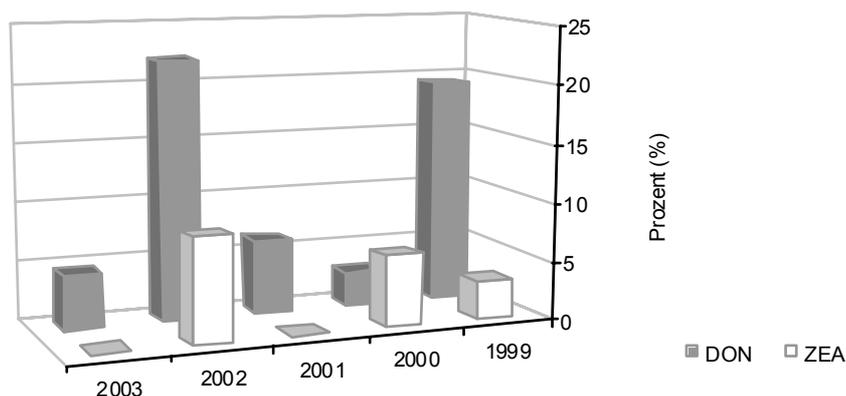
In den Jahren 1999 bis 2003 sind 376 Getreideproben, überwiegend Winterweizen, nach einer für das Flächenland Mecklenburg-Vorpommern repräsentativen Verteilung zur Untersuchung auf Fusarien und deren Mykotoxine Deoxinivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA) ausgewählt worden.

Die Untersuchung auf Mykotoxine erfolgte mit einem ELISA. Einzelne Ergebnisse wurden mit einer chromatografischen Methode (HPLC) bestätigt.

Im Erntejahr 2002 wurde der Befall mit Toxin bildenden Fusarien mit 17,4 % als mäßig, in den übrigen Jahren mit maximal 9 % nur als schwach eingestuft.

Im Untersuchungszeitraum wurde Zearalenon nur in 2,7 % der Proben mit einem Höchstwert von 236 µg/kg nachgewiesen. Mit DON waren im Durchschnitt 9,8 % der Proben bei einem Maximalwert von 1,196 mg/kg belastet.

Deoxinivalenol und Zearalenon in Winterweizen 1999-2003
Anteil positiver Proben in Prozent (DON > 0,2 ppm, ZEA > 25 ppm)



Insgesamt kann die Mykotoxinbelastung von Getreide in M-V als gering eingeschätzt werden. Ein erhöhtes Risiko für Verbraucher und Tierbestände ist nicht zu erkennen. Diese Ergebnisse sollten dem Tierhalter bei der Abklärung von Tierverlusten und Leistungsdepressionen eine Hilfe sein. Dennoch gibt es in der Praxis bei der Bewertung von Mykotoxinbefunden immer wieder Irritationen. In vielen Fällen ist die Ursache eine mangelnde Akzeptanz der Orientierungswerte für Mykotoxine und demzufolge eine Fehlinterpretation von Untersuchungsbefunden.

Qualitätsmanagement in der Mykotoxin-Analytik

H. Otteneder und P. Majerus

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

Präventiver Verbraucherschutz im Bereich der Mykotoxine erfolgt durch Festsetzung von Höchstmengen, Mykotoxin-Programmen zur Erfassung und Bewertung der Kontaminationshäufigkeit, Kontrolle der Höchstmengen, Methodenentwicklung und deren Optimierung sowie der Vermeidungsstrategie bei Erzeugung, Verarbeitung und Lagerung. Die Kontrolle der Einhaltung der Höchstmengen fordert vom Erzeuger und Hersteller repräsentative Untersuchungen bei seinem Warenbestand. Aufgabe der Überwachung ist es, durch die Untersuchung von Stichproben zu prüfen, inwieweit der Hersteller seiner Sorgfaltspflicht zur Prüfung nachgekommen ist. Beide Seiten sind dabei auf verlässliche Analytik angewiesen, d.h. die von Ihnen angewendeten Messverfahren müssen gleichwertig und ihre Messunsicherheit muss bekannt sein.

Die Messsicherheit ist definiert als

„A parameter associated with the result of measurement, that characterises the dispersion of the values that could reasonable be attributed to the measurand“.

Die Messunsicherheit kann auf verschiedene Weise ermittelt werden:

1. Über den Vertrauensbereich, der aus dem t-Faktor und der Standardabweichung unter Berücksichtigung der Zahl der Wiederholbestimmungen geschätzt wird.
2. Dem theoretischen „bottom-up“-Ansatz, bei dem nach einem Flussdiagramm alle möglichen Einflussgrößen, die auf das Ergebnis wirken, definiert und mit ihren Einzelstreuungen berücksichtigt werden.
3. Dem praktischen „Top-down“-Ansatz aus den Verfahrenskennzahlen für die Wiederholbarkeit und die Vergleichbarkeit, welche durch einen Ringversuch (Interlaboratory Study) ermittelt wird.
4. Berechnung der relativen Vergleichsstandardabweichung nach Horwitz.

Die Angabe der Messunsicherheit bei Ergebnissen ist nach EN ISO/IEC 17025:2000 für Prüflaboratorien gegenüber ihren Kunden erforderlich. Die Richtlinie 93/99/EWG über zusätzliche Maßnahmen im Bereich der amtlichen Lebensmittelüberwachung schreibt für amtliche Laboratorien die Anwendung dieser Norm zwingend vor.

Weiterhin müssen die amtlichen Laboratorien die Richtigkeit durch interne Tests, d.h. durch Untersuchung von Standardmaterial, und durch externe Prüfungen, d.h. Laborvergleichsuntersuchungen, die Qualität ihrer Ergebnisse fortlaufend überprüfen.

Neben den Verfahrenskennzahlen zur Charakterisierung der Messunsicherheit kann zur Beschreibung einer Methode noch die Nachweis- und Bestimmungsgrenze, ihre Robustheit und ihre Selektivität bzw. Spezifität von Bedeutung sein.

Die Messunsicherheit ist bei der Entscheidung über die Rechtskonformität eines Erzeugnisses zu berücksichtigen. Die entsprechenden Rechenverfahren dazu werden angegeben.

Fusarientoxine in Silomais – Analytik und Bewertung

Elisabeth Oldenburg¹, Frank Ellner²

¹ Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Institut für Pflanzenbau und Grünland-wirtschaft, Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig

² Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA), Institut für Ökotoxikologie und Ökochemie im Pflanzenschutz, Königin-Luise-Str. 19, D-14195 Berlin

Silomais wird als Ganzpflanze geerntet, zu Gärfutter (Maissilage) verarbeitet und hat große Bedeutung als Grundfutter in der Rinderernährung (Bullenmast, Milchkühe).

Im Rahmen einer Erhebungsstudie zum Vorkommen von Fusarientoxinen in Silomais wurden Ernteproben der Jahre 2000 und 2002 aus einem landesweiten Silomais-Sortenversuch (Gemeinschaftsprojekt mit der Universität Kiel, dem Deutschen Maiskomitee, verschiedenen Länderstellen des Sortenprüfwesens sowie Maiszüchtungsunternehmen) auf Fusarientoxine untersucht. Das gesamte Probenmaterial (n=378) wurde zunächst auf Gehalte an Deoxynivalenol (DON) mittels ELISA (Ridascreen Fast DON, r-Biopharm, Darmstadt) analysiert. Eine erste Überprüfung einiger der mit ELISA gewonnenen DON-Analysenergebnisse mit einer HPLC-Methode (VDLUFA-Verbandsmethode, 2000, modifiziert nach Valenta et al., 2002, Probenaufreinigung mit Einsatz von Immunoaffinitäts-Säulen für DON) ergab insbesondere bei höheren und hohen DON-Gehalten im Bereich von >2 bis ca. 12 mg DON/kg TM (ELISA) deutlich niedrigere DON-Werte bei Einsatz des HPLC-Verfahrens. Häufig wurden um 50 bis 75% reduzierte DON-Gehalte beim HPLC-Verfahren im Vergleich zum ELISA festgestellt. Außerdem ergaben sich Hinweise auf das Vorhandensein von DON-Metaboliten in den Silomais-Proben.

Um genauere Kenntnisse über die Ursachen der erheblichen Differenzen bei den Analysenergebnissen zu gewinnen, wurden alle Proben (n=22), bei denen ein DON-Gehalt >5mg/kg TM mit ELISA festgestellt wurde, mit einem weiteren HPLC-Verfahren (Methode Ellner, Reinigung über Aktivkohle / Aluminiumoxyd / Celite / Kationenaustauscher), bei dem auch Metabolite des DON quantifiziert werden können, sowie mittels LC-MS auf Fusarientoxine untersucht. Das Spektrum der analysierten Toxine umfasste Deoxynivalenol, Nivalenol, 3- bzw. 15.-Acetyl-DON, T-2-Toxin, HT-2-Toxin, Diacetoxy-scirpenol, Zearalenon und α -/ β -Zearalenol.

Aus den bisherigen Analysenergebnissen lässt sich schließen, dass die deutlich höheren DON-Gehalte beim ELISA im Vergleich zum HPLC-Verfahren auf die Kreuzreaktion des Antikörpers mit acetylierten Formen des DON in den Proben zurückzuführen sind.

Über die Risikobewertung von mit mehreren Fusarientoxinen belastetem Silomais in Zusammenhang mit den Orientierungswerten für DON bzw. Zearalenon in Futtermitteln für Rinder wird diskutiert.

Zur Mykotoxinsituation bei Getreide und Futtermitteln in Österreich

Richard Öhlinger, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit
GmbH, Kompetenzzentrum Cluster Chemie Linz

Die österreichische Mykotoxinproblematik wird hauptsächlich durch die Feldpilze der Gattung *Fusarium* hervorgerufen. Typische Mykotoxine der Lagerpilzflora wie Aflatoxine und Ochratoxin A sind in heimischem Getreide nur vereinzelt nachzuweisen. Die am häufigsten auftretenden bzw. nachweisbaren *Fusarien* und Fusarientoxine bei österreichischem Getreide und Mais sind:

Kultur	<i>Fusarium</i> sp.	Mykotoxine
Mais	<i>F. subglutinans</i> , <i>F. graminearum</i> , (<i>F. proliferatum</i> , <i>F. poae</i>)	Moniliformin, Zearalenon, Deoxynivalenol, 15-Acetyldeoxynivalenol, (Fumonisin, Nivalenol, Beauvericin)
Weizen	<i>F. graminearum</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. poae</i>	Zearalenon, Deoxynivalenol, Nivalenol, 15-Acetyldeoxynivalenol
Hafer	<i>F. graminearum</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. poae</i> (<i>F. tricinctum</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. langsethiae</i>)	Zearalenon, Deoxynivalenol, 3-Acetyl- deoxynivalenol, Nivalenol, T-2 To- xin, HT-2 Toxin

Die jeweilige Befallssituation, das Mykotoxinspektrum bzw. die jeweiligen Mykotoxinbelastungen in Getreide variieren z.T. sehr deutlich von Jahr zu Jahr und von Gebiet zu Gebiet. In der nachfolgenden Tabelle sind die Jahres-Mediane (in mg/kg) von Deoxynivalenol (DON), dem mengenmäßig bedeutendsten Mykotoxin in der heimischen Landwirtschaft, angeführt.

	2002	2003	n (2002-2003)
Weizen	0,14	1,25	186
Hafer	0,06	0,12	92
Maiskörner	0,68	0,17	268

Obwohl im Jahr 2003 ein besonders trockenes und warmes Klima vorherrschte, war bei Weizen eine deutliche Mehrbelastung mit DON gegenüber dem regenreichen Jahr 2002 zu beobachten. Relativierend muss dazu bemerkt werden, dass die meisten 2003-Proben aus Oberösterreich (hauptsächlich Futterweizen) stammten und somit diese Mittelwertschätzung nicht das gesamte Bundesgebiet beschreibt. Einige Beobachtungen aus Niederösterreich zeigten keine so dramatischen DON-Kontaminationen in Weizen, jedoch sind diese in ähnlicher Größenordnung in Südösterreich zu vermuten. In Hafer und besonders in Maiskörnern waren die DON-Gehalte von 2003 unauffällig. Eine Besonderheit im Mykotoxinaufkommen bei Mais in Österreich der letzten Jahre war das Auftreten von *F. proliferatum* und damit verbunden die Kontamination mit Fumonisin. Wahrscheinlich durch die allmähliche Klimaänderung - mildere und feuchtere Wintermonate und wärmere und heißere Sommer - verursacht, konnte *F. proliferatum* auch in Österreich zu größerer Verbreitung gelangen. Während für das Jahr 2002 der Median noch unter 0,1 mg/kg lag, erreichte dieser 2003 bereits 0,15 mg/kg.

In Futtermitteln auf Getreidebasis sind, wenn auch abgeschwächt im Vergleich zum unverarbeiteten Getreide, vor allem DON- oder Zearalenon (ZON)-Gehalte nachweisbar. Einen Überblick über DON- und ZON-Konzentrationen in Futtermittelproben der amtlichen Kontrolle gibt die nachfolgende Tabelle (Angaben in mg/kg für 2002-2003). Wenn auch die Gehalte sehr schwanken können (DON: <0,05-4,5 mg/kg; ZON: <0,02-1,1 mg/kg), so liegen doch die Mediane deutlich unter den z.Z. gültigen Richtwerten.

	Median	Bereich	n
Deoxynivalenol	0,23	<0,05 – 4,5	240
Zearalenon	<0,02	<0,02 – 1,1	142

Vorkommen von Mykotoxinen und Endotoxinen im extensiv genutzten Grünland und auf der Winterweide

Marina Müller, Undine Behrendt

Zentrum für Agrarlandschafts- und Landnutzungsforschung (ZALF) e.V. Müncheberg, Institut für Primärproduktion und Mikrobielle Ökologie, Gutshof 7, D – 14641 Paulinenaue

Veränderungen der Nutzungsintensität des Grünlandes äußern sich vorwiegend durch eine reduzierte Schnitthäufigkeit, einen verzögerten ersten Schnitt im Rahmen von Vogelschutzprogrammen und eine herabgesetzte Düngung. Diese Maßnahmen können u.a. zu einem erheblichen Anstieg einzelner Mikroorganismen (MO)-Populationen auf den Grasbeständen führen. Es wurde nachgewiesen, dass dabei vor allem die Besiedlung der Pflanzen mit heterotrophen Bakterien und mit Schimmelpilzen stark ansteigen kann.

Beide MO-Gruppen sind in der Lage, toxische Stoffwechselprodukte zu bilden, die sich in den überständigen Gräsern und in deren Konservaten anreichern und zu einer Beeinträchtigung der Tiergesundheit führen können. Von besonderem Interesse sind dabei die Endotoxine Gram-negativer Bakterien und die Mykotoxine der Gattung *Fusarium*.

Ein ähnliches Problem stellt die zunehmende Tendenz zur Winteraußenweide von Mutterkühen dar. Diese im Winter genutzten Grünlandbestände bergen ebenso die Gefahr einer Anreicherung mit Toxinen infolge einer massiven Vermehrung von Bakterien und Schimmelpilzen.

Neben der möglichen Bildung der wichtigsten *Fusarium*-Mykotoxine Deoxynivalenol und Zearalenon werden die Endotoxine der Gram-negativen Bakterien untersucht. Als Endotoxin wird dabei der hitzestabile Lipopolysaccharid-Protein-Komplex in deren Zellwand bezeichnet, dessen eigentliche toxische Komponente vorwiegend beim Zelltod freigesetzt wird. Dabei sind vor allem die Endotoxine der häufig auf Gräsern vorkommenden Enterobakterien durch eine relativ hohe Toxizität gekennzeichnet. Bei gleichzeitiger Aufnahme von Endo- und Mykotoxinen könnten vielfältige additive oder synergistische toxische Reaktionen im Tier ausgelöst werden. Um diese Gefahr zu bewerten, sollen Untersuchungen klären, ob und unter welchen Bedingungen mit dem gleichzeitigen Auftreten von Endo- und Mykotoxinen in extensiv genutzten Grünlandaufwüchsen, in daraus hergestellten Konservaten und im Winterweidefutter zu rechnen ist.

Die Quantifizierung des bioaktiven Endotoxins erfolgte mit dem chromogenen Nachweissystem des Limulus-Amöbozyten-Lysat(LAL)-Testes. DON und ZEA wurden mittels HPLC nach Trennung über ODS Säulen analysiert.

Die ersten Ergebnisse zeigen, dass sowohl überständige Grünlandaufwüchse der Spätschnittnutzung als auch Winterweidebestände mittelgradig mit Endotoxinen kontaminiert sind. Zearalenon wurde in diesen Aufwüchsen sowie in den daraus hergestellten Konservaten nur vereinzelt und in geringen Konzentrationen gefunden. Dagegen konnten in der Mehrzahl der Winterweideproben Zearalenongehalte von 15 bis 268 ppb analysiert werden. Diese ersten Ergebnisse zeigen, dass die Untersuchungen gezielt erweitert werden sollten, um Einflussfaktoren genau zu definieren.

Deoxynivalenol in Lebensmitteln

V. Curtui¹, A. Brockmeyer², R. Dietrich³, O. Kappenstein⁴, H. Klaffke⁴, J. Lepschy⁵, E. Märtlbauer³, E. Schneider¹, C. Seidler¹, G. Thielert², E. Usleber¹, R. Weber⁴, J. Wolff⁶

- 1 Professur für Milchwissenschaften, Justus-Liebig-Universität, Ludwigstrasse 21, D-35390 Giessen
- 2 Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt, Hedingerstr. 2/1, D-72488 Sigmaringen
- 3 Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München, Schönleutner Str. 8, D-85764 Oberschleißheim
- 4 Bundesinstitut für Risikobewertung, Thielallee 88-92, D-14195 Berlin
- 5 Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Vöttinger Strasse 38, D-85354 Freising
- 6 Institut für Biochemie von Getreide und Kartoffeln, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Schützenberg 12, D-32756 Detmold

Seit August 2001 wird von den oben genannten Institutionen das vom Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (BMVEL) geförderte Verbundforschungsprojekt "Analytik und Vorkommen wichtiger Fusarientoxine (Deoxynivalenol und Zearalenon) sowie Aufnahme dieser Toxine durch den deutschen Verbraucher" bearbeitet. Eine zentrale Zielstellung der Arbeiten stellt die repräsentative Ermittlung der Belastung von Lebensmitteln mit Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon dar. Hierzu wurden bisher über 4000 Lebensmittelproben untersucht. Dieser Beitrag beschäftigt sich mit der Belastung vor allem von Getreide und daraus hergestellten Lebensmitteln mit Deoxynivalenol. Aufgrund spezifischer rechtlicher Anforderungen bzw. aufgrund hoher Verzehrsmengen wurden bei den Untersuchungen folgende Lebensmittel schwerpunktmäßig untersucht: Säuglings- und Kleinkindernahrungsmittel, Brot und Brötchen, Mehle, Speisegetreide und Frühstückszerealien, Teigwaren sowie Bier. Ein weiterer Aspekt war der Vergleich konventionell und ökologisch hergestellter Lebensmittel. Als Untersuchungsverfahren für DON wurden Enzymimmuntests, HPLC mit UV- oder Fluoreszenzdetektion sowie HPLC/MS-MS eingesetzt. In Abhängigkeit von der Probenmatrix wurden bei den Untersuchungen Nachweisgrenzen zwischen 10 ng/g und 30 ng/g erreicht, in einigen Produkten konnten Nachweisgrenzen im Bereich von 1 ng/g erreicht werden. Bei der - zum Zeitpunkt der Niederschrift dieser Kurzfassung noch nicht abgeschlossenen - Auswertung der Ergebnisse zeigte sich, dass bei durchweg hoher Inzidenz von DON in vielen Produktgruppen der Medianwert für dieses Toxin in praktisch allen Produkten deutlich unterhalb der jetzt gültigen Höchstmengen lag bzw. unterhalb der aus Verzehrsmenge und tolerierbarer Tagesaufnahme (TDI) abgeschätzten kritischen Konzentrationsbereiche. Allerdings wurden immer wieder in (relativ wenigen) einzelnen Produkten erhöhte Belastungen festgestellt. In diesem Beitrag werden detaillierte Auswertungen zu den durchgeführten Untersuchungen präsentiert und diskutiert.

Dieses Projekt wird vom BMVEL über die Projektträgerschaft durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) gefördert (Az. 00HS055)

Zearalenon in Lebensmitteln

O. Kappenstein¹, A. Brockmeyer², R. Dietrich³, V. Curtui⁴, H. Klaffke¹, J. Lepschy⁵,
E. Märtlbauer³, E. Schneider⁴, C. Seidler⁴, G. Thielert², E. Usleber⁴, R. Weber¹, J. Wolff⁶

- 1 Bundesinstitut für Risikobewertung, Thielallee 88-92, D-14195 Berlin
- 2 Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt, Hedinggerstr. 2/1, D-72488 Sigmaringen
- 3 Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München, Schönleutner Str. 8, D-85764 Oberschleißheim
- 4 Professur für Milchwissenschaften, Justus-Liebig-Universität, Ludwigstrasse 21, D-35390 Giessen
- 5 Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Vöttinger Strasse 38, D-85354 Freising
- 6 Institut für Biochemie von Getreide und Kartoffeln, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Schützenberg 12, D-32756 Detmold

Das vom Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (BMVEL) geförderte Verbundforschungsprojekt "Analytik und Vorkommen wichtiger Fusarientoxine (Deoxynivalenol und Zearalenon) sowie Aufnahme dieser Toxine durch den deutschen Verbraucher" wird von den oben genannten Institutionen bearbeitet. Ziel dieser Arbeit ist eine repräsentative Darstellung der Belastungssituation von Lebensmitteln durch Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA). Hierzu wurden bislang über 4000 Lebensmittelproben auf ZEA untersucht. Aufgrund geltender gesetzlicher Grenzwerte, anhand der Orientierung der Verzehrsmengen und unter Berücksichtigung empfindlicher Verbrauchergruppen wurden schwerpunktmäßig Säuglings- und Kleinkindernahrungsmittel, Brot und Brötchen, Frühstückszerealien, Speisegetreide und -mehle, Speiseöle, Teigwaren sowie Milch untersucht. Des Weiteren wurde ein Vergleich zwischen konventionell und ökologisch produzierten Lebensmitteln angestellt. Die hierfür angewandten analytischen Verfahren waren LC-MS/MS, HPLC-FLD sowie Enzymimmuntests. In Abhängigkeit von der zugrunde liegenden Lebensmittelmatrix wurden bei den jeweiligen Methoden Nachweisgrenzen zwischen 0,02 µg/kg (ELISA, Bier) bis 6 µg/kg erreicht.

Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich in vielen Produktgruppen eine niedrige Inzidenz von ZEA. In den meisten Lebensmittelgruppen liegt der Medianwert deutlich unterhalb der jetzt gültigen Höchstmengen bzw. unterhalb des aus Verzehrsmenge und tolerierbarer Tagesaufnahme (TDI) abgeschätzten kritischen Konzentration. Lediglich für die Produktgruppe Maiskeimöle wurde eine deutlich erhöhte Zearalenonbelastung bestimmt. Die in England nachgewiesene Zearalenonbelastung von Konsummilch konnten nicht bestätigt werden. Es werden detaillierte Auswertungen zu den durchgeführten ZEA Untersuchungen diskutiert.

Dieses Projekt wird vom BMVEL über die Projektträgerschaft durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) gefördert (Az. 00HS055)

Fusarium Head Blight and Mycotoxin Contamination of Wheat: Cropping System, Disease Assessment and Possible Control Strategies

Susanne Vogelgsang, Andreas Hecker, Hans-Rudolf Forrer

Agroscope FAL Reckenholz, Swiss Federal Research Station for Agroecology and Agriculture, Reckenholzstrasse 191, 8046 Zurich, Switzerland

The occurrence of Fusarium head blight (FHB) in cereals is strongly affected by production practices including crop rotation, tillage, and choice of varieties. When wheat is cultivated after maize and especially with maize residues remaining on the soil surface (i.e. no-till), FHB caused by *Fusarium graminearum* (FG) and contamination of wheat with its associated toxin, deoxynivalenol (DON), is more prevalent. In Switzerland, however, conservation tillage is promoted through direct payments in a growing number of cantons.

To evaluate tillage and other cropping system effects on FHB under field conditions, grain samples from 289 wheat fields (mainly in the canton Aargau) were collected (2001-2003). The factors investigated included wheat varieties of high and low susceptibility to FG, no-till or plough tillage as well as maize or other pre-crops. Grain samples were examined with a seed health test for the presence of FHB causing pathogens and with an ELISA-kit for the content of DON. *Microdochium nivale*, FG, *F. poae*, and *F. avenaceum* were isolated. Of all samples tested, one-fifth was comprised of 10% or more of FG-infected grains with a DON content exceeding 1 ppm. The incidence of FG and the contamination with DON were strongly influenced by the tillage practice since 33% of the samples from fields with no-tillage exceeded the threshold value of 1 ppm DON compared with only 4% from ploughed fields. Moreover, in samples from no-till fields with the pre-crop maize and FHB susceptible wheat varieties, the proportion of such critical samples reached 68%. The use of less susceptible varieties reduced this ratio to 37%.

In field experiments at Zurich-Reckenholz (1999-2002) using 20 winter wheat varieties, the effects of artificial inoculations (application of spore suspensions at flowering) and semi-natural inoculations (spreading of FG-colonised maize straw after sowing in autumn to mimic direct seeding with pre-crop maize) on FHB incidence and DON contamination were investigated. For a given variety, the choice of inoculation method did not strongly alter the observed degree of susceptibility to ear infestation. However, only maize straw inoculations led to a rather close correlation between the toxin content and ear or grain infestation. Depending on the variety and the year, high contents of DON occurred in both grains and straw. In straw, the toxin contents were as high or exceed those detected in grains.

Currently, we are investigating methods to control FHB under conservation tillage by reducing inoculum sources (e.g. accelerated decomposition of residues through chopping and shallow incorporation) and by the use of antagonists of FG on both maize straw and wheat. Furthermore, in order to help prevent high mycotoxin levels and to avoid unnecessary fungicide treatments, we are developing a forecasting model for FG. Finally, we are evaluating the occurrence and the importance of other fusaria species, including *F. poae* and *F. avenaceum* and the resulting mycotoxin risks in organic and conventionally produced cereal varieties.

Ergebnisse mehrjähriger Feldversuche zur Wirkung Strobilurin-haltiger Fungizide auf die Mykotoxin-Bildung in unterschiedlichen Weizensorten

Ellner, Frank M.

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Ökotoxikologie und Ökochemie im Pflanzenschutz, Königin-Luise-Str. 19, D-14195 Berlin

Die Wirkung von Strobilurin-haltigen Fungiziden auf den Befall von Getreide - vornehmlich Weizen – durch Ährenfusariosen und die damit unmittelbar im Zusammenhang stehende Bildung von Mykotoxinen im Korn wird seit längerem kontrovers diskutiert. Es sind Versuche publiziert und diskutiert worden, in denen sowohl eine fördernde wie auch hemmende oder indifferente Wirkung beschrieben ist. Es besteht weiterhin Unklarheit über die möglichen Ursachen der jeweiligen Effekte.

Im Zusammenhang mit der zunehmenden Ausbildung von Resistenzen bei echten Mehltaupilzen sowie Septoria gegenüber QoI-Fungiziden in Getreide wurde die Empfehlung ausgesprochen, den Einsatz von Strobilurinen auf maximal 2 Anwendungen zu reduzieren und diese so früh wie möglich durchzuführen. Aus diesem Grund ist auch bei Einsatz der Strobilurine in Kombination mit Azolfungiziden keine direkte Wirkung auf Ährenfusariosen zum Zeitpunkt der Blüte mehr zu erwarten und die Diskussion über späte Applikationen hinfällig.

In den von uns untersuchten Getreideproben aus Freilandversuchen der letzten 4 Jahre war in ca. 85 % der mit Strobilurin-haltigen Fungiziden behandelten Varianten der Gehalt an Deoxynivalenol signifikant erhöht. Die Applikation der Wirkstoffe erfolgte sowohl in den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen als auch zu den jeweiligen Wachstumsstadien. In diesen Versuchen wurde oft jeweils nur eine Getreidesorte untersucht. Divergierende Ergebnisse könnten somit auch durch die unterschiedliche Reaktion der verwendeten verschiedenen Getreidesorten verursacht sein. Deshalb wurde weiterführend in zweijährigen Versuchen der Einfluss von Jewel-Top auf die Mykotoxin-Bildung in unterschiedlichen Winterweizensorten untersucht. In Blockversuchen mit je 15 bzw. 24 verschiedenen Sorten unter Praxisbedingungen und bei ausschließlich natürlicher Infektion durch Ährenfusariosen konnte in über 80 % der Sorten in beiden Versuchsjahren erhöhte Konzentrationen an Deoxynivalenol nachgewiesen werden. In den Varianten, in denen zum Zeitpunkt der Blüte ein Fusarium-wirksames Fungizid gespritzt wurde, war in 100 bzw. 73 % der Sorten die Mykotoxin-Konzentration niedriger als in der unbehandelten Kontrolle. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen bestand hinsichtlich der Anfälligkeit der Sorten gegenüber Ährenfusariosen eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Resistenzprüfung.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass bei gegebenem Infektionsdruck und unter entsprechenden klimatischen Bedingungen der Einsatz von Strobilurin-haltigen Fungiziden im Getreideanbau ein Risikofaktor bezüglich der Bildung von Mykotoxinen im Korn darstellen kann. Im Hinblick auf die neu geltenden Höchstmengen für Mykotoxine in Getreide und Getreideprodukten sollte dieser Aspekt bei der Ausarbeitung der durchzuführenden Fungizidmaßnahmen berücksichtigt werden.

Structural elucidation and analysis of thermal degradation products of *Fusarium* mycotoxins

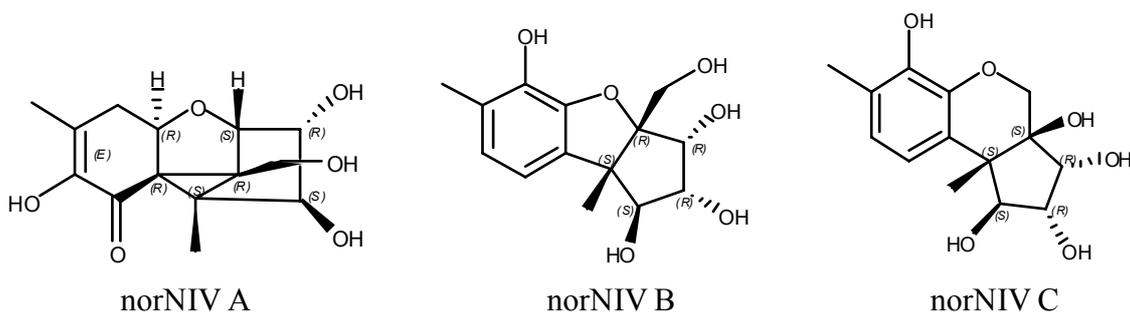
Michael Bretz, Simon Göckler, Hans-Ulrich Humpf

Institut für Lebensmittelchemie, Corrensstr. 45, D-48149 Münster

The major class of mycotoxins produced by *Fusarium* moulds are trichothecenes, a large group of sesquiterpenes sharing the same basic chemical structure, a 12,13-epoxytrichothec-9-ene ring system. Their toxicity is attributed to their general ability to noncompetitively inhibit the biosynthesis of proteins in eukaryotic cells resulting in vomiting, diarrhoea, and gastro-intestinal inflammation [1]. Trichothecenes are relatively stable substances, their degradation is reported only at high temperatures and prolonged heating time [2].

In an attempt to investigate the stability of the trichothecene Nivalenol (NIV) under food processing conditions such as cooking or baking, we developed a model (heating) system and screened the residue for possible degradation products.

Heating of NIV, especially under mild alkaline conditions, gave a mixture of three compounds (norNIV A, norNIV B and norNIV C), which were separated and further analyzed by gas chromatography / mass spectrometry (GC/MS) and liquid chromatography / mass spectrometry (LC/MS). Structure elucidation was achieved by 1D and 2D nuclear magnetic resonance (NMR) experiments.



We further demonstrated the formation of norNIV B and norNIV C in heating experiments with NIV-spiked flour samples. In a screening of several commercially available products none of the degradation products were detectable possibly due to the usually very low contamination with NIV. Instead we found the structural analogues formed by degradation of 4-Deoxynivalenol (DON).

1. Opinion of the Scientific Committee Food on *Fusarium* toxins, Part 6, 2002
2. Lauren, D.R., Smith, W.A. (2001) Stability of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in ground maize under typical cooking environments. Food Additives and Contaminants, 18 (11), 1011-1016

Untersuchungen der Gehaltsveränderungen der Fusariumtoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA) durch Be- und Verarbeitungsprozesse in Getreide und Getreideprodukten

J. Wolff

Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BFEL)

Institut für Biochemie von Getreide und Kartoffeln, Schützenberg 12, 32756 Detmold

Mit der jetzt geltenden Mykotoxinhöchstmengenverordnung in Verbindung mit der Lebensmittel und Hygieneverordnung - insbesondere LMHV §4 - ist es erforderlich, die Veränderungen der Mykotoxingehalte während der Be- und Verarbeitung zu überblicken. Wie hoch ist die Reduktion von Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA) entlang der Verarbeitungskette Getreide – Mehl – Brot oder Durum – Grieß – Teigwaren? In mehrjährigen Versuchen wurden Weizen-, Roggen- und Durum-Partien ** gereinigt, diese Partien wurden vermahlen, die Mehle verbacken und Grieße zu Teigwaren** verarbeitet.

a. Getreidereinigung

Die Reinigung zeigte bei allen Partien einen deutlichen Unterschied in Bezug auf die Entfernbarekeit von DON und ZEA. Die Reduktion der Mykotoxine war partiespezifisch, ZEA war bei den durchgeführten Reinigungen im höheren Maße zu entfernen als DON. Die Reduktion von DON korreliert nicht mit der Reduktion von ZEA.

b. Vermahlung

Die gereinigten Partien wurden auf der Versuchsmühle der BFEL (vormals BAGKF) jeweils mit und ohne Weißreinigung vermahlen. Die Ergebnisse der Vermahlungen auf der Versuchsmühle zeigen auf, dass ZEA in den Mehlen kaum zu finden ist, DON bei schwarzgereinigtem als auch bei weißgereinigtem Getreide durch die Vermahlung nicht sehr stark reduziert wird. Beide Mykotoxine werden zum Teil in die Nachprodukte verschoben, wobei eine höhere Verschiebung der ZEA-Gehalte gegenüber den DON-Gehalten in die Kleien zu beobachten ist. Die Nachmehle wiesen bei einer Vermahlung ohne Weißreinigung niedrigere DON-Gehalte auf.

c. Backen

Weizen-Mehle (T 550) mit hohen und niedrigen DON-Gehalten wurden verbacken. Auch aus Mehlen mit hohen DON-Gehalten lassen sich Gebäcke mit sehr guter Qualität herstellen. Fallzahlen, erforderliche Flüssigkeitszugabe, Back- und Wertzahlen korrelieren nicht mit der DON-Konzentration. Die Teigoberfläche wurde bei den Teigen mit höheren DON-Gehalten als „etwas feucht“ bezeichnet, die mit niedrigen DON-Gehalten als „normal“.

Um Aussagen zu Veränderungen der DON-Konzentrationen durch einen Backprozess angeben zu können, sind alle Gehalte auf Trockensubstanz zu beziehen. Die Form des Gebäckes (und damit das Backverhalten) haben Einfluss auf die DON-Gehalte nach dem Backen. Im Median nahm der DON-Gehalt beim Backen der Kasten- und freigeschobenen Brote um 25 % ab, wobei die Versuche mit den niedrigen DON-Gehalten nicht einbezogen wurden.

d. Teigwarenherstellung

Diese Arbeiten umfassen den Prozess von der eingesetzten Rohware bis zu den Grießen und Mehlen und zeigt die Reduktion der DON-Gehalte in den Grießen und Mehlen gegenüber dem ungereinigten Getreide und die Verschiebung der DON-Gehalte in die Kleien, den Staub und den Kleinweizen auf. Bei der industriellen Herstellung von Teigwaren veränderte sich der DON-Gehalt vom Grieß zur Teigware gering; durch Kochen der Teigwaren reduzierte sich der DON-Gehalt median um ca. 30 %.

* Teil des Verbundprojekts BLE 00HS 055

** gefördert vom Verband der Teigwarenhersteller und Hartweizenmühlen Deutschlands e. V.

A new clean-up method for ochratoxin a determination in various matrices by hplc-fld

¹G. Buttinger, ¹H. Knapp, ²E. Fuchs, ²E.-M. Binder, ¹R. Krska

¹Institute for Agrobiotechnology (IFA-Tulln), Christian Doppler Laboratory for Mycotoxin Research, Konrad Lorenz Str. 20, A-3430 Tulln

Tel.: ++43 2272 66280 419; Fax: ++43 2272 66280 403; e-mail: buttinger@ifa-tulln.ac.at

²Romer Labs Diagnostic GmbH, Industriestr. 21, A-3130 Herzogenburg

Ochratoxin A (OTA) is produced in moderate climates by *Penicillium* strains (*P. verrucosum*) and in warmer regions of the world by several species of *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. sulphureus*...) on a wide range of food commodities (e.g. cereals, grapes, coffee beans). Carry over from contaminated feed can occur into meat or meat products. OTA has been shown to be a potent nephrotoxin in almost all animal species.

Widely used analytical methods for ochratoxin A are e.g. HPLC-FLD or TLC methods. As the crude extract can normally not be used directly for these analysis, a clean-up step is necessary. Commonly used clean-up procedures are immunoaffinity columns (IAC), liquid - liquid extraction (LLE) and solid phase extraction (SPE).

A new suitable column material for purification of OTA from different extracts has been developed and optimized for maximum recovery and a minimum of interfering substances. Finally, the new clean-up material was used as packing material for Mycosep[®] columns, known from the Mycosep[®] Trichothecene columns. The Mycosep[®] format is a push through format which allows rapid sample clean-up

The performance of the newly developed clean-up columns for OTA determination was evaluated. OTA was subsequently analysed using RP-HPLC with fluorescence detection.

The method was validated with maize, red wine, green coffee beans and raisins. This matrices have been measured in eight spiked levels (2.6 – 91.0 µg/kg) and three repetitions. The limit of detection for the measured matrices was in the range of 0.4 to 1.3 µg/kg

Recovery rates for frequently contaminated commodities, like cereals, red wine, raisins and green coffee were assessed. Recovery rates for this clean-up column ranged from (87.9 ± 12.5)% (n = 6) for wheat up to (99.4 ± 2.7)% (n = 24) for raisins. The accuracy of the method has been tested using a certified reference material. According to ISO guide 33 the trueness of the method has been verified.

Apple pomace possibly alleviates the growth depressing effect of DON in piglets

A. Gutzwiller¹, L. Czeglédi¹, P. Stoll¹, L. Bruckner²

¹Federal Research Station for Animal Production and Dairy Products, CH-1725 Posieux;
²IVI, CH-3147 Mittelhäusern,

The main effects of DON are a reduced feed intake, which is partly caused by an irritation of the gastric mucosa, and altered immune responses. Since pectin has a protective effect on the gastric mucosa and might possibly act as an adsorbent for DON, we tested the hypothesis that the inclusion of apple pomace in the diet alleviates the effects of DON.

116 weaned Large White piglets weighing on average 9.7 kg were assigned to 4 dietary treatments: **D-P-**: no DON, no pomace; **D-P+**: no DON, 8 % pomace in the diet; **D+P-**: 3 ppm DON, no pomace; **D+P+**: 3 ppm DON, 8 % pomace. They were housed in groups of 3 to 4 animals per pen and were fed the experimental diets to appetite for 5 weeks. The diets D+P- and D+P+ contained 17 % of wheat which was contaminated with 18 ppm DON. The piglets were vaccinated with a porcine parvovirus vaccine. Blood was collected for haematology, clinical chemistry and parvovirus antibody titration at the beginning and at the end of the trial. In the 5th experimental week phytohaemagglutinin was injected intradermally, and 24 h later the increase of the skin fold thickness was determined as an indicator for the cell-mediated immune response. 9 animals per treatment were slaughtered at the end of the trial. The two-factorial analysis of variance (AOV) was used to test for effects of DON and of pomace, and means were compared using linear contrasts.

DON depressed feed intake ($P = 0.02$), without affecting feed conversion ratio. It also tended to depress growth ($P = 0.12$), mainly because of the slow growth of group D+P-. The piglets which received the contaminated diet with pomace tended to grow faster than those receiving the contaminated diet without pomace ($P = 0.07$).

Table. Growth performance

	4 treatments, means and s_{ξ}					P 2-fact. AOV		P contrasts	
	D-T-	D-T+	D+T-	D+T+	s_{ξ}	DON effect	pomace effect	D-T- vs. D+T-	D+T- vs. D+T+
growth, g/d	376	369	334	369	15	0.12 ¹	0.30 ¹	0.03	0.07
Feed intake, g/d	703	662	617	622	27	0.02	0.58	0.03	0.89
FCR ² , MJ DE/kg	25.5	27.3	24.3	23.2	1.9	0.16	0.87	0.64	0.69

¹ Interaction DON x pomace: $P = 0.12$; ² feed conversion ratio

The health status of all groups was satisfactory. Seroconversion after the vaccination was comparable in all groups. The skin fold diameter increased more in the piglets exposed to DON than in the piglets receiving the uncontaminated diets in response to the injection of phytohaemagglutinin ($P = 0.006$). DON slightly but significantly lowered plasma protein concentration ($P = 0.01$), but it did not influence any of the haematological variables. There was no treatment effect on the carcass yield of the slaughtered piglets.

A reduction in feed intake, a lower growth rate and an increased reactivity of the T-cells were the most relevant effects of DON observed in the trial. The results further indicate that apple pomace possibly alleviates the growth depressing effect of DON in pigs. This finding will be tested in a future trial.

Effect of Bedding with Mycotoxin Contaminated Straw and low Levels of Dietary Mycotoxin on Piglet Performance

P. Spring and B. Strickler

Swiss College of Agriculture, Laenggasse 85, 3052 Zollikofen, Switzerland

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of using mycotoxin-contaminated straw as bedding for weaning piglets fed diets with and without mycotoxin adsorbent on growth performance. Ninety weaning piglets were assigned based on genetics and weight to 18 groups of 5 piglets with 3 treatments. Piglets received a barley/wheat/soy/potato protein-based starter diet (14.0 MJ DE, 16.5 % CP and 1.20 % lysine) and water *ad libitum*. Treatments were as follows: Control (C): Bedding with 200 g of wood shavings per piglet per day; Straw (S): Bedding with 200 g of contaminated straw per piglet per day; Straw+Adsorbent (S+A): Bedding with 200 g of contaminated straw per piglet per day plus supplementation of diet with 2000 ppm of mycotoxin adsorbent (Mycosorb™, Alltech Inc.). Straw was contaminated with 821 ppb deoxynivalenol (DON), 528 ppb zearalenone (ZEA) and < 50 ppb T2-toxin (T-2). Piglets averaged 28 days of age (weaning) and 8.5 kg at the beginning of the 28-day trial. Feed intake, weight gain and FCR were recorded for two 14-day periods. Medical treatments and fecal scores were recorded daily. Data were analyzed by ANOVA and means were compared using the test of Tukey-Kramer.

The mycotoxin-contaminated straw had no effect on piglet performance. However, piglets receiving the diet supplemented with a mycotoxin adsorbent performed significantly better during the first trial period (d1-14) than piglets receiving the non-supplemented control diet (weight gain: C: 217.6g^a, S: 226.2g^a, S+A: 275.8g^b, SE: 11.5 g (P<0.05); FCR: C: 1.65^A, S: 1.54^{AB}, S+A: 1.38^B, SE: 0.06 (P<0.10)). The feed was designed to contain low levels of mycotoxin, however analyses revealed 220 ppb on DON, while both ZEA (< 10 ppb) and T-2 (< 50 ppb) were below detectable limits. The data suggest that in piglets exposed to weaning stress, DON levels as low as 220 ppb can decrease performance. Mycotoxin adsorbent can help in alleviating the negative effects on performance.

Key words: Straw, Mycotoxin, DON, Adsorbent, Piglet, Mycosorb

On the effects of a chronic deoxynivalenol (DON) intoxication on performance of pigs when feed is offered for *ad libitum* consumption or fed restrictive

Tanja Goyarts and Sven Dänicke

Institute of Animal Nutrition, Federal Agricultural Research Centre (FAL),
Bundesallee 50, 38116 Braunschweig, Germany

Wheat infected naturally with *Fusarium*, contaminated mainly with DON (7.02-8.39 mg DON per kg wheat), was included in diets for fattening pigs at 400 g/kg. Control and DON-contaminated feed were either offered for *ad libitum* consumption or fed restrictively in such a way that the restrictive control-group was fed the same amount of feed that was eaten completely by all pigs in the restrictive DON-group. Each of the feeding variants was tested on 12 pigs of both sexes over a period of 11 weeks (26-100 kg bw). Live weight gain and feed consumption were recorded weekly. Additionally, the time required for complete uptake of the meal by the restrictively fed groups was recorded in Weeks 6 and 11, and again before slaughter. Blood was drawn from the vena jugularis at the beginning and after five weeks of the feeding experiment. Additionally, a balance study was carried out to examine the effects on nutrient digestibility and DON-metabolism. DON and its metabolite de-epoxy-DON were analyzed in physiological samples with HPLC after clean-up by immunoaffinity columns (IAC).

Feed intake was 2.85 kg/d, live weight gain 969 g/d and feed-to-gain ratio 2.77 kg/kg for the control-group fed *ad libitum*. The *ad libitum* DON-group consumed 13 % less feed and gained 12% less live weight, while the feed-to-gain ratio remained unaffected. Under restrictive feeding conditions (DON and control), pigs exhibited 32 %, 23 % and 10 % lower feed consumption, live weight gain and feed to gain ratio, respectively, than the control group fed *ad libitum*. Moreover, it was concluded that the lower growth performance of the DON group fed contaminated feed *ad libitum* mainly resulted from the lower feed intake, because there were no differences in live weight gain between the groups fed restrictively.

On the other hand, metabolizability of energy, digestibility of organic matter, crude protein and crude fat were significantly increased by 3, 6, 11 and 4 %, respectively, in the DON group.

Ingested DON was mainly excreted as the parent toxin with the urine (33.4-59.9%), and only to a small extent with faeces (0.1-7.8 %) in the DON and control group. The excretion of the metabolite de-epoxy-DON occurred only in the DON fed group where its proportion of DON intake amounted to 0-1.8 and 0-1.6 % in urine and faeces, respectively.

DON fed animals needed more time to consume the restrictive ration than the control group; for example in the first hour after feeding 85% of the control pigs had consumed all feed, but only 39% of the DON group had.

There were no differences in leukocyte and differential blood count between the groups as a result of the great variation between the individuals.

Funktionelle Pathologie des weiblichen Genitale beim prämaturnen Schwein nach definierter Zearalenon-Belastung

A. Reischauer, S. Döll¹, C. Ellenberger, S. Dänicke¹, U. Schnurrbusch², H.-A. Schoon

Institut für Veterinär-Pathologie, Universität Leipzig, An den Tierkliniken 33, D-04103 Leipzig

¹Institut für Tierernährung, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig

²Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik, Universität Leipzig, An den Tierkliniken 29, D-04103 Leipzig

Eine erhöhte Belastung von Futtermitteln mit den Mykotoxinen Zearalenon (ZON) und Deoxynivalenol (DON) sowie deren Derivaten werden als eine wichtige Ursache von Fruchtbarkeitsstörungen in der Schweinereproduktion angesehen. Die Auswirkungen der Fusarientoxine speziell auf die Fortpflanzungsleistung adulter weiblicher Tiere ist Gegenstand zahlreicher Studien; der direkte Einfluss dieser Toxine auf den Genitaltrakt prämaturner Schweine ist jedoch bislang nicht eindeutig geklärt.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Wirkung oral verabreichten ZON auf die Hypophysen-Gonaden-Uterus-Achse prämaturner weiblicher Schweine zu untersuchen.

Zu diesem Zweck standen 100 Ferkel einer Vier-Rassen-Gebrauchskreuzung zur Verfügung. Diese erhielten nach dem Absetzen im Alter von 4 Wochen (7,5 bis 16,5 kgKM) über einen Zeitraum von 35 Tagen in fünf Gruppen zu je 20 Tieren ad libitum eine Futtermischung mit 0, 6, 12,5, 25 bzw. 50% fusariumkontaminiertem Maisanteil. Dies entsprach einer Futtermittelbelastung von 0,01-0,42mg ZON und 0,2-3,9mg DON pro Kilogramm Futter. Am Tag der Schlachtung (35. Versuchstag) wurden Hypophyse, Ovarien und Uterus entnommen, gewogen, vermessen, in 4%igem Formalin fixiert und für (immun-)histologische Untersuchungen aufgearbeitet.

Eine detaillierte histomorphologische Charakterisierung aller Ovarien und Uteri erfolgte mittels konventioneller Lichtmikroskopie (H.E.). Zusätzlich wurden an repräsentativ ausgewählten Ovarien und Uteri (vier Tiere pro Gruppe) immunhistologische Methoden (Progesteron- (PR), Östrogenrezeptor (ER), proliferative-cell-nuclear-antigen (PCNA)) angewandt.

Im Rahmen der histomorphologischen Untersuchungen können innerhalb aller Gruppen, unabhängig von der Konzentration der Toxinbelastung, gleichermaßen sowohl Tiere mit inaktiven als auch aktiven (mit Follikeln in unterschiedlichen An- und Rückbildungsstadien) Ovarien dokumentiert werden. Darüber hinaus zeigen die Uteri mittels konventioneller Lichtmikroskopie keine eindeutigen gruppenspezifischen Unterschiede hinsichtlich des Auftretens und der Ausprägung von Ödematisierung, Faltung und Infiltration der Schleimhaut mit eosinophilen Granulozyten.

Lediglich die klinische Untersuchung ergab bei 85% der Tiere aus der Gruppe mit der höchsten Fusariumkonzentration im Futtermittel eine mittelgradige Vulva- und bei allen Tieren dieser Gruppe eine hochgradige Zervixschwellung.

Unabhängig von Aktivitätszustand der Ovarien und Toxinbelastung der Ferkel tritt innerhalb der Drüsenausführungsgänge, der glandulären Epithelien und der Stromazellen eine nahezu synchron verlaufende Expression von ER, PR und PCNA auf. Eine derartige Korrelation zwischen Expression von Hormonrezeptoren und PCNA lässt sich im luminalen Epithel nicht beobachten.

Während Literaturangaben zufolge bei zyklischen Sauen eine Intoxikation mit ZON zu spezifischen uterinen Alterationen führen kann, verdeutlichen die hier beschriebenen Ergebnisse, dass bei dem Verdacht des Vorliegens einer ZON-Mykotoxikose bei Ferkeln im Alter von ca. 70 Tagen aus Sicht der Pathologie, selbst mit detaillierten histomorphologischen und immunhistologischen Untersuchungen von Ovarien und Uterus, als bekannte Zielorgane von ZON, keine gesicherte ätiologische Diagnose hinsichtlich einer ZON-Intoxikation getroffen werden kann. Demnach sind das klinische Bild (z.B. Vulvaschwellung und -rötung, Vaginalprolaps, Milchdrüsenanschwellung) sowie die Futtermittelanalyse und/oder die Rückstandsuntersuchung in Blut (DON) und Galle (ZON) von betroffenen Tieren als diagnostisch verwertbare Parameter unabdingbar.

On the effects of a *Fusarium*-contaminated wheat and the feed intake level on ruminal fermentation and toxin-turnover of cows

(Einfluss eines *Fusarium*-kontaminierten Weizens und des Futteraufnahmeniveaus auf die Pansenfermentation und den Toxinumsatz bei Kühen)

Karen Matthäus, S. Dänicke, P. Lebzien, Hana Valenta, K. H. Ueberschär and G. Flachowsky

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

Ruminants appear to be relatively insensitive to the *Fusarium*-toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON), which can be attributed to the metabolism of these substances by microbes in the rumen. Several studies have demonstrated that DON is metabolised to de-epoxy deoxynivalenol (de-epoxy DON), whereas ZON is primarily degraded to β -zearalenol (β -ZOL) and α -zearalenol (α -ZOL). However, the information about the effects of DON and/or ZON and their metabolites on ruminal nutrient utilisation as well as factors which can influence these effects is relatively rare. Therefore, the objective of the present study was to investigate the coherence between varying levels of feed intake by using *Fusarium*-contaminated or not-contaminated wheat on toxin-turnover, and ruminal fermentation of cows.

14 dairy cows fitted with permanent fistulas in the dorsal part of the rumen and T-type cannulas in the proximal duodenum were used in the experiment. Diets containing 60 % concentrate (on dry matter basis) including 55 % wheat were completed with 40 % maize- and grass silage. All animals were fed the same diet, only the daily amount was adjusted to the current performance. Each cow was fed both the control wheat (control period) and the *Fusarium*-contaminated wheat (mycotoxin period; 8.21 mg DON/kg wheat and 0.08 mg ZON/kg wheat on dry matter basis). Total daily dry matter intakes ranged from 5.7 to 20.9 kg.

Each four week experimental period consisted of three weeks for adaptation to diets and one week for duodenal-sample collection. To estimate the digesta flow, Cr₂O₃ was used as marker.

Furthermore, blood samples were drawn from each cow in each treatment one day in the 3rd week to analyse the activities of the aspartate aminotransferase (ASAT), glutamate dehydrogenase (GLDH) and gamma glutamyl transferase (GGT).

The daily organic matter intakes ranged from 5.3 to 19.0 kg and from 5.2 to 19.1 kg/d in the control and mycotoxin period, respectively, which resulted in organic matter flows to the duodenum of 2.6 up to 11.4 kg/d and of 2.6 up to 10.4 kg/d. The *Fusarium*-contamination of the wheat significantly decreased the flow of undegraded protein with increased organic matter intakes. The activities of ASAT, GLDH, GGT and creatinine were unaffected by dietary treatment, but increased with feed intake.

The daily flow of DON and de-epoxy DON at the duodenum relative to the DON-intake varied between 12 and 77 % when the *Fusarium*-contaminated wheat was fed. The portion of DON and de-epoxy DON of the total DON + de-epoxy DON flow ranged between 1 and 6 % and 94 and 99 % in the mycotoxin period.

In conclusion, the feeding of *Fusarium*-contaminated wheat altered the ruminal protein degradation at increased organic matter intakes. Furthermore, the activities of ASAT, GLDH and GGT increased with feed intake independently of the *Fusarium*-contamination of the wheat.

The portion of de-epoxy DON of the total DON + de-epoxy DON flow did not vary widely between the different organic matter intakes. This suggests that the higher retention time of the feed, as an effect of the lower organic intake, did not result in a more extensive metabolism of DON to de-epoxy DON, but it possibly increases the available time for a complete degradation of the toxin.

Mykotoxine - Aktuelle Situation im Futtermittelrecht

Dr. Michael Elsinger

Bayarisches Staatsministerium für Umwelt,
Gesundheit und Verbraucherschutz

Kurzfassung

Das Thema Mykotoxine in Futtermitteln wird nach wie vor intensiv diskutiert. Diese Stoffwechselprodukte bestimmter Pilze, die in der gesamten Nahrungskette vorhanden sind, können sowohl die Gesundheit der Menschen als auch die Gesundheit und Leistungsfähigkeit von Tieren beeinträchtigen. Eine wichtige Eintragsquelle in der tierischen Erzeugung sind kontaminierte Futtermittel. Besonders in der Fütterung von Zuchtsauen und Aufzuchtferkeln aber auch bei Milchkühen verursacht belastetes Futter verminderte Futteraufnahme, schlechte Zunahmen, erhöhte Umrauschequoten oder verminderte Fruchtbarkeitsleistungen mit negativen Auswirkungen auf die Entwicklung der ungeborenen Föten bis hin zu Aborten.

Im Futtermittelrecht existieren derzeit Grenzwerte für Aflatoxin B1 und für Mutterkorn (unerwünschte Stoffe - Anlage 5 der Futtermittelverordnung). Für die unter unseren klimatischen Bedingungen weit verbreiteten Fusarientoxine Desoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA) existieren für die amtliche Futtermittelüberwachung bislang sogenannte Orientierungswerte. Diese sind auf die Tagesration der entsprechenden Tierarten ausgerichtet und dienen dazu, die Ursachen für die Belastung zu ermitteln, die Situation zu bewerten und die entsprechenden fachlich gerechtfertigten Maßnahmen zum Schutz für Mensch und Tier einzuleiten. Nach bisherigem Kenntnisstand ist die Rückstandsbildung in Milch, Fleisch und Eiern unter praktischen Fütterungsbedingungen bei DON und ZEA sehr gering. Die empfohlenen Orientierungswerte sind ausschließlich unter dem Gesichtspunkt der Sicherung der Gesundheit und Leistung von Schwein, Rind und Huhn abgeleitet. Die Orientierungswerte sind keine Höchstgehalte oder Grenzwerte und unterliegen deshalb derzeit auch nicht dem seit 2003 geltenden Verschneidungsverbot.

Die EU plant jedoch auch für Futtermittel Grenzwerte für die Mykotoxine DON, ZEA und für Ochratoxine. Derzeit prüft die EU-Lebensmittelbehörde die Schädlichkeit dieser Mykotoxine vor allem für Tiere. Für das koordinierte Kontrollprogramm Futtermittel 2004 hat die EU u.a. einen Schwerpunkt der Untersuchung auf Mykotoxine (Aflatoxin B1, DON, Fumonisine und Ochratoxin A) empfohlen, mit dem Ziel, Informationen und Daten aus aufeinander folgenden Jahren zu gewinnen.

Schlüsselwörter: Mykotoxine, Futtermittelrecht, Orientierungswerte

Mykotoxine und Verbraucherschutz

Manfred Gareis

Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, Bundesanstalt für Ernährung und Lebensmittel, (BFEL), Standort Kulmbach, E.-C. Baumann Str. 20, 95326 Kulmbach

Die von verschiedenen Schimmelpilzen als Stoffwechselprodukte gebildeten Mykotoxine können als unerwünschte Kontaminanten in Lebensmitteln, vor allem Produkten pflanzlicher Herkunft, nicht völlig vermieden werden.

Das Hauptinteresse für den Verbraucherschutz ist daher darauf gerichtet, die Entstehung und Kontamination von Mykotoxinen in Lebensmitteln weitestgehend zu verhindern und die Mykotoxingehalte in Lebensmitteln auf ein Minimum zu reduzieren. Ein besonderes Augenmerk gilt dabei diätetischen Lebensmitteln für Säuglingen und Kindern.

Der Beitrag informiert über die Vorgehensweise bei der Festsetzung von Höchstmengen, bei denen neben wissenschaftlichen Grundlagen, die eine Abschätzung des Risikos für den Verbraucher erlauben, ökonomische und politische Aspekte eine Rolle spielen.

Am Beispiel des vor kurzem beendeten SCOOP Projektes 3.2.10 über Fusarientoxine wird näher gezeigt, wie innerhalb der EU die Belastung der verschiedenen Nahrungsmittel und die Aufnahme dieser Toxine durch die Verbraucher ermittelt wurden. Diese Daten stellen die Basis für die Risikoabschätzung und die Ableitung von Höchstmengen für wichtige Mykotoxine in relevanten Lebensmitteln dar.

Der Beitrag gibt schließlich einen kurzen Überblick über das deutsche Präventionsprogramm Mykotoxine innerhalb des Aktionsplanes Verbraucherschutz, die derzeit gesetzlichen Regelungen für Mykotoxine in Lebensmitteln und einen Ausblick auf zu erwartende Bestimmungen.

**Effect of dietary sodium bicarbonate supplementation on the toxicokinetics of ochratoxin A in pigs.
(Zum Einfluss einer Natriumhydrogencarbonat-Zulage auf die Toxikokinetik von Ochratoxin A beim Schwein)**

R. Blank und S. Wolffram

Institut für Tierernährung und Stoffwechselfysiologie, Christian-Albrechts-Universität,
24098 Kiel

Introduction: Ochratoxin A (OA) is a mycotoxin produced by several species of *Aspergillus* and *Penicillium*. It is regarded as a causative agent for endemic nephropathy in farm animals and humans. Due to extensive reabsorption along the nephron, OA accumulates in the kidney. This is of toxicological importance because renal reabsorption contributes to the long half-life of the mycotoxin in the body. Microinfusion studies in rats showed, that reabsorption of OA results from nonionic diffusion and by carrier-mediated mechanisms indicating that urine alkalinization may help to accelerate OA excretion and thus reduce its toxicity. The aim of the present study was to investigate the effect of a dietary sodium bicarbonate supplementation as a means to increase urinary pH on the systemic availability and excretion of OA in pigs.

Methods: Seven pigs (36.7 ± 2.0 kg), equipped with a permanent jugular vein catheter were assigned to the following two treatments. Treatment 1 (control group, n=3) received a commercially available pig diet with 13.5 MJ ME and 17.4 % crude protein, while treatment 2 (sodium bicarbonate, n=4) received the same diet supplemented with 2 % sodium bicarbonate. Dietary electrolyte balance (Na+K-Cl) of the control and sodium bicarbonate group were 170 and 400 meq/kg, respectively. The animals were fed twice daily and daily feed intake was 1400 g/d. After an adaptation period of 4 d, all animals received a single dose of 150 g wheat containing 2.42 mg OA, 0.36 mg OB, 0.03 mg O α and 0.1 mg O β . After exposure to OA, jugular blood samples, urine and faeces were collected over a period of 96 h. Ochratoxin A, OB, O α and O β were analyzed in blood serum, urine and faeces by HPLC.

Results: Daily gain and feed efficiency were not influenced by treatment. Supplementation of sodium bicarbonate increased ($P < 0.05$) urinary pH (5.68 ± 0.20 vs. 8.25 ± 0.12) and daily urine volume (1108 ± 276 vs. 2479 ± 912 ml). Sodium bicarbonate reduced ($P < 0.05$) the systemic availability of OA and OB based on AUC (area under the curve) values to 75 and 68 % compared to the control group. This effect was mainly due to an increased elimination of OA and OB in the urine.

Table 1: Excretion of OA, OB in urine and faeces in % of its respective intake.

		Control	Sodium bicarbonate		Control	Sodium bicarbonate
Urine	OA	5.5 ± 1.9^A	16.5 ± 4.2^B	OB	26.9 ± 5.1^A	60.4 ± 16.0^B
Faeces	OA	0.8 ± 0.2	1.1 ± 0.8	OB	7.2 ± 0.8^A	1.5 ± 3.2^B

^{A, B} Means in the same row with different superscripts in each table differ ($P < 0.05$)

Conclusion: The results of this study show that alkalinization of urinary pH accelerates the renal excretion of OA and OB. The faster renal elimination might be explained by a reduced reabsorption of OA by nonionic diffusion, because at higher urinary pH OA mainly exists in its ionized form. It is further concluded, that urinary alkalinization may be an efficient means to partially reduce the toxic effects of OA in pigs.

Modulation of ochratoxin A induced DNA damage in urothelial cell cultures

Gisela H. Degen, Stefan Lebrun, Yury Lektarau, Wolfram Föllmann

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

Ochratoxin A (OTA) is a widespread mycotoxin contaminant of human and animal foods. Exposure to high dietary levels of OTA has been associated with chronic renal disease and a higher incidence of urinary tract tumors in humans. OTA can cause nephropathy in pigs, and is carcinogenic in rodents. A genotoxic potential of OTA has been demonstrated in vitro and in vivo, the mechanism of OTA-induced genotoxicity (direct or indirect ?) is still unclear. This calls for a further characterization of the OTA-induced DNA damage, and investigations of factors which modulate dose-effect relationships in cells.

The effects of the mycotoxin were studied in cultures of human bladder carcinoma (H5637) cells, and of porcine urothelial cells (PUBEC), since bladder epithelium is a target tissue for the toxicity of OTA. Cytotoxicity was measured by Neutral red uptake and Alamar-Blue assay. DNA damage was assessed by alkaline single cell gel electrophoresis (Comet-assay) measuring both tail length and tail moment.

Cytotoxic effects of OTA were concentration- and time-dependent: Upon 24 h treatment of cells, NR uptake was inhibited by 20 and 50% (IC_{20} and IC_{50}) with OTA concentrations of 0.01 and 0.2 μ M, respectively; they caused no measurable effects with 3 h treatment. Since cytotoxicity of OTA was not affected by S-9 mix, *i.e.* addition of xenobiotic metabolizing enzymes, it appears to be unrelated to biotransformation of the mycotoxin. Moreover, addition of S-9 mix did not significantly affect the genotoxicity of OTA as studied by Comet assay. DNA damage (strand breaks) in the cells was detectable after 3 h of treatment at OTA concentrations between 0.1 and 1 μ M, and increased further at higher concentrations. The magnitude of the OTA induced genotoxic effect did not increase with longer treatment times (18 and 24 h), probably due to repair processes in the cells. Repair of OTA-induced lesions was inhibited by araC/hydroxyurea; upon recovery of cells in fresh (toxin-free) medium for about 3 hours, the DNA damage decreased to undetectable levels. Interestingly, the genotoxicity of OTA is modulated by the pH of the culture medium, with higher damage at pH5 compared to pH7.5. In line with the pK_a of OTA, recent uptake studies with tritiated OTA show a higher cellular accumulation of OTA at pH5 than in buffer of pH7.5. This data indicate that bladder cells exposed to OTA in slightly acidic urine (which facilitates reabsorption) may be at higher risk.

From this and work by others it can be concluded that OTA-induced damage in cells is primarily clastogenic and involves oxidative DNA-lesions. Data on the repair of such lesions, and dose-response relationships for DNA-damage detected in vitro by the Comet assay support the existence of threshold concentrations for cellular effects of OTA, an observation important for a risk assessment based on mechanistic data.

Monitoring of mycotoxins biomarkers in the Czech Republic

Vladimir Ostry¹, Frantisek Malir², Tomas Roubal², Jarmila Skarkova¹, Jiri Ruprich¹,
Milena Cerna³, Edmond E. Creppy⁴

¹ National Institute of Public Health Prague, Centre for the Hygiene of Food Chains, NRC for Microfungi and Mycotoxins in Food Chains, Palackeho 1-3, 612 42 Brno, CZ

² Institute of Public Health Hradec Kralove, CHL, NRL for Biomarkers of Mycotoxins and Mycotoxins in Food, Nezvalova 958, 500 02 Hradec Kralove, CZ

³ National Institute of Public Health Prague, Srobarova 48, 100 42 Prague, CZ

⁴ Laboratory of Toxicology and Applied Hygiene, University of V. Segalen, 146 r. Leo Saignat, 33 076 Bordeaux Cedex, France

Mycotoxins - aflatoxins (AF) and ochratoxin A (OTA) are widely distributed and produced by several toxigenic microfungi occurring in mouldy food and feed. Their acute and chronic toxic effects are well known. The evaluation of the possible risk of AFB₁ and OTA to human health requires to estimate their daily intake by the population or to determine their markers in biological materials, e.g. blood serum, urine, milk. AFM₁ in urine can be used as the marker of exposure due to the good correlation between its excretion and intake of AFB₁ from food. The advantage of urine consists in the non-invasive method of its collection. The determination of OTA in blood serum proves advantageous too because the only type of sample is analyzed, contrary to determinations in different foodstuffs. However, it must be born in mind that due to relatively long-life of OTA in human blood (cca 35 days) the OTA concentration in blood may be higher than in daily diet.

The occurrence of aflatoxins and OTA may differ year by year. Therefore, it is important to monitor AFM₁ and OTA occurrence regularly. In the Czech Republic the presence of mycotoxins has been systematically monitored in biological materials. Monitoring programme guaranteed by the National Institute of Public Health in Prague initiated by the resolution No. 369/1991 of the Government of the Czech Republic, the Czech Republic Law Digest. Since 1994 OTA has been monitored in the serum of adult blood donors (*Institute of Public Health Hradec Kralove*). Since 1997 AFM₁ has been monitored in the urine of adult blood donors (*National Institute of Public Health in Prague, Centre for the Hygiene of Food Chains in Brno*). 2206 blood serum samples for OTA and 205 urine samples for AFM₁ have been analyzed up to now. Blood serum samples and urine samples have been obtained from four areas in Czech Republic.

The cleaning of OTA in human serum and AFM₁ in urine was carried out using immunoaffinity columns. The validated and accredited methods were used for quantification of OTA in human serum (HPLC: LoQ = 0,1 µg/L) and AFM₁ in human urine (ELISA: 125 pg/L, HPTLC: 5 ng/L). The results of determination of AFM₁ in urine were expressed by determining of creatinine in urine and calculated and expressed to 1 g of creatinine.

OTA was determined in 94,2 % samples of human serum, range 0,1-13,7 µg/L, mean 0,28 µg/L, median 0,2 µg/L and 90%percentile 0,5 µg/L in years 1994-2002. AFM₁ was determined in 72 % samples of human urine, range 19-6064 pg/g creatinine, mean 367 pg/g creatinine, median 158 pg/g creatinine and 90%percentile 755 pg/g creatinine in year 1997. AFM₁ was determined in 43,8 % samples of human urine, range 21-19219 pg/g creatinine, mean 414 pg/g creatinine, median 96 pg/g creatinine and 90% percentile 415 pg/g creatinine in year 1998.

The developed methods can be used for epidemiological studies when comparing the exposure to aflatoxins and ochratoxin A of various groups of population (e.g. vegetarians, patients with chronic renal insufficiency, hepatitis B positive /HBsAg+).

Molekulare Diagnose ochratoxinogener *Aspergillus*-Arten

Holger Schmidt, Ludwig Niessen, Rudi F. Vogel

TU München, Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, Wehnestephaner Steig 16, 85354 Freising

Toxigene und nicht toxigene schwarze Aspergillen, die dem *Aspergillus niger* Aggregat und *A. carbonarius* angehörten wurden mittels DNA-Fingerprinting miteinander und mit Stämmen anderer Arten verglichen. Die AFLPs zeigten eine klare Abgrenzung von *A. niger* und *A. carbonarius*. Es konnte jedoch keine klare Korrelation zwischen genetischer Ähnlichkeit der Stämme und dem Potential Ochratoxin A zu produzieren gefunden werden. Basierend auf AFLP wurden Marker-Sequenzen ausgewählt und für die Konstruktion von SCAR-PCR Primern genutzt. Mit Hilfe dieser Primer wurden PCRs entwickelt und hinsichtlich Empfindlichkeit und Spezifität für die Detektion von *A. carbonarius*, dem Pilz der als einer der Hauptverursacher von Ochratoxin A in Kaffee und in aus Weintrauben erzeugten Produkten gilt, optimiert. Ein ähnlicher Ansatz wurde für *A. ochraceus*, ein weiterer Pilz von Interesse bezüglich Ochratoxin A Kontamination von Kaffee, verfolgt. Die Cluster Analyse von *A. ochraceus* Isolaten, hauptsächlich von brasilianischem Kaffee, zeigte eine sehr enge genetische Verwandtschaft der meisten Stämme. Drei artspezifische SCAR-PCR Primerpaare wurden entwickelt und eines davon für die PCR- und Real-Time-PCR-basierende Detektion von *A. ochraceus* in grünem Kaffee genutzt. Der Gehalt an *A. ochraceus*-DNA in grünem Kaffee wurde bestimmt und mit den Ochratoxin A Konzentrationen verglichen. *A. ochraceus* konnte schnell und spezifisch in grünem Kaffee gefunden und quantifiziert werden. Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen DNA-Menge und Ochratoxin A-Gehalt

PCR-Based Diagnosis of Trichothecene Producers in the *Fusarium*-Section *Sporotrichiella*

Ludwig Niessen, Holger Schmidt, Rudi F. Vogel

TU-München, Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, Weihenstephaner Steig 16, 85350 Freising

According to Marasas et al. (1984), the *Fusarium* section *Sporotrichiella* includes *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. chlamydosporum*, and *F. tricinctum*. Classification is mainly based on production of globular to sub-globular microconidia born in false heads on monophialides or polyphialides with chlamydospores produced singly or in pairs. However, progress in application of molecular biological techniques and chemotaxonomy provided evidence that the species concept in that section should be re-evaluated. Recently, Torp and Langseth (1999) identified a group of highly potent T-2 toxin producing isolates which are morphologically distinct from *F. poae* as well as from *F. sporotrichioides*. Subsequent studies revealed presence of such isolates in all parts of Europe and the U.S.A. Aimed at clarification of the taxonomic position and toxicological features, more than 111 representative strains of *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. sporotrichioides* var. *minus*, *F. kyushuense* (Aoki and O'Donnell, 1998) and the newly described *F. langsethiae* (Torp and Nirenberg, 2004, in press) were analysed with various different techniques in a polyphasic approach under COST action 835.

In order to set up species specific PCR-based detection systems for the species treated, taxon specific oligonucleotide primers were designed from sequences of a 658 bp portion of the *tri5* gene of *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. langsethiae* and *F. kyushuense*, respectively. Primers were combined with the *tri5* generic forward primer Tox5-1 (Niessen and Vogel, 1998). The new reverse primers enabled specific amplification of a fragment of approximately 400 bp from DNA isolated from strains of the respective taxa. All primers were tested for cross reactivity with DNA from 26 fungal species potentially capable of producing trichothecenes. The primer designed for *F. langsethiae* cross reacted with *F. sporotrichioides*. Primers for *F. kyushuense*, *F. poae*, and *F. sporotrichioides* were species specific. PCR assays were applied to analysis of artificially infected barley and naturally infected samples of oats. On artificially infected barley, species were selectively detected by the corresponding primers. In naturally infected oats, *F. langsethiae* was identified by the combination of two PCR assays designed for detection of *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae*, respectively.

Aoki, T., O'Donnell, K. (1998) *Fusarium kyushuense* sp. nov. from Japan.

Mycoscience **39**: 1-6.

Marasas, W.F.O., Nelson, P.E., Toussoun, T.A. (eds.) (1984). Toxigenic *Fusarium* Species -Identity and Mycotoxicology. 1st Ed. The Pennsylvania State University Press, London.

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

Torp, M., Langseth, W. (1999). Production of T-2 toxin by a *Fusarium* resembling *Fusarium poae*. *Mycopathologia* **147**: 86-96.

Torp, M., Nirenberg, H.I. (2004) *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe. *International Journal of Food Microbiology*, in press.

Bildung von Mykotoxinen in Guttationströpfchen

Manfred Gareis

Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, Bundesanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BFEL), Standort Kulmbach, E.-C. Baumann Str. 20, 95326 Kulmbach

Guttationströpfchen sind wässrige Exsudate, die von Schimmelpilzen an der Myceloberfläche gebildet werden können. Bislang war nicht bekannt, ob toxinogene Schimmelpilzisolat Mykotoxine über diese Exsudate sezernieren.

Sechs Ochratoxin A produzierende Schimmelpilzisolat (*Penicillium verrucosum*, 4 x *Penicillium nordicum*, *Aspergillus ochraceus*) wurden zunächst auf ihre Fähigkeit zur Exsudatbildung nach Kultivierung der Stämme auf Malzextraktagar (MEA) und Czapek-Yeast-Agar (CYA) überprüft und die Toxinkonzentration in den mit Mikroliterspritze gewonnenen Guttationströpfchen mit zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Fluoreszenzdetektion bestimmt. Die qualitative HPLC-Analyse wurde über die Derivatisierung der Toxine zu Methylestern und erneuter Chromatographie abgesichert. Die quantitative Auswertung erfolgte durch den Vergleich der Proben mit Standardtoxinen.

Die zwei Exsudatbildner *P. verrucosum* SP 1002 und *P. nordicum* 1840 wurden danach als Ein-Punkt-Kulturen im Dreifachansatz auf CYA über 15 Tage kultiviert und das Exsudat sowie die Schimmelpilzmycelien und die Nährböden mit der HPLC-Methode auf OTA und OTB analysiert. Mycelien sowie die Nährböden wurden zuvor mit Chloroform extrahiert.

P. verrucosum SP 1002 bildete insgesamt 91 µl Exsudat mit einer durchschnittlichen Konzentration von 92,6 ng OTA/ml und 159,7 ng OTB/ml. Im Mycel und Nährboden wurden mit 9 ng OTA und 4,3 ng OTB/g bzw. 65,3 ng OTA und 17,3 ng OTB/g deutlich niedrigere Konzentrationen nachgewiesen.

P. nordicum SP 1840 produzierte durchschnittlich 110 µl Exsudat/Ansatz. Die mittlere Konzentration lag mit 2.045 ng OTA/ml und 1.953 ng OTB/ml ebenfalls deutlich höher als im verbleibenden Mycel und Nährboden (819,3 ng OTA und 409,6 ng OTB/g bzw. 37,3 ng OTA und 22 ng OTB/g).

Mit den Untersuchungen konnte erstmalig gezeigt werden, dass Mykotoxine von toxinbildenden Schimmelpilzisolaten, die auf Getreide und anderen Lebensmitteln anzutreffen sind, in hoher Konzentration über Wassertröpfchen quasi „ausgeschwitzt“ werden und auf diesen Weg auch möglicherweise das umgebende Substrat kontaminieren können.

Poster

Interference of Arachidonic acid and its Metabolites in TNF- α Release by Ochratoxin A from Rat Liver

AL-Anati , E. Petzinger

Department of Veterinary Medicine, Institute of Pharmacology and Toxicology, Justus-Liebig-University Gießen, Frankfurter Str. 107, D-35392 Gießen, Germany

Abstract

Introduction: Ochratoxin A is ubiquitously produced by toxicogenic species of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Penicillium* fungi in food under storage conditions. It causes widespread toxicological response as it is genotoxic, and carcinogenic, nephrotoxic, hepatotoxic, embryotoxic, and teratogenic. Immune system is considered to be the most sensitive organs. Immunotoxic activity of OTA includes inhibition of immune responses transmitted by B- and T-lymphocytes, macrophages, and NK-cell, thereby promoting increased susceptibility to viral and bacterial infections. In such cells OTA leads to inhibition of DNA synthesis (1). On the other hand, release of the proinflammatory and apoptotic cytokine TNF- α from blood-free perfused rat liver by unknown mechanisms reported (2,3).

Aim: We investigated the role of arachidonic acid and its metabolites on OTA mediated TNF- α release from liver cell. Isolated rat livers were perfused with 2% dextran Krebs-Henseleit solution via the portal vein at 37 °C for 90 minutes. Ochratoxin A (2.5 μ mol/L), arachidonic acid (10 μ mol/L), aristolochic acid (50 μ mol/L), caffeic acid phenylethyl ester (10 μ mol/L), and investigated drugs were added to perfusion medium and TNF- α from the perfusate was determined by ELISA during 90 min.

Results: TNF- α concentration in perfusion buffer increased time dependently after administration of OTA from 35 to 2600 pg/ml after 90 minutes. 50 μ mol/L of aristolochic acid, a phospholipase A2 inhibitor, and 10 μ mol/L of exogenous arachidonic acid decreased TNF- α to sub-control level. 10 μ mol/L of indomethacin, a potent inhibitor of the cyclooxygenase pathway, increased TNF- α concentrations in perfusion solution after 50 minutes to reach 5600 pg/ml at 90 minutes. On the other hand, inhibition of lipoxigenase by 30 μ mol/L nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and CYP-450 pathway by 100 μ mol/L of metyrapone, decreased TNF- α to sub-control level as well. Moreover, concurrent administration of two blockers (COX inhibitor with LPX inhibitor or COX inhibitor with CYP-450 inhibitor, or LPX inhibitor with CYP-450inhibitor) blocked TNF- α release beneath control level. Also 10 μ mol/L caffeic acid phenylethyl ester, an NF-kB inhibitor, blocked OTA mediated TNF- α release.

Conclusion: Arachidonic acid and its cyclooxygenase metabolites are suppressors of OTA mediated TNF- α release from liver, whereas LPX and CYP-450- metabolites do have an opposite influence. In addition OTA induced TNF- α release likely occurs via the NF-kB transcription factor pathway.

References: (1)StØrmer, F, Lea T, *Toxicology* 95: 46-50, 1995. (2)Weidenbach, et al. *Mycotoxin Res* 16A: 189-193, 2000 (3) Petzinger, E., Weidenbach, A., *Livestock Production Science* 76, 245-250, 2001.

Hemmung der aflatoxininduzierten Mikronucleusbildung in V79 Zellen durch monomere Catechine

J. Bauer¹, K. Meyer¹, K. Neubauer¹, J. Polster², W. Feucht³

¹ Department für Tierwissenschaften, Lehrstuhl für Tierhygiene, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU München, Weihenstephaner Berg 3, D-85350 Freising, Germany

² Department für Biowissenschaftliche Grundlagen, Lehrstuhl für Biologische Chemie, Fachgebiet Physikalische Biochemie, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU München, An der Saatzucht 5, D-85350 Freising, Germany

³ Department für Pflanzenwissenschaften, Lehrstuhl für Obstbau, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU München, Alte Akademie 16, D-85350 Freising, Germany

Eine Behandlung von V79 Zellen mit abgestuften Konzentrationen von Aflatoxin B₁ (0,10 -2,5 µg/mL) führte zu einer dosisabhängigen Bildung von Mikronuclei; dies ist eine Folge der genotoxischen Wirkung dieses Mykotoxins. Eine Vorbehandlung der Zellen mit (+)-Catechin (0,01, 0,10 und 1,00 mg/mL) und eine anschließende Inkubation mit Aflatoxin B₁ resultierte in einer signifikanten Reduktion der Mikronucleuszahl. Der Einsatz von (-)-Epigallocatechin-gallat, ein Flavanol das typischerweise in Teeblättern vorkommt, führte zu einem tendenziell gleichen, aber statistisch nicht signifikanten Ergebnis. Die offensichtliche Affinität von (+)-Catechin zum Zellkern wurde durch histochemische Untersuchungen unter Anwendung von p-Dimethylaminozimtaldehyd dargestellt. Catechin war fast ausschließlich an den Zellkern gebunden, was eine DNS-schützende Wirkung vermuten lässt.

Cleavers' seeds and their possible impact on *Fusarium* infection and mycotoxin contamination of wheat

Barbara Birzele, Alexander Prange

Landwirtschaftliche und Lebensmittel-Mikrobiologie, Institut für Pflanzenkrankheiten,
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Meckenheimer Allee 168, D-53115
Bonn, E-mail: b.birzele@uni-bonn.de

The host plants of *Fusarium* spp. include *gramineae* and weeds [1]. In organic farming, the occurrence of weeds in wheat cultivation is higher compared with the integrated farming as no herbicides are used. Considering different weed seeds as inoculum source of *Fusarium* infections, *Galium aparine* is of importance showing regular and relatively high *Fusarium* infection rates [2]. Whether seeds of *G. aparine* influence the infection rate with *Fusarium* species and mycotoxins in the post-harvest process, is unknown and was investigated exemplarily in the present study by means of storage trials.

Seeds of *G. aparine* were added to cleaned wheat from organic farming with the 10fold concentration compared with the initial concentration. Sample and controls were stored over a period of 12 weeks at a grain moisture of 20 % and at 20 and 15 °C within climatically controlled chambers. Unmoistened as well as moistened wheat was taken as negative control. Deoxynivalenol (DON) contents were analysed by ELISA (R-Biopharm R5906) and the *Fusarium* species were determined culturally and by multiplex-PCR.

The initial *Fusarium* infection rate of the wheat and the seeds of *G. aparine* was very low with 1 % and 1.5 % respectively. In the unmoistened control the infection rate of 1% did not change during storage. *Fusarium* infection in the moistened control and the sample enriched with seeds of *G. aparine* was 3 % at maximum and thus hardly higher. An influence on infection frequency with *Fusarium* species by seeds of *G. aparine* during suboptimal storage of wheat was not determined. These results do not yet permit conclusions concerning the influence of *G. aparine* seeds on the infection rate with *Fusarium* species and DON. Further investigations using wheat and seeds of *G. aparine* with higher *Fusarium* infection levels have to be carried out.

[1] Parry DW, Jenkinson P, McLeod L (1995) *Plant Pathol* **44**: 207-238

[2] Meier A, Birzele B, Oerke E-C, Steiner U, Krämer J, Dehne H-W (2001) *Mycotox Res* **17A**: 71-75

Untersuchung von Mutterkornalkaloiden mit LC-MS/MS in Getreideprodukten des Handels

Bockhorn I. und Drinda H.

SOFIA GmbH Rudower Chaussee 29 D-12489 Berlin

Um einen Überblick über die derzeitige Belastungssituation mit Mutterkornalkaloiden in Getreide-erzeugnissen zu erhalten, wurden ca. 50 Getreideprodukte (Brote, Mehle, Flocken, Backmischungen und Müsli) aus dem Berliner Einzelhandel im März und April 2004 gekauft und auf deren Gehalt an Ergonovin (Ergometrin), Ergotamin, Ergocornin, Ergokryptin und Ergocristin (und deren Isomeren) untersucht. Die Extraktion (2.5g/20ml) erfolgte in Anlehnung an frühere Arbeiten [1, 2] mit ammoniakalischen Ethylacetat, wobei auf den Zusatz von Dichlormethan verzichtet wurde. Weitere Aufreinigungsschritte sind aufgrund der hohen Selektivität des LC-MS/MS-Detektionssystems nicht erforderlich. Zur Entfernung des Extraktionsgemisches wurde 1ml Extrakt im Stickstoffstrom abgeblasen, der verbliebene Rückstand in 1 ml HPLC-Eluent aufgenommen, membranfiltriert und 10µl injiziert.

LC-MS/MS-Parameter:

Agilent 1100 Pumpe mit Autosampler und Degasser

Säule: Zorbax RP aq 100x2.1 mm i.D. , 3.5µ (30°C)

Eluent A: 5mM Ammoniumacetat mit 1% Methanol

Eluent B: Acetonitril

Gradient: 25% B (0.5min) in 7.5 min auf 95% B ansteigend (4min)

Flussrate: 200µl/min

MS/MS-System: Applied Biosystems API3000, im positiven ESI Modus

Für jeden der Analyten wurden das Molekölion und zwei Fragmentionen parallel aufgezeichnet. Zur Quantifizierung wurde aus jeder Produktgruppe eine unbelastete Probe ausgewählt und mit unterschiedlichen Mengen der Analyten dotiert (Matrixstandards). Bei den frisch gelösten Ergotalkaloid-Standards konnte nach kurzer Zeit eine Verschiebung der Peakflächenverhältnisse beobachtet werden, die aus der Ausbildung der Gleichgewichte zwischen den beiden diastereomeren Strukturen resultiert [1,3]. Deshalb wurden die Peakflächen bzw. -höhen der beiden Isomeren addiert und als Summe ausgewertet.

Präsentiert werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen.

Literatur:

[1] Baumann et al., Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 76, 609-630 (1985)

[2] Klug et al., Z. Lebensm. Unters. Forsch. 186, 108-113 (1988)

[3] Wolff et al., Z Ernährungswiss. 27, 1-22 (1988)

Das Vorkommen der Fusarientoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) in österreichischen Futtermitteln der Ernte 2002

¹Böhm J., ¹Razzazi E., ¹Zentek J., ²Wiedner G.

¹Institut für Ernährung / Department für öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Veterinärmedizinische Universität Wien

²Niederösterreichische Landes-Landwirtschaftskammer

Getreide kann von Feldpilzen wie Fusarien befallen sein. Fusarientoxine wie DON und ZON kommen in teils hohen Konzentrationen in Futtermitteln vor. Feuchtwarmes Wetter während der Getreideblüte und minimale Bodenbearbeitung begünstigen den Fusarienbefall. Die jeweilige Befallssituation, das Mykotoxinspektrum bzw. die jeweiligen Mykotoxinbelastungen variieren sehr deutlich von Jahr zu Jahr und von Gebiet zu Gebiet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Futtermittelproben aus dem Raum Nieder- und Oberösterreich des Erntejahres 2002 analysiert. Die Proben wurden luftgetrocknet und mittels ELISA quantitativ bestimmt (RIDASCREEN DON und RIDASCREEN Zearalenon, R-Biopharm-AG).

Die meisten Futtermittel stammten aus der Schweineproduktion. Insgesamt 85 folgende Proben wurden analysiert: 19 Körnermaissilagen, 14 Körnermaisproben, 14 Gerste, 6 Hafer, 9 Weizen, 6 Triticale, und 7 Zuchtschweinefuttertypen. Sechs Futterproben wurden von Geflügelbetrieben geprüft, und fünf Ganzpflanzenmaissilagen wurden von Milchviehbetrieben analysiert.

Die DON Gehalte waren zwischen der Nachweisgrenze von 40 ppb und extrem hohen Werten im ppm-Bereich. Besonders auffällig waren die Maisproben, sowohl als Körnermais, -silagen und Ganzpflanzensilagen. Medianwerte von 663 ppb (Körnermaissilagen), 727 ppb (Körnermais) und 450 ppb in den Ganzpflanzensilagen stellen bedeutende DON-Quellen einer Belastung dar. Im Zuchtschweinefutter fanden sich die Konzentrationen des eingesetzten Körnermaises wieder. Der Median von 331 ppb liegt unter der in Österreich empfohlenen Höchstmenge von 0,5 ppm. Der DON-Gehalt im Geflügelfutter zeigte einen Median von 597 ppb. Dieser Wert ist beim Geflügel weit unter der 1 ppm Grenze, doch ein Einzelfall lag darüber. Im Gegensatz dazu waren sämtliche Getreidearten wie Gerste, Hafer, Weizen und Triticale nur gering mit DON belastet.

Die ZON Gehalte waren abgesehen von wenigen extrem hohen Werten in den Mais- und Getreideproben niedrig. Geflügelfutter und Milchviehfutter wurden nicht auf ZON untersucht.

Besonders sind Körnermais, -silagen und Ganzpflanzenmaissilagen mit DON kontaminiert gewesen und in Einzelfällen wurden DON-Konzentrationen im ppm-Bereich festgestellt.

Influence of a *Fusarium culmorum* inoculation of wheat on *in sacco* dry matter degradation of wheat straw and wheat chaff
(Zum Einfluss einer Inokulation von Weizen mit *Fusarium culmorum* auf den ruminalen Trockensubstanzabbau von Stroh und Kaff)

Ute Brinkmeyer, S. Dänicke, M. Lehmann, Hana Valenta, P. Lebzien, G. Flachowsky, Institute of Animal Nutrition, Federal Agricultural Research Centre (FAL), Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig, Germany

INTRODUCTION: When cereals are colonised by *Fusarium culmorum*, a contamination with mycotoxins such as deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) might be involved. Straw and chaff, as fibrous by-products from cereals grain production, are feedstuffs which supply an important source of fibre primarily for ruminants. Infestation of cereals with fusarium may result in loss of quality, feed value and modified structure properties.

Thus, the aim of this study was to investigate the effect of a *Fusarium culmorum* inoculation of wheat on *in sacco* dry matter degradation of wheat straw and wheat chaff in dairy cows.

MATERIAL AND METHODS: The ruminal dry matter degradability (DG) of wheat straw and wheat chaff from non-inoculated and *Fusarium*-inoculated wheat was measured using the nylon bag technique. Dried samples were milled to 3 mm and weighed into nylon bags and subjected to ruminal incubation in two dairy cows - fitted with permanent rumen fistulae. Samples were suspended into the rumen before morning feeding and withdrawn after each incubation period of 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96 and 120 h, followed by a washing process with cold water using an automatic washing machine. Samples were dried at 60 °C for 20 h and another 4 h at 103 °C to a constant weight. In addition, the washing losses from non incubated material of each sample were determined using the same method. The equation of Ørskov and McDonald (1979), $p = a + b(1 - e^{-ct})$ was used to describe the degradation kinetics, where p is degradation at time t and a, b and c are constants in the exponential equation.

RESULTS: Potential degradability (a+b) obtained for inoculated straw was lower than that of non-inoculated samples (Fig. 1, 44,8% vs. 56,2%), whereas no differences were found between chaff samples.

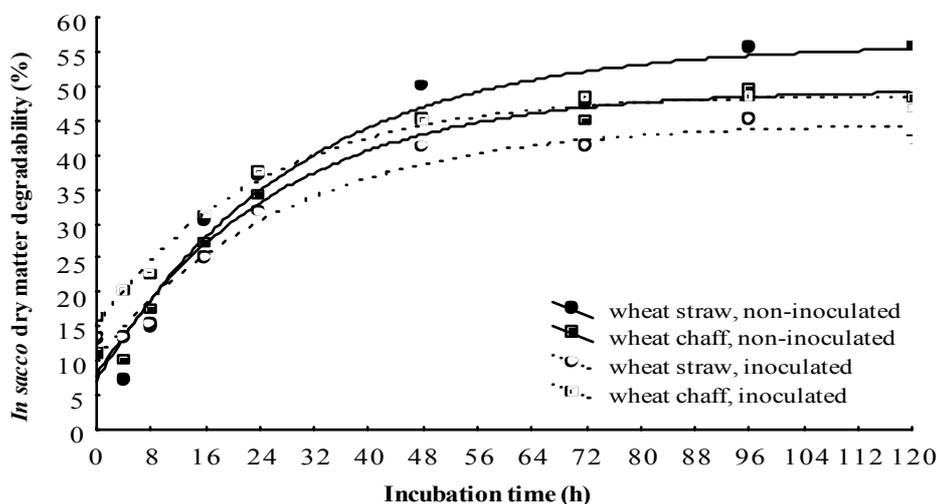


Figure 1. Dry matter degradability of wheat straw and wheat chaff inoculated with *Fusarium culmorum* and of non-inoculated wheat straw and wheat chaff.

Inoculated wheat straw showed a DG rate of 0,036/h and inoculated wheat chaff 0,042/h, whereas non-inoculated wheat straw had a DG rate of 0,035/h and non-inoculated wheat chaff 0,039/h.

**Progression of deoxynivalenol and zearalenone concentrations in straw
of wheat infected artificially with *Fusarium culmorum***
(Verlauf der Deoxynivalenol- und Zearalenon-Konzentrationen in Stroh
von mit *Fusarium culmorum* inokuliertem Weizen)

Ute Brinkmeyer, S. Dänicke, Hana Valenta, G. Flachowsky, Institute of Animal Nutrition,
Federal Agricultural Research Centre (FAL), Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig,
Germany

INTRODUCTION: *Fusarium culmorum* is a major pathogen causing Fusarium head blight (FHB) in wheat worldwide. Infection with *F. culmorum* may diminish the yield and quality of seed as well as of feedstuffs and foodstuffs. Wheat is an important source of energy and protein for farm livestock as well as in human nutrition. In this context, *F. culmorum* is well known for forming toxic secondary metabolites, called mycotoxins, such as deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON), which entail the possible risk of contamination of cereal grain and animal feed. Both compounds might cause toxic effects in agricultural animals and human beings. Straw and chaff are used both as a feedstuff and as bedding material. Both sources might contribute to the mycotoxin exposure of the animals. However, information on Fusarium toxin contamination of such materials is rather rare. Hence, this investigation aimed at following of the progression of the DON and ZON contamination within different fractions of wheat.

MATERIAL AND METHODS: Investigations were performed on samples from the FHB-susceptible wheat cultivar Ritmo. The wheat was cultivated after a pre-crop maize on an 11 ha experimental field in Mariensee/Germany in 2000, and followed by an inoculation of the wheat ears with *F. culmorum* at the beginning of full blossom in 2001. Whole wheat plants were sampled once a week from anthesis until harvest and fractionated into straw, glumes and spindles, which were then analysed for the fusarium toxins DON, using high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detector (DAD) and ZON, determined by HPLC with fluorescence detection.

RESULTS: As shown in Figure 1, the formation of DON increased in all of the three fractions after early milk ripeness as well as ZON in spindles, whereas the ZON concentration in glumes rose only after the mid-point of milky ripeness and the formation of ZON in straw even only after yellow ripeness.

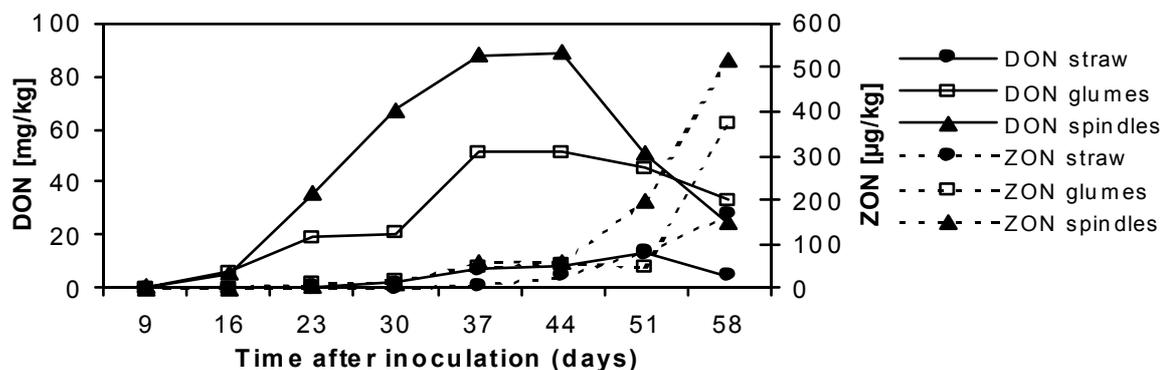


Figure 1. Concentrations of DON and ZON in different fractions of wheat after inoculation with *Fusarium culmorum*.

Highest concentrations of DON were found in spindles with a maximum of 88,9 mg/kg occurring 44 days after inoculation. Spindles of inoculated samples also showed the highest content of ZON with 517,2 µg/kg constituting a peak at the point in time of harvest.

Samples collected from the control plots possessed to some extent, due to natural infection, small amounts of both DON and ZON.

Bestimmung von Deoxynivalenol und Deepoxy-Deoxynivalenol in Milch

V. Curtui, C. Seidler, E. Schneider und E. Usleber

Professur für Milchwissenschaften, Justus-Liebig-Universität, Ludwigstrasse 21, D-35390
Giessen

Zur Bestimmung von Deoxynivalenol (DON) und Deepoxy-Deoxynivalenol (DOM-1) in Milch wurde eine HPLC-Methode mit UV/DAD-Detektion entwickelt. Zur Probenextraktion wurde Milch mit β -Glucuronidase inkubiert, um die konjugierten Toxine freizusetzen. Die Milch wurde anschließend zentrifugiert, entfettet und der pH-Wert auf $7 \pm 0,2$ eingestellt. Die so behandelte Milch wurde danach auf eine Immunaффinitätssäule für DON gegeben, die Toxine wurden mit Methanol eluiert und unter Stickstoffstrom eingengt. Der Rückstand wurde in 10% Acetonitril/Wasser (mobile Phase) gelöst. Als stationäre Phase der HPLC wurde eine C 18 RP-Säule verwendet. Zur Ermittlung der Wiederfindungsraten wurden Milchproben ($n = 11$) jeweils mit DON und DOM-1 künstlich kontaminiert (1 bis 10 $\mu\text{g/l}$) und wie beschrieben untersucht. Die Wiederfindungsraten lagen bei 97% ($\pm 7\%$) für DON und 84% ($\pm 5\%$) für DOM-1. Die Bestimmungsgrenze lag für beide Toxine bei jeweils 1 $\mu\text{g/l}$. In Vergleich zu den bisher beschriebenen Methoden weist diese Methode somit eine höhere Sensitivität auf. Mit der IAC-Aufreinigungssäule für DON konnte aufgrund der Kreuzreaktivität der Antikörper gleichzeitig der Metabolit DOM-1 aus den Proben isoliert werden.

Konsummilchproben ($n = 32$) aus dem Einzelhandel wurden mit der hier vorgestellten Methode untersucht. In keiner Probe wurden DON oder DOM-1 bzw. ihre Glucuronide nachgewiesen. Diese Ergebnisse sind somit konsistent mit publizierten Ergebnissen von Fütterungsversuchen, die gezeigt hatten, dass DON bzw. DOM-1 rasch und zum größten Teil über den Urin ausgeschieden werden und der Übergang in die Milch beim laktierenden Rind unbedeutend ist.

Dieses Projekt wird vom BMVEL über die Projektträgerschaft durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) gefördert (Az. 00HS055)

DON-Glycosides: Characterisation of Synthesis Products and Screening for their Occurrence in DON-inoculated Wheat Samples

Chiara Dall'Asta¹, Franz Berthiller¹, Rainer Schuhmacher¹, Gerhard Adam², Marc Lemmens³, Rudolf Krska¹

¹Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung, Department IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln, Österreich

²Institut für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Department für Angewandte Pflanzenwissenschaften und Pflanzenbiotechnologie, Universität für Bodenkultur Wien, Muthgasse 18, A-1190 Wien, Österreich

³Biotechnologie in der Pflanzenproduktion, Department IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln, Österreich

First evidence for metabolic transformation of a mycotoxin in plants was obtained from studies on the formation of DON in field corn infected with *Fusarium graminearum*. Mycotoxin concentrations in the corn reached a maximum and then declined during the growing season [1]. The basis for these declines appeared to be the modification of DON by plant enzymes [1,2]. These metabolites are usually not searched after in standard mycotoxin analysis. Nonetheless, metabolites and especially conjugates of DON could be transformed back to the free mycotoxin under certain conditions, like in the digestive tract of mammals. One main metabolite of DON, isolated from *Zea mays* suspension cultures, was identified as 3- β -D-Glucopyranosyl-4-deoxynivalenol (DON-3-glucoside) using 2-D-NMR and ESI-MS techniques [3].

Recently, Berthiller et al. successfully synthesized the 3-DON-glucoside and the 15-DON-glucoside. A preliminary characterisation of the synthesized products by means of a triple quadrupole mass spectrometer in combination with a linear ion trap was performed [4].

According to the complexity and variety of natural compounds and metabolic pathways, the search for "masked" DON should not be limited to the 3- and 15-DON-glucosides. Thus, it is necessary to have standards and instrumental methods for the analytical determination of other conjugated derivatives. Furthermore, the lack of knowledge about the metabolic formation of "masked" mycotoxins and about their toxicity and transformation under physiological conditions requires more accurate studies.

The aim of this work is to present a further study of the DON-glycoside synthesis and characterization of the products by LC-MS/MS. In particular, the results suggested the presence, as synthesis by-products, of both 7-DON-Glucoside and 8-DON-Glucoside, the latter probably due to the formation of iso-DON under alkaline conditions.

All the synthesized compounds were identified as glycosides and characterized by LC-MS/MS analyses. Moreover, the possibility to obtain other hexose derivatives (e.g. mannosides, fructosides etc.) under the proposed reaction conditions was investigated.

Finally, a preliminary screening of natural samples was performed, in order to establish the formation of DON-glucosides in DON-inoculated wheat.

[1] J. Miller et al., Can. J. Plant Pathol., **7**, 132-134 (1985)

[2] G. Engelhardt et al., Adv. Food Sci., **21**, 71-78 (1999)

[3] N. Sewald et al., Tetrahedron: Asymmetry, **3**, 953-960 (1992)

[4] F. Berthiller et al., Mycotoxin Research, **19(1)**, 47-50 (2003)

Untersuchungen zum Einfluss von natürlich mit Mykotoxinen kontaminiertem Mais bei Broilern

Dancea Z.¹, Baba A.I.¹, Macri A.¹, Drochner W.², Schollenberger M.²,
Morar M. V.¹, C. Catoi¹

¹ - Universität für Agrarwissenschaften und Veterinärmedizin, Cluj-Napoca, Rumänien

² - Institut für Tierernährung, Universität Hohenheim

Resultate von experimentellen Untersuchungen mit Broiler Küken, 21 - 42 Tage alt, gefüttert mit einem Alleinfutter mit einem Anteil an natürlich verschimmelter Mais von 10-14% werden dargestellt.

Bei den mykologischen Untersuchungen wurden, als vorherrschend, Myzeten der Gattungen Fusarium, Aspergillus, Rhizopus, Alternaria festgestellt. Von den Mykotoxinen wurde Zearalenone, in großen Mengen (über 2000 µg/kg), nachgewiesen.

Die Lebendgewichtszunahme der Broiler Küken aus der experimentellen Gruppe war vergleichbar mit der Lebendgewichtszunahme der Kontrollgruppe.

Die paraklinischen Untersuchungen haben bei der experimentellen Gruppe Modifizierungen erwiesen. So war die Tätigkeit der Glutamat-oxalacetat-transaminase, Glutamat-Pyruvat-Transaminase und der Amylase maßgeblich erhöht und der Cholinesterase verringert. Diese haben sich mit den morphologischen und histologischen Veränderungen positiv korreliert.

On the effects of supplementing a deoxynivalenol (DON) contaminated piglet diet with a probiotic feed additive on performance of piglets

Dänicke S., Döll S., Valenta H., Flachowsky G.

Institute of Animal Nutrition, Federal Agricultural Research Centre (FAL) Braunschweig,
Bundesallee 50, 38116 Braunschweig; Germany

Several microorganisms were shown to be capable to degrade the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) to the less toxic metabolite de-epoxy-DON under several *in vitro* conditions. Thus, it seemed to be justified to test feed probiotics currently registered and available at the market for their ability to degrade DON under *in vivo* conditions. If there is a DON-degradation effect of the probiotic within the digestive tract then this should be reflected by a decreased DON-concentration in serum since dietary DON-exposure is closely reflected by the DON concentration in serum in a dose-response related manner.

The piglet experiment (5 weeks duration, initial body weight was approximately 8 kg/animal) was designed according to a complete two by two factorial approach which meant that not only the DON-contaminated diet was tested in the absence and presence of the probiotic additive (BioPlus 2B[®]) but also the uncontaminated diet was tested in the same way. Artificially with *Fusarium culmorum* inoculated wheat was used as DON-source. The DON-concentration of the contaminated diets was 2.75 and 2.45 mg/kg diet without and with the probiotic additive.

Feeding of the diets containing the DON-contaminated wheat resulted in a consistent decrease in performance of piglets over the whole course of the experiment. The decrease in feed consumption ranged between 19 and 28 % when compared to the piglets fed the control diets.

The effect of the probiotics on feed consumption was inconsistent and ranged between – 9 % and 23 %. There was a trend for a feed consumption stimulating effect of the probiotic when supplemented to the control diet and a depressing or neutral effect when added to the contaminated diet.

Live weight gain was closely related to the changes described for feed consumption although the negative effects of feeding the contaminated diets were even more dramatic.

Supplementing the diets with the probiotics improved live weight gain significantly during the 1st week of the experiment. This effect was much more pronounced when the contaminated diet was considered. The improvement amounted to 16 % and 278 % when the probiotic was added to the control diet and to the contaminated diet, respectively. However, this effect completely disappeared during the further progression of the experiment. Cumulatively, the effect of probiotic supplementation on live weight gain remained statistically insignificant.

In conclusion, supplementing DON-containing diets with the probiotic BioPlus 2B[®] seems to be beneficial only shortly after weaning (1 to 2 weeks) as indicated by an improved live weight gain and feed to gain ratio.

However, this effect can not be referred as a detoxifying effect since DON-concentration in serum remained unchanged due to supplementing the DON-containing diet with the probiotics

Hydrothermal treatment of deoxynivalenol (DON) contaminated wheat and its effects on piglets

Dänicke S.¹, Valenta H.¹, Gareis M.², Lucht H. W.³, H. Graf von Reichenbach³

¹Institute of Animal Nutrition, Federal Agricultural Research Centre (FAL) Braunschweig, Bundesallee 50, 38116 Braunschweig; Germany

²Institute for Microbiology and Toxicology, Federal Centre for Meat Research (BAFF), EC-Baumann-Str. 20, D-95326 Kulmbach, Germany

³Amandus Kahl GmbH & Co. KG, Dieselstraße 5 - 9, D - 21465 Reinbek, Germany

Several studies were undertaken to examine the effects of a hydrothermal treatment of deoxynivalenol (DON)-contaminated wheat in the presence of sodium metabisulphite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) on DON reduction using a laboratory conditioner. It was found that treatment of a wheat batch containing 7.6 mg DON per kg with 10 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ per kg for 15 min at 100°C, at a moisture content of 22%, and a permanently saturated steam supply under permanent mixing, was sufficient to reduce the DON-concentration below the detection limit of 0.28 mg/kg.

The success of this treatment was confirmed in a piglet experiment (three weeks, initial average live weight 12.3 kg) where the hydrothermal treatment of the DON-contaminated wheat (40 % dietary inclusion) improved performance parameters to a greater extent as compared to a similar treatment of the uncontaminated control wheat. Overall daily live weight gain was 0.51, 0.56, 0.43 and 0.54 kg/d for piglets fed the uncontaminated wheat, the uncontaminated and treated wheat, the DON-contaminated wheat and the treated DON-contaminated wheat, respectively. The corresponding feed to gain ratios were 1.79, 1.58, 1.76 and 1.68 kg/kg. Moreover, DON-concentrations in serum of the piglets clearly reflected the analyzed DON-concentrations of the diets. DON-concentrations of the diets were 0.2, <0.03, 3.2 and 0.1 mg/kg, respectively, and DON-concentrations of serum were <5, <5, 15.5 and <5 ng/mL, respectively.

In addition, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ -treatment of wheat reduced the *in vitro* toxicity of DON-contaminated wheat and did not affect toxicity of the control wheat according to the MTT-test. The IC_{50} concentrations were 400, 400, 50 and 400 mg/mL of crude extract for untreated control wheat, for treated control wheat, for untreated DON-contaminated wheat and for treated DON-contaminated wheat, respectively.

It is concluded that $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ -treatment of DON-contaminated wheat is an effective tool to overcome the feed-intake depressing effects of DON in piglet feeding.

Efficacy of modified glucomannan (Mycosorb[®]) and HSCAS to alleviate the individual and combined toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens

G. Devegowda¹ and C. K. Girish²

¹Professor and Head, Division of Animal Sciences, ² Research fellow
Veterinary College, University of Agricultural Sciences, Bangalore, INDIA.

Introduction :

- Among the mycotoxins, Aflatoxin, Ochratoxin and T-2 toxin are important to the poultry industry as they are frequently encountered in the feedstuffs and are highly toxic. Consequently poultry producers are in need of a safe dietary additive to protect birds from potential hazard of these mycotoxins.
- The most promising and practical approach to this problem has been the addition of absorbents to contaminated feed to selectively bind the mycotoxin during the digestive process.
- Modified glucomannan (Mycosorb[®], Alltech Inc. USA), a cell wall derivative of yeast, has received much attention in minimizing the mycotoxins present in the contaminated diets of poultry and livestock.

Objectives :

- Evaluate the individual and combined effects of aflatoxin (AF) and T-2 toxin on Performance of broilers, Immune status, organ weights and post mortem lesions in broiler chickens.
- Evaluate the efficacy of modified glucomannan (Mycosorb[®]) and hydrated sodium calcium aluminosilicates (HSCAS) to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and T-2 toxin.

Materials and Methods :

Two dietary levels each of aflatoxin (0 & 2 mg / Kg), T-2 toxin (0 & 1 mg / Kg), modified glucomannan (0 & 1 Kg / ton) (Mycosorb[®]) and HSCAS (0 & 10 Kg / ton) were tested (4x3 factorial) on 720 day-old chicks from 0-5 weeks. The parameters include body weight, feed intake, antibody titers (ND & IBD), mortality, postmortem lesions, organ weights (liver, kidney, gizzard, thymus and bursa). The results were analysed using GLM of SAS[®].

Results :

AF and T-2 toxin individually depressed body weight and feed efficiency. AF increased relative weights of liver (21.72%), kidney (26.42%), and gizzard (16.8%), where as T-2 toxin showed increase in relative weights of liver (20%) and gizzard (10.82%). Reductions in relative size of thymus [by AF (23.3%) and T-2 toxin (18.56%)], bursa [by AF (30.1%)] and ND and IBD titers were noted. The mycotoxins interacted in an additive manner and caused significant reductions in body weight and feed intake. Significant interaction between AF and T-2 toxin were observed for their additive effects on relative organ weights and antibody titers.

Supplementation of Mycosorb (1 Kg/ton of feed) significantly ($p < 0.05$) improved body weight, feed conversion ratio and antibody titers, restored the organ weights and reduced the mortality whereas HSCAS (10 Kg/ton of feed) showed improvement in body weight, feed conversion ratio and organ weights in AF fed groups and no effect against T-2 toxin.

Untersuchungen zum Intermediärstoffwechsel nach Gabe mäßiger DON-Dosierungen am wachsenden Schwein

Winfried Drochner*, Simone Götz*, Margit Schollenberger*, Uwe Lauber* und Hans-Peter Piepho**

*Institut für Tierernährung und **Professur für Biostatistik
der Universität Hohenheim,
Emil-Wolff-Str. 10, 70599 Stuttgart

Nach Festlegung von Richtwerten für Deoxynivalenol (DON) in Futtermitteln kommt der Ermittlung potentieller negativer Effekte von längerfristigen Gaben von DON auf die Gesundheit wachsender Schweine unterhalb der Richtwertgrenze besondere Bedeutung zu.

Weibliche Absetzferkel wurden über einen Zeitraum von 8 Wochen bei mittleren Zuwachseleistungen mit definierten Gaben an Toxin (Kontrolle 300, 600 und 1200 µg isoliertes DON pro kg Futter-Trockensubstanz, n= je 8-9) versorgt.

Blut wurde in wöchentlichem Abstand genommen. An Blutparametern wurden erfasst: Weißes und rotes Blutbild, Hämoglobin, Hämatokrit, ausgewählte Leberenzyme, Parameter zum Proteinstoffwechsel. Die Daten wurden mit dem Wald-F-Test ausgewertet.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Bei restriktiver Fütterung wurde im angegebenen Dosierungsbereich stets eine vollständige Futteraufnahme erreicht. Gesundheitliche Beeinträchtigungen wurden bei allen Gruppen während der gesamten Versuchsdauer nicht beobachtet.

In den Versuchsgruppen ergab sich zulagenbedingt eine durchgängige Erhöhung der Blut-Harnstoffwerte mit großen Streuungen der Mittelwerte. Parallel waren die Blutglukosewerte signifikant erniedrigt. Die ASAT zeigte sich nach dem Wald F-Test signifikant erhöht, wobei die absolute Höhe des Mittelwerts nicht im pathologischen Bereich lag. Einige ausgewählte freie Serum-Aminosäuren erwiesen sich als zulagenbedingt signifikant erhöht.

Die negative Regression zwischen Blutglukose und Harnstoff war bei den beiden höheren DON-Dosierungsvarianten signifikant. Bei diesen lag auch eine signifikante Beziehung zwischen IgF-1 und Zuwachseleistungen vor.

Die Hämoglobinwerte waren nach dem Wald-F-Test signifikant erhöht. Eine potentiell negative Wirkung bereits von mäßigen DON-Dosierungen auf den Aminosäurestoffwechsel wird diskutiert.

Untersuchung der Ochratoxin A Biosynthese durch *A. ochraceus* beim Wachstum auf Kaffee.

Paul Färber, Anette Herrmann und Rolf Geisen

Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel - Standort Karlsruhe –
Haid-und-Neu-Str. 9, 76131 Karlsruhe

Paul.Faerber@bfe.uni-karlsruhe.de

Ochratoxin A (OTA) ist ein Isocumarin Abkömmling aus dem Sekundärstoffwechsel verschiedener filamentöser Pilze. Die wichtigsten Produzenten sind filamentöse Pilze, die zu den Genera *Aspergillus* (z.B. *A. ochraceus*, *A. carbonarius* und *A. niger*) und *Penicillium* (z.B. *P. nordicum* und *P. verrucosum*) gehören. Die Kaffeeproduktion und auch der erste Abschnitt in der Verarbeitung, die Kaffeefermentation, finden unter tropischen und subtropischen Klimabedingungen statt, daher kommen als OTA Produzenten nur Spezies des Genus *Aspergillus* in Frage.

Das generelle Ziel dieser Arbeit soll nicht ein weiteres Mal die Bestimmung von OTA Konzentrationen während der Kaffeeproduktion und –verarbeitung sein, sondern das Hauptaugenmerk soll auf der Untersuchung der der OTA Biosynthese durch verschiedene Aspergillen, speziell *A. ochraceus*, zugrunde liegenden Biologie gewidmet werden. Wichtige Schritte werden sein: die Entwicklung eines auf grünem Rohkaffee-basierenden Mediums für die Laboruntersuchungen; die Untersuchung der physiologischen Bedingungen, die eine OTA Biosynthese fördern oder eher unterdrücken und weitere Untersuchungen. Neben der Untersuchung dieser physiologischen Aspekte soll weiterhin ein Screening- und Monitoring-System für den qualitativen und quantitativen Nachweis OTA-produzierender, auf Kaffee wachsender Aspergillen entwickelt werden. Abgeschlossen werden sollen diese Untersuchungen durch ein auf einem RT Real Time PCR System basierendes Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Expression von OTA-biosynthetischen Genen unter variierenden physiologischen Bedingungen.

Vitaminbestimmungen in Geweben von DON-gefütterten Broilern

Katharina Faulkal, Josef Böhm, Ebrahim Razzazi

Department für Öffentliches Gesundheitswesen, Institut für Ernährung, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien

In einer Fütterungsstudie an 15 Broiler-Küken wurden die Auswirkungen von 5 ppm natürlich vorkommenden Deoxynivalenol (DON) auf den Gehalt an α -Tocopherol und Gesamtretinol in Plasma, Leber-, Duodenum- und Jejunumgewebe mittels HPLC untersucht. Es liegen in der Literatur Hinweise auf Veränderungen im Vitaminstatus durch Fusariumtoxine vor.

α -Tocopherol, enthalten in Pflanzenölen und Nüssen, ist ein Bestandteil der Gruppe der fettlöslichen E-Vitamine. Die Absorption erfolgt überwiegend im mittleren Dünndarmabschnitt gemeinsam mit Fettsäuren. Speicherorte sind Leber, Fettgewebe und Muskulatur. Die Ausscheidung erfolgt überwiegend über den Faeces, nur etwa 1% wird über die Niere ausgeschieden. Tocopherol dient als Antioxidans, Radikalfänger und als Membranstabilisator. Ein Mangel kann zu nekrotischer Myopathie, beim Geflügel auch zu Encephalomalazie des Cerebellums und zur exudativen Diathese führen. Interaktionen in der Bioverfügbarkeit bestehen unter anderem mit PUFA (polyunsaturated fatty acids) und Selen. Retinol (Vitamin A) ist ein fettlösliches Vitamin und lässt sich in Lebergewebe von Meeres- und Säugetieren als Ester nachweisen. Es bildet mit Opsin (Protein) das Sehpigment, des Weiteren ist Retinol ein wesentlicher Faktor beim Wachstum, der Knochenbildung und Stabilität der Zellmembranen. Ein Mangel an Retinol führt zu Nachtblindheit, Atrophie und Verhornung der Haut und der Schleimhaut, zu Störungen im Wachstum, bei der Knochenbildung und zu Fehlbildungen des Fötus. Eine Hypervitaminose kann massive Zubildungen im Bereich des Periosts bedingen. Die Bioverfügbarkeit und Digestion ist abhängig vom Ernährungsstatus und von der Integrität der Darmmucosa. Retinol diffundiert durch die Glycoproteinschicht und wird in die Mucosazellen absorbiert. In der Zelle erfolgt eine Veresterung zu langkettigen Fettsäuren (u.a. Palmitat), wird zur Leber transportiert und dort gespeichert.

Der Fütterungsversuch wurde an 15 Broilerküken vorgenommen. Die Versuchsgruppe (8 Tiere) erhielt natürlich kontaminierten Weizen (10 ppm DON /kg Weizen). Nach 3 Wochen Fütterung erfolgten Schlachtung und Probeentnahme. Die Proben wurden sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren.

Bestimmung von α -Tocopherol: Die Proben wurden eingewogen und mit Aceton homogenisiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, durch einen Mikrofilter in ein HPLC-Gefäß überführt, in den Chromatographen injiziert und mittels Fluorimeter bestimmt.

Bestimmung von Gesamtretinol: Die Proben wurden eingewogen, mit KOH und Pyrogallol-Lösung homogenisiert und eine halbe Stunde inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden HPLC-Wasser und Petrolether zugesetzt. Danach wurde die Petroletherphase abgenommen, eingedampft, nach der Auflösung in Methanol in die HPLC injiziert und mittels Fluorimeter bestimmt.

α -Tocopherol: Die Mittelwerte der Kontrollgruppe waren 46 $\mu\text{g/ml}$ Plasma, 29 $\mu\text{g/g}$ Leber, 31 $\mu\text{g/g}$ Duodenum und 32 $\mu\text{g/g}$ Jejunum. In der Versuchsgruppe war der Gehalt 43 $\mu\text{g/ml}$ Plasma, 31 $\mu\text{g/g}$ Leber, 36 $\mu\text{g/g}$ Duodenum und 29 $\mu\text{g/g}$ Jejunum.

Gesamtretinol: In Plasma, Duodenum- und Jejunumgewebe konnte Retinol nicht nachgewiesen werden. In der Leber wurde für die Kontrollgruppe ein Mittelwert von 229 $\mu\text{g/g}$ Gewebe, in der Versuchsgruppe ein Mittelwert von 222 $\mu\text{g/g}$ Gewebe ermittelt.

Eine Futterkontamination von 5 ppm DON in der Ration von Broilern führte zu keiner nachweisbaren Veränderung in der α -Tocopherol- und Gesamtretinolkonzentration von Plasma, Duodenum-, Jejunum- und Lebergewebe.

LC-UV-high resolution orthogonal time of flight mass spectrometry for screening of > 500 mycotoxins and fungal metabolites

Kristian Fog Nielsen and Thomas O. Larsen

Center for Microbial Biotechnology, BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, Building 221, Dk-2800 Lyngby, Denmark

Microfungi are able to produce an impressive array of secondary metabolites, often producing more than 50 different under inducing conditions. These are needed in the typically one to four different habitats in which each species has evolved. Most secondary metabolites are produced as a response to other organisms especially plants, bacteria and other fungi (2). A fraction of these metabolites causes a toxic response "when introduced by a natural route in low concentrations to vertebrates" and are referred to as mycotoxins.

However, most fungal secondary metabolites have only been tested in one biological assay and even fewer in real animals, and thus are their activity obscure. To detect: i) new emerging mycotoxins; ii) compounds working synergistically with mycotoxins; iii) biomarkers; iv) and to be able to understand the complex interaction between fungi and its substrate, it important to use broad chemical screening methods.

Here we suggest that such chemical screening methods are based on Liquid chromatography combined with UV and high-resolution mass spectrometry with orthogonal time of flight mass spectrometry (oaTOF). Here the molecular composition of potential target molecules can be extracted from both new and old datafiles, and the high resolution capabilities used for verification (3) giving almost the same specificity as MS/MS. To increase the odds of finding fungal metabolites comparison of real infected food and feed samples should be done to pure agar cultures of the fungi infecting the samples (1).

To be able to detect as many metabolites as possible, it has been necessary to analyse samples in both positive and negative electrospray (ESI) mode. Using an oaTOF instrument with positive/negative switching is not feasible due to the long inter scan time, and samples should be analyse in tow independent modes. This on the other hand gives the possibility to optimising the solvents, so that formic acid and ammonium formiate can be used for ESI⁺ and weekly acidic, neutral or basic solvents can be used for ESI⁻.

Results from screening ca. 500 secondary metabolite shows e.g. that 3-nitropropionic acid and small benzoic acid derivatives, including botryodiplodin, kojic acid, orselenic acid and patulin, can **only** detected in ESI⁻ as they are transparent in ESI⁺. Alkaloids, peptides, on the other hand are much better detected in the positive mode, along with aflatoxins and sterigmatocystins.

For dereplication and identification of unknown metabolites both ESI⁺ and ESI⁻ spectra are needed to establish the molecular masse, as mixtures of cluster ions (e.g. 2M and 3M + H⁺) and their fragments can make some spectra un-interpretable. UV spectra and retention time / retention indices are usually very important for differentiating isomers of already described compounds.

1. **Andersen, B., J. Smedsgaard, and J. C. Frisvad.** 2004. *Penicillium expansum*: Consistent Production of Patulin, Chaetoglobosins, and Other Secondary Metabolites in Culture and Their Natural Occurrence in Fruit Products. *J. Agric. Food Chem.* **52**:2421-2428.
2. **Gloer, J. B.** 1995. The chemistry of fungal antagonism and defense. *Can. J. Bot.* **73**:S1265-S1274.
3. **Nielsen, K. F. and J. Smedsgaard.** 2003. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for de-replication by standardised liquid chromatography-UV detection-mass spectrometry methodology. *J. Chromatogr. A* **1002**:111-136.

Effects of co-incubation of bile acids and methotrexate on ochratoxin A-induced DNA damage in vitro

Wolfram Föllmann und Stefan Lebrun

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

Ochratoxin A (OTA), a mycotoxin produced by several *Aspergillus* and *Penicillium* species, is a worldwide contaminant of food and feedstuffs. It is nephrotoxic, immunosuppressive and carcinogenic in several animal species. OTA accumulates in the kidney, liver and blood and it is possibly implicated in the aetiology of Balkan endemic nephropathy and in Danish porcine nephropathy. The ability of renal tubular cells to reabsorb OTA from urine which results in a high cellular OTA concentration is discussed as one reason for the kidney specific toxicity of OTA. As OTA reaches the urinary bladder with the urine also the lower urinary tract is regarded as a target for the adverse effects of OTA.

In the present study, the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay was used to detect induction of DNA damage by ochratoxin A in porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) and Madin Darby canine kidney (MDCK) cells.

As bile acids and methotrexate as well as OTA are taken up into cells via organic anion transporters (OAT) and/or organic anion transporting polypeptides (OATP) a co-incubation of OTA with several bile acids or with methotrexate was performed to examine whether the genotoxic effect of OTA can be modified or not.

With glycodeoxycholic acid the adverse effect of OTA in the Comet assay was completely inhibited in both cell types. This was also true for taurocholic acid, but not as effective as with glycodeoxycholic acid. In contrast, cholic acid itself induced DNA damage in both cell types. With methotrexate a different effect in the two cell types appeared. Whereas methotrexate (without addition of OTA) induced DNA damage in PUBECs this was not the case in MDCK cells. In a co-incubation with OTA, the adverse effect of OTA was completely inhibited by methotrexate in MDCK cells but not in PUBECs.

The present results can be used as a hint that adverse effects of OTA can be influenced by substances which are substrates of common transport proteins. Experiments which shall examine a direct influence on uptake of OTA are in progress.

Genetische Grundlagen der Ochratoxin A Bildung in Penicillien

Rolf Geisen, Anja Karolewicz, Carolin Bogs, Paul Färber

Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Karlsruhe, Haid-und-Neu-Str. 9, 76131 Karlsruhe

Ochratoxin A ist ein nephrotoxisches Mykotoxin das hauptsächlich durch die beiden Schimmelpilzgattungen *Aspergillus* und *Penicillium* gebildet wird. *A. ochraceus*, *A. carbonarius* und *A. niger* sind die wichtigsten Ochratoxin A bildenden Arten innerhalb der Gattung *Aspergillus* und sind verantwortlich für das Vorkommen von Ochratoxin A in Kaffee, Wein, Kakao oder Gewürzen, da diese Pilze höhere Temperaturen (30°C) zum Wachstum bevorzugen. Demgegenüber zeigen die ochratoxinogenen Penicillien Temperaturoptima von 20 bis 25°C. *P. verrucosum* und *P. nordicum* sind die einzigen bekannten Penicilliumarten die Ochratoxin A produzieren. *P. verrucosum* ist ein moderater Ochratoxin A Bildner und kommt fast ausschließlich auf Getreide vor. *P. nordicum* ist ein starker Ochratoxin A Bildner und kommt als Kontaminante auf proteinreichen Lebensmitteln wie Käse oder fermentierten Fleischprodukten vor. Ochratoxin A ist ein zusammengesetztes Mykotoxin, das aus einem Polyketidanteil, dem Dihydroisocoumarin und der Aminosäure Phenylalanin besteht. Aufgrund der molekularen Struktur dieses Mykotoxins müssen mindestens folgende Enzyme an der Biosynthese des Ochratoxin A beteiligt sein: eine Polyketidsynthase, eine Chlorperoxidase, eine Methylase, eine Esterase sowie eine Peptidsynthetase, die die Verknüpfung zwischen dem Polyketidrest und der Aminosäure Phenylalanin durchführt. Mit Hilfe verschiedener molekularer Methoden ist es gelungen einen Teil des Genclusters der Ochratoxin A Biosynthese aus *P. nordicum* zu klonieren und zu charakterisieren. Der DNA Bereich enthält ein Gen für eine Polyketidsynthase, sowie ein Gen für eine nicht-ribosomale Peptidsynthetase, beides potenzielle Gene des Ochratoxin A Biosynthesewegs. Ein Vergleich der genetischen Situation von *P. nordicum* mit der in *Aspergillus* bzw. dem nah verwandten *P. verrucosum* zeigte, das die Gene der Biosynthese von Ochratoxin A in den genannten Organismen weniger homolog sind als erwartet.

Moulds and mycotoxins in ensiled maize with biological and chemical additives

Jan Grajewski¹, Andrzej Potkański², Katarzyna Raczowska-Werwinska²,
Magdalena Twarużek¹

¹ Bydgoszcz University of Kazimierz Wielki, Institute of Biology and Environmental Protection, Chodkiwiczka Street 30, PL-85-064 Bydgoszcz

² Agricultural University of Poznań, Department of Animal Nutrition and Feed Management, Wołyńska Street 33, PL-60-637 Poznań

Technical staff: Beata Miklaszewska¹, Katarzyna Kuźmińska¹, Agnieszka Woźniak¹,
Katarzyna Waszkiewicz¹

In the recent years the amount of corn grown in Poland has increased rapidly. Nowadays it takes about 600.000 ha, 40% of which is used as silage. Changing climate in Poland, with dry summer followed by wet autumn with ground frost causes the extensive moulds contamination and high presence of the fusarium toxins in the maize during the harvest. The norms accepted in the EU concerning the acceptable level of deoxynivalenol (DON) and zearalenol (ZON) in feed stuffs for cattle require detailed examination of this problem as it decides on the health quality and production results.

The aim of the study was the chemical and microbiological evaluation of the raw silage maize and then the silage made of it with the microbiological additives and chemical preservative. The changes of the DON and ZON amount during maize fermentation process and then after a weekly oxygen exposure of the silage (stability evaluation) were evaluated. The study samples were taken from the maize type F70 (Flint type grain from Austria) which was silaged in the middle of September 2003 after grinding in three ways (5 microsilos each). The first way: 1 – control; 2 – control + 0,25% Kemisile 2000 preservative; 3 – control + 0,2 Lactacel L bacterial – enzymatic substance (*Lactobacillus plantarum* 10⁸ cfu/g + enzymes). Whole pieces of maize plant such as leaves, stem and cob were evaluated too. After 12 weeks of fermentation the quality of the silage, microbiological analysis and the presence of *Fusarium* toxins were evaluated. Furthermore, the same analysis was carried out for the silage which underwent the 7-days oxygen exposure. The selected parameters have been presented in the table below (medium value from 3 repetitions). The results confirmed high moulds contamination of the harvested maize as well as high level of DON (7690 ppb). It was detected that during the fermentation process the significant reduction of DON and the number of fungal flora took place. However, during the oxygen exposure of the silage the level of both mycotoxins and moulds increased again (especially *Aspergillus*, *Penicillium* and *Mucor* genera). The additives used did not influence significantly the quality and stability of the silage.

Parameters	Ensiling raw material	Silage					
		Control		Kemisile 2000		Lactacel L	
		after opening	after stability	after opening	after stability	after opening	after stability
DON (ppb)	7690	454	679	3075	4250	6625	7245
ZON (ppb)	<5	<5	<5	22,3	17,7	23,5	36,7
Moulds (cfu/g)	1,1 x 10 ⁷	1,0 x 10 ²	5,6 x 10 ⁵	1,3 x 10 ³	5,0 x 10 ⁷	2,1 x 10 ²	1,7 x 10 ⁷
Yeast (cfu/g)	1,1 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁴	6,3 x 10 ⁸	1,0 x 10 ³	2,5 x 10 ⁸	6,2 x 10 ⁴	7,9 x 10 ⁸
LAB (cfu/g)	2,5 x 10 ⁸	2,4 x 10 ⁸	2,1 x 10 ⁸	1,9 x 10 ⁸	1,7 x 10 ⁸	2,6 x 10 ⁸	2,2 x 10 ⁸
Clostridia (cfu/g)	5,4 x 10 ⁶	1,6 x 10 ⁶	9,7 x 10 ⁵	7,6 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁶	3,5 x 10 ⁵
E. coli (cfu/g)	6,8 x 10 ⁸	1,0 x 10 ⁵	9,3 x 10 ⁴	7,4 x 10 ⁴	5,5 x 10 ⁴	9,3 x 10 ⁴	6,4 x 10 ⁴

Grundfutterqualität in Sachsen: Ergebnisse der mykotoxikologischen Untersuchungen an Silomais der Jahre 1998-2003

Gudrun Hanschmann, Doris Krieg

Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft, FB Landwirtschaftliches Untersuchungswe-
sen, Gustav-Kühn-Straße 8, D-04159 Leipzig

1. Einleitung

Seit 1998 werden in Sachsen im Rahmen eines Futterqualitätsprogrammes verschiedene Grundfuter auf energie- und andere futterwertbestimmende Parameter untersucht, sowie seit 1997 auch auf unerwünschte Stoffe. Aus diesem umfangreichen Untersuchungsprogramm, aus dem Empfehlungen zur Erzeugung einer guten Grundfutterqualität abgeleitet werden, präsentieren wir die Ergebnisse von Silomaisuntersuchungen auf die Mykotoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA).

Silomais wird in Sachsen auf ca. 60T ha erzeugt. Die Anbauflächen verteilen sich anteilig etwa gleichmäßig auf die Agrarstrukturgebiete: Erzgebirgsvorland einschließlich Erzgebirgskamm, Oberlausitz einschließlich Sächsische Schweiz, das Mittelsächsische Lösgebiet und das sächsische Heidegebiet mit dem Riesaer/ Torgauer Elbland. 14 Ämter für Landwirtschaft verwalten diese Gebiete. Der Silomais wird zu Maissilage verarbeitet und hauptsächlich in der Rinderfütterung eingesetzt.

2. Untersuchungsmethoden

Die Proben wurden jeweils während der Ernte aus dem gehäckselten Erntegut entnommen, pro Amt für Landwirtschaft 3 bis 4. Ca. 45 getrocknete und auf 1mm vermahlene Proben/Jahr wurden so mit folgenden Analysenverfahren untersucht:

DON:

Probenvorbereitung: Extraktion mit Acetonitril 84 %, Aufreinigung mittels Aktivkohle/Celite-Mischung (Romer) und Immunoaffinitätssäule

Bestimmung: HPLC/DAD

VDLUFA-Methodenbuch Bd.III „Die chemische Untersuchung von Futtermitteln“, Kap.16.12.1

ZEA:

Probenvorbereitung: Extraktion mittels Acetonitril 75 %, Aufreinigung mittels Immunoaffinitätssäule

Bestimmung: HPLC/Fluoreszenz

VDLUFA-Methodenbuch Bd.III „Die chemische Untersuchung von Futtermitteln“, Kap.16.9.2

Zweifelhafte Proben wurden mit HPLC-MS abgesichert.

3. Ergebnisse

Je nach der Witterung schwankt der Anteil an Proben, in denen Fusarientoxine nachgewiesen werden konnten, jährlich zwischen 20 und 90 %. In den meisten Proben waren beide Toxine vorhanden. Eine direkte Korrelation zwischen Fusarien- und Toxingehalt konnte nicht nachgewiesen werden.

Der Anteil der Proben, der den niedrigsten Orientierungswert des BMVEL für die Rinderfütterung (DON: 1000µg/kg, ZEA: 250µg/kg) überschreitet, überstieg in Sachsen aber selbst in starken Fusarienjahren nicht 20 %. Der Medianwert über alle Silomaisproben betrug bei DON im Jahr 2002, einem starken Fusarienjahr in Sachsen, 400µg/kg und 2003, einem Jahr mit sehr niedrigem Befall, 200µg/kg. Für ZEA betrug diese Werte 60 bzw. 20 µg/kg. Einzelne extrem hohe Zearalenongehalte wurden in allen Untersuchungsjahren im sächsischen Heidegebiet gefunden und betrugen zwischen 1500 und 3000µg/kg, während dort Maximalwerte beim DON 1600µg/kg nicht überschritten. Lediglich 2 Proben aus dem Erzgebirge hatten in den 6 Untersuchungsjahren Werte von 2500 bzw. 4600µg/kg.

Deoxynivalenol (DON) in Thüringer Brot und Feinen Backwaren – Erste Untersuchungsergebnisse aus den Jahren 2001 bis 2003

Hartung, H., C. Kinast, U. Kirchheim, G. Eckert, B. Meixner, F. Schöne

Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Naumburger Str. 98, 07743 Jena

Anknüpfend an die Mykotoxinanalysen Thüringer Getreides (Kirchheim u. a. 2001) und die Risikobewertung der einzelnen Verbindungen (Kniel 2003) ist seit 2003 im Rahmen der Prüfung von Brot und Feinen Backwaren für das Zeichen „Geprüfte Qualität– Thüringen“ die Analyse des Deoxynivalenols (DON) vorgeschrieben. Werden in einem Erzeugnis 350 µg DON /kg überschritten, kann das Thüringer Qualitätszeichen nicht verliehen werden oder ein bereits bestehendes Zeichen wird aberkannt.

In 14 der 25 untersuchten Brote wurden DON-Werte über der Bestimmungsgrenze nachgewiesen. Mit 174 ± 71 µg DON/kg waren Mittelwert und Standardabweichung in der Größenordnung der in der Vorbereitungsphase untersuchten Proben. Ebenfalls der Bereich zwischen dem Minimum von 86 und dem Maximum von 298 µg/kg entsprach der Spannweite der in der Vorbereitungsphase ermittelten DON- Konzentrationen.

Von 41 untersuchten Feinen Backwaren war die DON Konzentration in 10 Proben unter der Bestimmungsgrenze. Die 31 Proben mit bestimmbarem Gehalt der Verbindung enthielten 152 ± 59 µg/kg, Minimum 66 µg/kg, Maximum 295 µg/kg.

Fazit

Seit dem Jahr 2003 müssen Brote und Feine Backwaren als eine Bedingung für das Zeichen „Geprüfte Qualität– Thüringen“ 350 µg DON/kg unterschreiten und mit Einführung der entsprechenden Prüfvorschrift wurden insgesamt 25 Brote und 41 Feine Backwaren mittels ELISA auf diese Verbindung analysiert. In den 2003 untersuchten 66 Proben und in 24 weiteren in einer Vorbereitungsphase bereits 2001/2002 analysierten Brot- aber auch Mehlsproben, wurde lediglich eine Grenzwertüberschreitung festgestellt. Bei einzelnen Proben, meist in Grenzwertnähe, erfolgte zusätzlich der Nachweis mittels HPLC, wobei sich niedrigere Konzentrationen im Vergleich zu den mittels ELISA detektierten DON-Werten ergaben.

Literatur

Kirchheim, U., H. Hartung, L. Herold: Occurrence of Fusarium toxins (deoxynivalenol, zearalenone) in cereals. Proc. Soc. Nutr. Physiology, DLG-Verlag Frankfurt, **10** (2001) 181.

Kniel, Bärbel: Mykotoxine. Lebensmittelbrief 1/2 2003, 6 – 10.

Fusarium Head Blight: A Strength of Prothioconazole

I. Häuser-Hahn, A. Suty-Heinze and S. Dutzmann

Prothioconazole belonging to the new chemical class of triazolinthiones shows a broad spectrum of activity against the major cereal diseases including *Fusarium* head blight. The excellent technical performance of this fungicide was shown in world-wide field trials over several years.

Biological mode of action of this active ingredient is the inhibition of germ tube extension. Applied in a protective way it causes severe morphological changes in *Fusarium graminearum* like multiple budding and swollen germ tubes compared to the untreated fungus. As a consequence, no hyphal network can be formed and penetration of hyphae in the tissue of wheat spikes is effectively inhibited.

Besides efficacy against the *Fusarium* head blight complex, reduction of mycotoxins was also investigated.

Prothioconazole is setting new standards of *Fusarium* control and this molecule presents the highest level of efficacy compared to market standard against all economically important *Fusarium* species. In numerous field trials, it could be also proven that Prothioconazole most effectively decreases the level of the three main mycotoxins in wheat: deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone.

Ochratoxin A in getrockneten Weinbeeren

M. Hennel, B. Beinling, D. Eppert, D. Meyer, G. Schöning

Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit; Lebensmittelinstitut Braunschweig
Dresdenstrasse 2 u. 6, 38124 Braunschweig

Im Jahr 2003 wurden im Lebensmittelinstitut Braunschweig 89 Proben von getrockneten Weinbeeren auf Ochratoxin A untersucht. Dies erfolgte im Rahmen des durch das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) organisierte Lebensmittel-Monitoring.

Der Hauptanteil bestand aus Sultaninen (81 %), 11 % waren Korinthen und 8 % Rosinen.

Aufgrund der zähen Konsistenz der Weinbeeren ist es unvermeidbar, bei der Homogenisierung einen definierten Anteil von Wasser hinzuzufügen und die Probe dann mit Hilfe eines Cutters intensiv zu mischen.

Die Extraktion wird mit Acetonitril durchgeführt. Dies führt in Verbindung mit dem zugesetzten Wasser und den Zuckerstoffen der Probe zu einer Zwei-Phasen-Bildung im Filtrat. Das Ochratoxin A befindet sich komplett im Acetonitril, was bei der Berechnung des Ergebnisses berücksichtigt werden muss.

Die weitere Aufarbeitung erfolgt mit Immunoaffinitätssäulen, bevor die Messung der Proben per HPLC mit Fluoreszenzdetektion durchgeführt wird.

Bei dieser Methode ergibt sich eine Bestimmungsgrenze von 0,1 µg/kg. 90 % der Proben wiesen einen höheren Ochratoxin A-Gehalt auf.

Die Höchstmenge von 10 µg/kg war bei 8 % der Proben überschritten.

Der Medianwert beträgt 2,7 µg/kg.

Die ermittelten Werte zeigen also eine durchweg hohe Kontamination der getrockneten Weinbeeren mit Ochratoxin A.

Anwendung der automatisierten Festphasenextraktion bei der Bestimmung von Ochratoxin A

C. Hinkel, I. Kölling-Speer, K. Speer

Technische Universität Dresden, Institut für Lebensmittelchemie, D-01062 Dresden

Das im Sekundärstoffwechsel von Schimmelpilzen gebildete Ochratoxin A (OTA) ist in einer Vielzahl von Lebensmitteln zu finden. Beispielhaft seien Getreideerzeugnisse, Trockenfrüchte, Bier, Kakao und Kaffee genannt. Der Schimmelbefall findet dabei meist schon auf dem Feld statt, die Toxinproduktion während der Lagerung oder Verarbeitung.

Im Bereich der Europäischen Union gelten Höchstmengen für Rosinen, Getreide und Getreideerzeugnisse. Im Februar diesen Jahres wurden außerdem durch eine Änderung der Mykotoxin-Höchstmengenverordnung OTA-Höchstgehalte für Trockenobst, getrocknete Feigen, Röstkaffee und löslichen Kaffee festgelegt.

Vor diesem Hintergrund wurde die DIN EN 14132 zur Bestimmung von Ochratoxin A in Röstkaffee abgeändert. Die Extraktion erfolgte alternativ zur Schüttelextraktion durch Ultraschallbehandlung mit reduzierter Probeneinwaage. Die Validierung der Bestimmung von Ochratoxin A in der Matrix Röstkaffee wurde gemäß dem Konzept '98 durchgeführt, dabei wurde eine Nachweisgrenze von 0,2 µg/kg erreicht. Die untersuchten Röstkaffees des Handels wiesen Gehalte im Bereich unterhalb der Nachweisgrenze bis 3,4 µg/kg auf.

Die ausgearbeitete Methode lässt sich auch auf andere Matrices übertragen. Untersucht wurden neben Süßholzwurzeln (*Glycyrrhiza glabra L.*), die für ihre zum Teil hohen Gehalte an OTA bekannt sind, auch Ingwer (*Zingiber officinale Rosc.*), Baldrian (*Valeriana officinalis L.*), Teufelskrallen (*Harpagophytum procumbens DC.*) und Wacholderbeeren (*Juniperus communis L.*).

Es zeigte sich, dass die jeweils erhaltenen Chromatogramme im Bereich der Retentionszeit des OTA keine Störungen aufwiesen. In einigen exemplarisch untersuchten Proben wurden OTA - Gehalte von 0,2 – 12,2 µg/kg in Süßholzwurzel und Ingwer nachgewiesen.

Die im Verlauf der Aufarbeitung notwendige Reinigung des Extraktes an phenylmodifizierten Festphasenextraktionssäulen ist durch einen hohen „Betreuungsaufwand“ gekennzeichnet, wobei vor allem die Einstellung einer vergleichbaren Durchflussrate nur schwer zu erreichen ist. Abhilfe schafft die Automatisierung der Festphasenextraktion, so dass die Probenaufgabe und -reinigung sowie die Elution des Analyten computergestützt erfolgen kann und bis zu fünf Proben automatisch aufzuarbeiten waren. Besonderer Vorteil des eingesetzten Gerätes war dabei die Möglichkeit, mit positivem Druck zu arbeiten und so konstante Flussraten einzustellen.

Bestimmung von Zearalenon in Speiseölen mit GPC und LC-ESI-MS/MS

O. Kappenstein¹, H. St. Klaffke¹, I. Mehlitz¹, R. Tiebach¹, R. Weber¹, J. Lepschy¹,
R. Wittkowski¹.

¹Bundesinstitut für Risikobewertung, Thielallee 88-92, D-14195 Berlin

²Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Vöttinger Strasse 38, D-85354 Freising

Das Vorkommen von Zearalenon in getreidehaltigen Lebensmitteln konnte in europaweiten Untersuchungen mit einer Inzidenz von 32 % (N = 4918) festgestellt werden. In den einzelnen EU-Mitgliedstaaten wurden für Weizen und Weizenprodukte Mittelwerte von 0,083 µg/kg bis 26 µg/kg und für Mais und Maisprodukte von 5,2 µg/kg bis 627 µg/kg bestimmt. Über das Vorkommen von Zearalenon in Maiskeim-, Soja- und Weizenkeimölen stehen bisher nur unzureichende Daten zur Verfügung. Bereits Untersuchungen von Lauren et al. hatten aber gezeigt, dass bei einigen Fusarientoxinen, unter anderem bei Zearalenon, während der Nassvermahlung z.B. von Mais eine Toxinanreicherung in der Fraktion der Keimlinge möglich ist. So konnte in einem entsprechend hergestellten Maiskeimöl ein Gehalt an Zearalenon von 4,6 mg/kg nachgewiesen werden. Auf Grund dieser Beobachtungen war es notwendig, eine geeignete Methode zur Bestimmung von Zearalenon in Pflanzenölen zu entwickeln.

Für die Bestimmung von Zearalenon in unterschiedliche Lebensmittelmatrix stehen erprobte, matrixangepasste clean-up Methoden zur Verfügung. Neben der Flüssig-Flüssig-Verteilung sind Aufreinigungsschritte mittels SPE-Materialien (Florisil, RP-Materialien, Kieselgel) und Immunoaffinitätschromatographie (IAC) bekannt. Die Anwendung der Gelpermeationschromatographie (GPC) in der Mykotoxinanalytik ist nur für die Aufreinigung von Aflatoxinen bekannt.

Die Bestimmung von Zearalenon in Speiseölen mit Gelpermeationschromatographie und anschließender LC-MS/MS sowie HPLC-FLD Detektion wurde validiert. Für die LC-MS/MS Bestimmung ist nach der GPC kein weiterer Aufreinigungsschritt notwendig. Die Korrelation der beiden Nachweisverfahren war zufriedenstellend. Im Rahmen eines Forschungsvorhabens zur Ermittlung der Belastung des Verbrauchers mit Fusarientoxinen wurden 77 Speiseölproben auf Zearalenon untersucht. Der Mittelwert für Zearalenon in 38 Maiskeimölen lag bei 169,7 µg/kg, der Maximalwert bei 921 µg/kg.

Dieses Projekt wird vom BMVEL über die Projektträgerschaft durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) gefördert (Az. 00HS055).

Vergleich verschiedener clean-up-Verfahren bei der Analytik von DON

M. Klötzel¹, S. Schmidt², U. Lauber¹, G. Thielert², H.-U. Humpf³

¹Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, Schaflandstr. 3/2, 70376 Fellbach

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

³Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Lebensmittelchemie, 48149
Münster

Deoxynivalenol (DON) ist das am häufigsten und in höchsten Konzentrationen von Fusarien gebildete Trichothecen. Für die quantitative Bestimmung von DON werden in der Literatur eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden beschrieben, die sich jedoch hinsichtlich des Extraktions- und Aufreinigungsverfahrens (u.a. Flüssig-Flüssig-Extraktion, SPE, Immunoaffinitäts-Säulen, ELISA) sowie in Bezug auf das chromatographische Bestimmungsverfahren (u.a. DC, HPLC-DAD/FLD/MS, GC-ECD/FID/MS) teilweise deutlich unterscheiden.

In Abhängigkeit von der Matrix, des angewandten Untersuchungsverfahrens und nicht zuletzt des durchführenden Laboratoriums resultieren daher in nationalen und internationalen Laborvergleichsuntersuchungen nach wie vor große Unterschiede in den Ergebnissen [Krska, 2001]. Zwar kann ein Teil der beobachteten Streuungen auf die Verwendung unterschiedlicher bzw. nicht zertifizierter Standardlösungen zurückgeführt werden, vielen Routine-Methoden scheint es darüber hinaus jedoch an Robustheit und Reproduzierbarkeit zu mangeln. Diese Problematik wird nicht zuletzt durch die Vielzahl an Publikationen von immer wieder überarbeiteten und erweiterten Bestimmungsverfahren ersichtlich.

Die zwischenzeitlich erfolgte Einführung nationaler Höchstmengen setzt jedoch voraus, dass u.a. im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung eine zuverlässige (robuste) und einfach durchzuführende Methodik zur Bestimmung von DON in getreidebasierenden Lebensmitteln zur Verfügung steht.

Im Rahmen eines von der Landesstiftung Baden-Württemberg geförderten gemeinsamen Projektes der beiden Untersuchungsämter in Stuttgart und Sigmaringen sollte daher in einem ersten Schritt eine zuverlässige und empfindliche HPLC-Methode zur Bestimmung von DON etabliert und weiter entwickelt werden.

Hierzu wurde u.a. ein umfangreicher Vergleich der beiden auf dem Markt erhältlichen DON Immunoaffinitätssäulen (IAS) der Hersteller Vicam und Rhone durchgeführt (Reproduzierbarkeit, Wiederfindungsraten, Einfluss Extraktionsmittel, Kosten). Nach Optimierung und Validierung des HPLC-Verfahrens erfolgte die qualitative und quantitative Bestimmung mittels Diodenarray- und Fluoreszenzdetektion nach Nachsäulenderivatisierung [Sano, 1987].

Durch Optimierung von Extraktion und Clean-up wurde das Verfahren auf unterschiedliche getreidehaltige Lebensmittel (u.a. Getreide, Teigwaren, Backwaren, Frühstückscerealien, Müsli usw.) adaptiert. Die unabhängig voneinander in beiden Laboratorien ermittelten Verfahrenskenndaten (u.a. Reproduzierbarkeit, Wiederfindungsraten jeweils in Abhängigkeit der verwendeten IAS) werden dargestellt.

Krska, R., Baumgartner, S., Josephs, R. (2001) The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius J Anal Chem* **371**(3): 285-99

Sano, A., Matsutani, S., Suzuki, M., Takitani, S. (1987) High-performance liquid chromatographic method for determining trichothecene mycotoxins by post-column fluorescence derivatization. *J Chromatogr* **410**(2): 427-36

Bestimmung von Ochratoxin A, Citrinin und Patulin in Hausstaub

G.Köller¹, U.Rolle-Kampczyk¹, P.Popp², O.Herbarth¹

UFZ – Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle,
¹Department Expositions- und Epidemiologie,
²Department Analytische Chemie,
Permoserstr 15, 04318 Leipzig, Germany

Ochratoxin A (OTA) wird von verschiedenen *Penicillium*- und *Aspergillus*-Arten produziert. Dieses Mykotoxin wirkt kanzerogen, nephrotoxisch, teratogen und immunmodulierend [1,2]. Neben dem Haupteintragspfad über Lebensmittel kann auch die Inhalation von Staub zur Exposition beitragen [3]. Um diese Belastung abschätzen zu können, wurde eine empfindliche Methode zur Bestimmung von OTA und Citrinin in Hausstaub mit Kapillarelektrophorese und laserinduzierter Fluoreszenzdetektion entwickelt. Die extrem empfindliche Detektion und die Anreicherung der injizierten Probe in der Trennkapillare ermöglichen eine Nachweisgrenze von $0,2 \text{ ng g}^{-1}$.

Patulin ist ein Mykotoxin, das von *P.expansum* gebildet wird. Diese Mikroorganismen können nicht nur in Lebensmitteln, sondern auch im Innenraumbereich vorkommen [4]. Für die Bestimmung von Patulin in Hausstaub wurde eine einfache Methode entwickelt, die aus einer Membranextraktion und der anschließenden Derivatisierung von Patulin besteht. Die Analyse erfolgt gaschromatographisch mit GC-ITMS und negativer chemischer Ionisation.

Literatur.

- [1] Abramson, D., Usleber, E., and Martlbauer, E. *Journal of Aoac International* **1999**, *82*, 1353-1356.
- [2] Wichmann, G. and Lehmann, I. *Immunobiology* **2003**, *205*, 220-221.
- [3] Smith, J.E., Anderson, J. G., Lewis, C. W., and Murad, Y. M. *FEMS Microbiology Letters* **1992**, *79*, 337-343.
- [4] *Fungal Genetics and Biology* **39** (2003) 103–117

Nachweis von Fusarien und deren Mykotoxinen in Futterkonservaten aus Grünlandbeständen mit differenzierter Bewirtschaftungsintensität

Ulrike Korn^{2,1}, Marina Müller¹, Undine Behrendt, Monika Gossmann², Michaela Ditz¹

¹ Zentrum für Agrarlandschafts- und Landnutzungsforschung (ZALF) e.V. Müncheberg, Institut für Primärproduktion und Mikrobielle Ökologie, Gutshof 7, D – 14641 Paulinen-
aue

² Humboldt-Universität Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, FB Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, D - 14195 Berlin

Extensive Verfahren der Grünlandnutzung gewinnen in großen Gebieten des Havellandes und der Ostprignitz (Land Brandenburg) an Bedeutung. Dazu gehören vorwiegend eine reduzierte Schnitthäufigkeit, ein verzögerter erster Schnitt im Rahmen von Vogelschutzprogrammen und eine herabgesetzte Düngung. Diese Maßnahmen verändern die Bestandeszusammensetzung, das Pflanzenalter bis zum ersten Schnitt und das Mikroklima im Bestand. Dadurch können verschiedene Mikroorganismen-Gruppen auf den Grasbeständen stark zunehmen. BEHRENDT (2001) wies u.a. nach, dass dabei vor allem die Besiedlung der Pflanzen mit heterotrophen Bakterien und mit Schimmelpilzen stark ansteigen kann. Werden diese überständigen Grasbestände zu Futterkonservaten verarbeitet, gehen die Schimmelpilze und evtl. von ihnen gebildete Mykotoxine in das Heu bzw. die Grassilage ein. Wenn bei der Heulagerung für die Pilze günstige Bedingungen auftreten, kann sich bis zur Verfütterung die Toxinkonzentration noch erhöhen.

Für die Untersuchung von Futterkonservaten (Heu, Grassilage) auf das Vorkommen von *Fusarium*-Arten und die Bildung von Mykotoxinen wurden aus 15 unterschiedlichen Betrieben des Havellandes, des Märkisch-Oderlandes und der Ostprignitz Proben genommen.

Die Gesamtkeimzahlen der Schimmelpilze wurden auf Sabouraud-Agar bestimmt, Fusarien wurden auf PDA und SNA gereinigt und taxonomisch bis zur Art eingeordnet. Das Mykotoxin Zearalenon wurde nach Reinigung über Immunaффinitätssäulen mittels HPLC analysiert.

Es konnten die Arten *Fus. sambucinum*, *Fus. culmorum*, *Fus. sporotrichioides* und *Fus. avenaceum* gefunden werden, wobei die Art *Fus. culmorum* am häufigsten bestimmt wurde. Sie gehört zu den toxinogenen Arten und ist potentiell in der Lage, DON, ZEA und NIV zu bilden.

In 2 Heu- und 4 Silageproben konnten ZEA Werte nachgewiesen werden, der maximale Gehalt betrug 66 ppb. Damit wurde die zulässige Höchstmenge (Orientierungswerte des BMVEL) für die Verfütterung nicht überschritten. Eine Abhängigkeit zwischen der Bewirtschaftungsintensität und der Bildung von Zearalenon konnte nicht nachgewiesen werden. Z. Zt. laufen Untersuchungen, die weitere Mykotoxine (DON, Alternariatoxine) in diesen Konservaten bestimmen sollen. Dazu sind aber ausreichend empfindliche und reproduzierbare Extraktionsverfahren zu entwickeln.

BEHRENDT, U. (2001): Der Einfluß differenzierter Bewirtschaftungsintensität von Niedermoorgrünland auf die Entwicklung von Mikroorganismen-Gesellschaften in der Phyllosphäre von Gräsern. – ZALF-Bericht Nr. 45.

Untersuchung österreichischer Futtermittelder Erntejahre 2002 und 2003 auf die Fusarientoxine Desoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON)

Ch. Lang, W. Sipos, M. Schuh, F. Schmoll

Klinik für Schweine des Klinischen Departments für Nutztiere und Bestandsbetreuung
Veterinärmedizinische Universität Wien

Einleitung

Die von den Pilzen der Gattung *Fusarium* gebildeten Toxine Desoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) können zu erheblichen gesundheitlichen Störungen bei Nutztieren aber auch beim Menschen führen und sollten deshalb auf keinen Fall in die Nahrungsmittelkette gelangen. Fusarientoxine zählen zu den Feldtoxinen und sind in Mitteleuropa weit verbreitet. Das Getreide wird hauptsächlich bei feuchter Witterung befallen und die Toxinbildung steht in direktem Zusammenhang mit der Pilzbildung.

Material und Methode

Die 164 Futterproben stammten hauptsächlich aus den Bundesländern Niederösterreich, Oberösterreich, der Steiermark und Kärnten und wurden sowohl im Erntejahr 2002 als auch im Erntejahr 2003 gezogen. Die Erhebung des Mykotoxingehaltes erfolgte mittels ELISA (RIDASCREEN DON und RIDASCREEN Zearalenon, R-Biopharm-AG, Darmstadt, Deutschland).

Ergebnisse

Tabelle 1: Die wesentlichsten Ergebnisse der Untersuchung auf DON

Futtermittel/Jahr	Mittelwert (ppb)	SD (ppb)	Maximum (ppb)	Median (ppb)
ZSAlleinfutter 03	497,29	504,56	1504	400,0
Ferkelfutter 03	491,78	457,94	1297	224,0
Aufzuchtfutter 02	918,20	1505,23	3520	61,0
Mais 02	784,17	1042,69	2833	374,0
Weizen 03	2289,70	2732,12	5431	971,0
Ganzpfl.m.sil. 02	1086,17	728,62	2332	798,5
Kornsilagen 02	3555,25	2340,21	5550	3953,5

Tabelle 2: Die wesentlichsten Ergebnisse der Untersuchung auf ZON

Futtermittel/Jahr	Mittelwert (ppb)	SD (ppb)	Maximum (ppb)	Median (ppb)
ZS-Alleinfutter 03	45,2	47,87	120	25,0
Aufzuchtfutter 02	108,0	135,53	261	60,0
Sojaschrot 03	72,5	91,22	137	72,5
Ganzpfl.maissil. 02	39,2	22,35	69	44,0
Kornsilagen 03	25,0	31,15	79	10,0

Zusammenfassung

Vor allem im Bereich des Schweinefutters wurden teilweise sehr hohe Werte erzielt, was auf jeden Fall zu einer gesundheitlichen Beeinträchtigung der Tiere und zu wirtschaftlichen Einbußen führt. DON ist in Österreich eine weitaus höhere Bedeutung zuzumessen als ZON.

Literatur

- 1) Öhlinger, R., Kiendler, E., Brodacz, W., Edinger, W., (2003): Überblick über Mykotoxingehalte in Getreide, Mais und Futtermitteln – 2002 und 2003. In: Logrieco, A. (ed.): "An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe" Kluwer Academic Publisher, in press.
- 2) Razzazi, E., Böhm, J., Adler, A., Zentek, J., (2003): Fusarientoxine und ihre Bedeutung in der Nutztierfütterung: eine Übersicht. WTM 90, 8: 202-210.

An integrated approach for the detection and analysis of mycotoxins

Thomas Ostenfeld Larsen and Kristian Fog Nielsen

Center for Microbial Biotechnology, BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, Building 221, Dk-2800 Lyngby, Denmark

At *Center for Microbial Biotechnology* we use an integrated set-up for the analysis of fungal mycotoxins and other secondary metabolites. Initially fungal extracts prepared by micro-extraction (0.4-1 cm² agar culture) are analysed by either thin layer chromatography or direct injection mass spectrometry. Selected samples are then further analysed by HPLC coupled to diode array detection, fluorescence detection and high-resolution mass spectrometry (HR-MS) to obtain information about single compounds (4,5). In parallel selected samples might also be subjected to HPLC micro-fractionation into 96 well micro-titer plates for bioactivity testing in various assays. Compounds that have significant bioactivity and are not found to be known compounds using de-replication techniques such as X-hitting (2) and HPLC-HR-MS (4) are isolated by semi-preparative methods to give pure compounds for structural elucidation by 1- and 2-D nuclear magnetic resonance experiments.

Using the various methods for analysis of fungal metabolites referred to above we have recently studied among others the 58 species in *Penicillium* subgenus *Penicillium* (1). All 58 species were easily identified based on their individual unique and very consistent profiles of secondary metabolites. A total of more than 130 different families of secondary metabolites were detected from this group of extremely important mycotoxins producing species, each family of compounds often including several compounds. Presently we also study the chemistry of the species in the *Alternaria infectoria* species group from which we recently described the potential novel mycotoxin infectopyrone (3). Finally the scope of the new algorithm X-hitting for the detection of known compounds to be produced by new species has recently been demonstrated (2).

Acknowledgements

The Centre for Advanced Food Studies (LMC) Denmark and the Danish Technical Research Council are thanked for their financial support.

1. Frisvad, J. C., J. Smedsgaard, T. O. Larsen, and R. A. Samson. 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. Stud. Mycol. (Baarn) 42pp.
2. Hansen, M. E., T. O. Larsen, and J. M. Carstensen. 2004. X-hitting, a new algorithm for de-replication and novelty detection of UV-spectra in complex mixtures of natural products. Anal. Chem. (submitted).
3. Larsen, T. O., N. Perry, and B. Andersen. 2003. Infectopyrone, a potential mycotoxin from *Alternaria infectoria*. Tetrahedron Lett. 44:4511-4513.
4. Nielsen, K. F. and J. Smedsgaard. 2003. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for de-replication by standardised liquid chromatography-UV detection-mass spectrometry methodology. J. Chromatogr. A 1002:111-136.
5. Nielsen, K. F., J. Smedsgaard, T. O. Larsen, F. Lund, U. Thrane, and J. C. Frisvad. 2003. Chemical Identification of Fungi: Metabolite Profiling and Metabolomics, p. 19-35. In D. K. Arora (ed.), Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications. Marcel Dekker, New York.

Vergleich verschiedener DON-Standards

J. Lepschy v. Gleisenthall

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, AQU 2
Lange Point 6, D-85354 Freising

Deoxynivalenol = DON ist bisher das einzige Mykotoxin aus der Trichothecengruppe, dessen Gehalte in Lebensmitteln gesetzlich geregelt wurde. Seiner qualitativen Analytik kommt daher im Hinblick auf die Einhaltung von Höchstmengen große Bedeutung zu. Prinzipiell kann man bei der Unsicherheit eines qualitativen Analysenergebnisses zwei verschiedene Anteile unterscheiden: Zufällige Fehler (random errors), die mit steigender Zahl von Wiederholungen beliebig verkleinert werden können und systematische Fehler (bias), bei denen dies nicht der Fall ist. Zu diesen Fehlerquellen gehörte die Konzentration des Messstandards die alle Analysenfehler in gleicher Richtung beeinflusst. Um die ungefähre Größe dieses Fehlers im konkreten Fall abzuschätzen wurden von allen sechs Partnern des vom BMVEL geförderten Projekts „Analytik und Vorkommen wichtiger Fusariumtoxine (Deoxyrivalenol und Zearalenon) und Aufnahme dieser Toxine durch den deutschen Verbraucher“ Az.00HS055 die aktuellen Standards angefordert. Zusätzlich wurde ein Ringversuchsstandard der Fachgruppe Futtermittel des VDLUFA und ein kommerzieller Standard der Firma Biopure mit einbezogen. Aus allen Standards wurde gravimetrisch mit der Analysenwaage eine 5-Punkt-Kalibrierkurve mit Konzentration von 0,05 – 1,0 mg/l hergestellt. Die tatsächliche Konzentration wurde mit Hilfe der gravimetrisch ermittelten Dichte der Verdünnungslösung bestimmt. Alle Kalibrierlösungen wurden mit HPLC und UV-Messung bei 220nm und mit Nachsäulenderivatisierung [1] [2] und Fluoreszenzmessung analysiert. Die erhaltenen Korrelationskoeffizienten aller Kalibriergeraden waren größer als 0,999. Alle Achsenabschnitte waren leicht positiv, so dass eine reale positive Abweichung zu vermuten ist. Die unterschiedlichen Konzentrationen führten zu unterschiedlichen Steigungen der Kalibriergeraden bzw. unterschiedlichen Responsfaktoren. Berechnet man auf der Basis der verschiedenen Kalibriergeraden eine Konzentration in der Mitte der Eichkurve, so zeigen die Messergebnisse einen Variationskoeffizienten von rund 9%. Dieser Wert könnte durch Einsatz kommerzieller Standards, von denen es gegenwärtig zwei gibt (Biopure und Supelco), wesentlich verringert werden.

[1] Sano A; Matsutani, S, Suzuki, M. and Takitani S; J Chromatogr. 1987, 410, 427-436

[2] Lepschy, J; GIT 2000, 275-277

Zum Zearalenonabbau in Pansensaft; "In-vitro-Untersuchungen" nach dem HFT-Verfahren

Macri A.¹, Schollenberger M.², Morar M. V.¹, Drochner W.²

¹ - Universität für Agrarwissenschaften und Veterinärmedizin, Cluj-Napoca, Rumänien

² - Institut für Tierernährung, Universität Hohenheim

Zearalenone (ZON) sind nicht-steroidale, Östrogen-Mykotoxine die als ziemlich widerstandsfähig gegenüber ruminalem Abbau gelten. Sie werden intestinal absorbiert und besetzen Östrogenrezeptoren. Nach Menge und Nachweishäufigkeit in Futtermitteln aus Rumänien sollte diesen Mykotoxinen mehr Aufmerksamkeit gewidmet werden.

Das Hauptziel der „in vitro“ durchgeführten Untersuchungen war die Beobachtung des Zearalenonabbaus in Pansensaft, sowohl aus dem Dorsal- als auch dem Ventralsack.

Der Pansensaft wurde nach Steingass und Mencke (1986) vorbereitet.

Zearalenon, a-Zearalenol und b-Zearalenol wurden durch HPLC analysiert, nach ihrer Extraktion über Bond Elut Columns.

Es wurden Versuche mit Pansensaft aus dem Dorsal- und Ventralsack in je vier Wiederholungen durchgeführt, an vier aufeinanderfolgenden Tagen.

Die Resultate ergaben eine kleinere Zearalenonmenge als die zudosierte, schon an dem Startpunkt -Nullpunkt- der Inkubationen. Bei den Versuchen mit Pansensaft aus dem Dorsalsack wurde schon an dem Nullpunkt nur in etwa die Hälfte der zudosierten Mykotoxinmenge bestimmt. Eine Erklärung dafür könnte eine intensivere Mikroorganismenaktivität in diesem Rumenteil sein. Die Rolle einer eventuell inhomogenen Toxin-Verteilung im Medium wird diskutiert.

Zum Einfluss einer hydrothermischen Behandlung auf den Ergotalkaloidgehalt von mutterkornbelastetem Roggen

Simone Mainka, S. Dänicke, K.-H. Ueberschär, H. Graf v. Reichenbach, G. Flachowsky
Institut für Tierernährung der FAL, Bundesallee 50, 38116 Braunschweig

In der Fütterung, vorwiegend von monogastrischen Tieren, werden z.T. hydrothermische Futterbehandlungsverfahren zur Steigerung der Nährstoffverdaulichkeit und somit des Futterwertes eines Futtermittels bzw. einer Futtermischung angewendet. Neben diesem primären Ziel sind positive Nebeneffekte, wie beispielsweise die Senkung der Toxizität von mykotoxinbelastetem Futter, denkbar. Vor diesem Hintergrund wurden 4 Roggenpartien, welche verschieden hoch mit Mutterkorn (*Claviceps purpurea*) belastet waren, expandiert und auf den Gehalt an Ergotalkaloiden untersucht.

Roggen einer Charge wurde nachträglich unterschiedlich hoch mit Mutterkorn einer Herkunft zu 4 Partien à 90 kg angereichert (0,8 / 4,2 / 8,3 / 25 % Mutterkorn) und homogenisiert sowie auf 4 mm geschrotet. Die Mischungen wurden zunächst mit einem Konditionier-Chargenmischer mit Dampfanbindung bei 95 °C und 17 % Feuchte für ca. 2 Minuten vorkonditioniert. Die Expandierung erfolgte mit einem OE 8 Ringspalt- Expander[®] innerhalb von 5 Sekunden bei 120 °C, 18 % Feuchte, 40 bar mechanischem Druck und 20 kWh / t mechanischem Energieeintrag. Nach dem Expandieren wurden die Partien gekühlt und gleichzeitig auf ca. 86 % T getrocknet. Vor der Behandlung (vB), nach der Konditionierung (nK) sowie nach der Expandierung (nE) wurden Stichproben gezogen und bis zur Ergotalkaloidanalyse bei -18 °C aufbewahrt. Es wurden die Mutterkornalkaloide Ergometrin, Ergotamin, Ergocomin, Ergocryptin, Ergocristin und Ergosin mitsamt deren Isomeren (-*inin* Formen) mittels HPLC – Technik nach WOLFF et al. (1988) bestimmt. Die Summe der 12 genannten Alkaloide wird als Gesamtalkaloidgehalt bezeichnet.

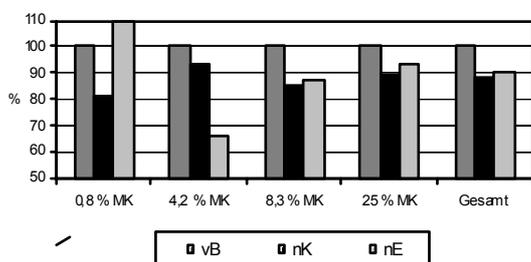


Abb.1: Gesamtalkaloidgehalte der Roggen-Mutterkornmischungen nach Konditionierung (nK) und Expandierung (nE) in %

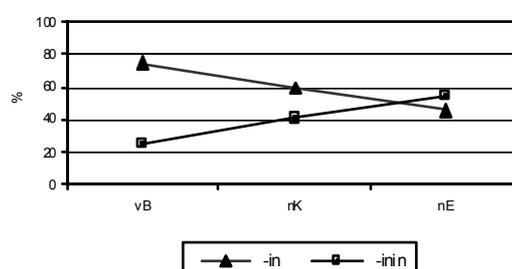


Abb.2: Anteil der Isomere insgesamt in % vom Gesamtalkaloidgehalt nach Konditionierung (nK) und Expandierung (nE)

Die hydrothermische Behandlung bewirkte insgesamt eine nur moderate Absenkung des Gesamtalkaloidgehaltes, im Mittel um ca. 10 % (Abb.1). Mit Ausnahme des geringsten Mutterkornanteils von 0,8 % in der Mischung, erwies sich die Behandlung als tendenziell weniger wirksam, je mehr Mutterkorn in der Mischung enthalten war (Abb.1). Insgesamt vermochte der Expandierprozess nach der Konditionierung den Gesamtalkaloidgehalt nicht weiter zu senken. Durch die hydrothermische Behandlung verschoben sich die Isomerenverhältnisse der Ergotalkaloide (Abb.2). Konditionierung und Expandierung bewirkten eine Umlagerung der -*in* Formen der Alkaloide hin zu den -*inin* Formen.

Ob eine Änderung des Isomerenverhältnisses von den -*in* zu den -*inin* Ergotalkaloiden einen Einfluss auf die Toxizität des Mutterkorns hat, sollte in Tierversuchen überprüft werden. WOLFF J., NEUDECKER Ch., KLUG Ch., WEBER R. (1988): Z. Ernährungswiss. 27, 1 – 22

DON- und ZEA-Gehalte in Weizen, Roggen und Gerste – Ergebnissen aus der Besonderen Ernteterminnung 2003

Sandra Masloff, Joachim Wolff

Bundeforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BFEL)

Institut für Biochemie von Getreide und Kartoffeln, Schützenberg 12, D-32756 Detmold

Bei der „Besonderen Ernteterminnung“ (BEE) handelt es sich um eine Untersuchung der Beschaffenheitsmerkmale von Getreide nach dem Agrarstatistik-Gesetz. Bei dieser jährlich durchgeführten Analyse wurden an der BFEL (Standort Detmold), ehemals BAGKF, neben Inhaltsstoffen und Verarbeitungseigenschaften die Belastung des Getreides mit unerwünschten Stoffen bestimmt. Als unerwünschte Stoffe sind dabei Schwermetalle, Rückstände von Pflanzenschutzmitteln und Mykotoxine anzusehen.

Für die Untersuchung des Getreides auf die Mykotoxine Zearalenon (ZEA) und Deoxynivalenol (DON) wurden im Jahr 2003 Weizen-, Roggen- und Gerste-Volldruschmuster eingesetzt, die nach Vorgabe des Statistischen Bundesamtes in allen Bundesländern (mit Ausnahme der Stadtstaaten) gezogen wurden. Die zu untersuchende Musterzahl bei Roggen und Gerste wurde, wie in den vergangenen Jahren, nach dem Ernteaufkommen des Jahres 2002 bestimmt und auf ca. 250 je Getreide festgelegt, so dass die Analyse ein abgesichertes Bundesergebnis liefert. Bei Weizen hingegen wurde für alle Bundesländer die Musterzahl 40 festgelegt, was erstmals ein abgesichertes Ergebnis zur Mykotoxin-Belastung für Bund und Länder erlaubt.

Bei der BEE 2003 wurden die DON- und ZEA-Gehalte von insgesamt 974 Einzelmustern bestimmt. Dabei liegen die DON- und ZEA-Gehalte der analysierten Muster bei Roggen und Weizen im Median unter denen des Vorjahres (2002). Die Ergebnisse für die Gerste, welche erstmalig im Rahmen einer BEE untersucht wurde, liefern für die analysierten Muster DON-Gehalte, die zwischen den Werten von Roggen und Weizen liegen.

Da es sich bei den analysierten Getreide-Mustern jeweils um grob gereinigtes Getreide handelt, kann durch eine intensive Reinigung vor der Vermahlung noch eine Absenkung des Fusarien-Toxingehalts bei der Herstellung von Getreideprodukten erzielt werden. Ausgehend von den Daten der analysierten Muster der BEE 2003, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass, verglichen mit der Ernte 2002, Roggen und Weizen im Jahr 2003 eine vergleichsweise geringe Belastung mit DON und ZEA aufwiesen.

Vorkommen von Aflatoxin M₁ in Milch und Molkereiprodukten aus Ägypten

K. Meyer¹, M.M. Motawee², J. Bauer¹

¹ Lehrstuhl für Tierhygiene, TU München, Freising-Weihenstephan

² *National Organization for Drug Control and Research-Egypt*

Aflatoxin M₁ (AFM₁) kann in Milch und Molkereiprodukten in Folge einer alimentären Aufnahme von Aflatoxin B₁ (AFB₁) durch milchproduzierende Nutztiere vorkommen. Aufgrund der geographischen Prävalenz sowie der EU-Höchstmengenverordnung stellt eine potenzielle Gesundheitsgefährdung durch AFM₁ in Mitteleuropa nur ein untergeordnetes Problem dar, während in feuchtwarmen Gebieten eine relevante Kontamination von Milch und Milchprodukten durchaus denkbar ist. Aus diesem Grund wurde eine Studie über das Vorkommen von AFM₁ in Produkten aus der Region Mansoura, Ägypten, durchgeführt. Insgesamt wurden 260 Proben, 100 Proben roher Büffel- und Kuhmilch (*Bos taurus*) sowie 160 Proben vermarkteter Molkereiprodukte, überprüft. Die aufgereinigten Extrakte wurden mittels LC-MS analysiert.

Der durchschnittliche Gehalt von AFM₁ betrug 0,29 µg/l in Büffelmilch bzw. 0,31 µg/l in Kuhmilch, die höchste gemessene Konzentration war 0,56 µg/l. Insgesamt konnte in 32 % bzw. 20% dieser Proben AFM₁ bei einer Nachweisgrenze von 0,02 µg/ml bestimmt werden. Im Gegensatz hierzu war nur in wenigen der vermarkteten Proben Aflatoxin M₁ nachweisbar (8 %, c > 0,02 µg/l bzw. kg). In Buttermilch, UHT-Milch und Säuglingsnahrung war in keinem Fall eine Kontamination detektierbar. Die Unterschiede sind möglicherweise durch die zeitlich getrennte Akquirierung des Probenmaterials zu erklären.

Effects on performance parameters of weaning piglets fed a diet containing Ochratoxin A

Sabine Nitsch¹, Elisabeth Fuchs², Eva-Maria Binder³, Gerd Schatzmayr¹

¹Biomim IAN GmbH, Industriestrasse 21, A-3130 Herzogenburg; e-mail:

sabine.nitsch@biomin.net

²Romer Labs Diagnostic GmbH, Industriestrasse 21, A-3130 Herzogenburg³Erber AG, Industriestrasse 21, A-3130 Herzogenburg

Ochratoxins are secondary metabolites of various fungi mainly belonging to the genera of *Aspergillus* and *Penicillium*. The most toxic compound is Ochratoxin A (OTA) known to have nephrotoxic-, hepatotoxic-, carcinogenic- and immunosuppressive-properties. OTA occurs as contaminant of cereal grains and beans in cool and moderate climates as well as in warmer regions. In animal production regular consumption of diets containing OTA result in reduced growth rate, poor feed conversion and reduced immunity to infections by bacteria and viruses.

Some animal species, especially swine, are known to be affected with kidney problems due to Ochratoxin A. A major renal disease in swine known as porcine nephropathy that occurs in certain European countries, particularly in Denmark, is associated with the consumption of OTA-contaminated barley [1]. Affected pigs show signs of pain in the kidney area, increased water consumption and therefore increased urine production, appear depressed and have decreased feed consumption. Pathologically, the kidneys may be found to be enlarged and pale with an uneven cortical surface and cortical fibrosis. Generally, animal studies indicate that OTA is absorbed in the GI tract and in the proximal and distal tubules. It enters the enterohepatic circulation and can be excreted and reabsorbed. It can bind to the albumin fraction in the blood and thus can persist in animal tissues, even in meat, for extended periods of time [2]. The risk of residues in animal tissues and the possible carry over to humans when contaminated meat is consumed, led to an intensified research for respective counteracting methods.

Anaerobic and aerobic bacteria as well as yeasts isolated from different habitats like rumen fluid, soil and intestinal contents were screened for their ability to degrade OTA [3, 4]. A new yeast strain *Trichosporon mycotoxinivorans* turned out to be most effective in detoxifying OTA. This strain was used in the diets of weaning piglets to alleviate the negative effects of OTA on the animals. 60 mixed sex piglets aged 5 to 6 weeks were divided into 5 groups: negative control A (no additive), toxin group B (500 ug/kg OTA), trial group C (500 ug/kg OTA + 10⁷ cfu T. mtv /kg) and D (500 ug/kg OTA + 10⁸ cfu T. mtv /kg) and a positive control E (no toxin, 10⁸ cfu T. mtv /kg).

Results revealed that OTA had a negative influence on performance parameters such as live weight, weight gain, feed consumption and conversion of weaning piglets. Average daily weight gain was significantly reduced in the toxin group B compared to positive and negative control. With the addition of *Trichosporon mycotoxinivorans* the negative effects of OTA could be alleviated. Live weight was improved about + 4.2% (group C) and + 2.4% (group D) compared to the toxin group B. In all groups losses of animals and cases of diarrhea occurred to a lesser extent than in the toxin group B.

[1] B. Hald; IARC Scientific Publication No. 115. Oxford University Press; 1991

[2] R. R. Marquardt and A. A. Frolich; J Anim Sci 70: 3968-3988; 1992

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

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

Occurrence of *Alternaria* and *Fusarium* mycotoxins in winter wheat from domestic crop in year 2003

Vladimir Ostry¹, Jarmila Skarkova¹, Jan Nedelnik², Jiri Ruprich¹, Hana Moravcova²

¹National Institute of Public Health Prague, Centre for the Hygiene of Food Chains in Brno, National Reference Centre for Microscopic Fungi and Mycotoxins in Food Chains, Czech Republic

²Research Institute for Fodder Crops Ltd., Czech Republic

The aim of this study was a monitoring of occurrence of *Alternaria* and *Fusarium* mycotoxins in winter wheat from domestic crop in year 2003.

Winter wheat was sampled after harvesting from different fields in south Moravia in the Czech Republic (Fig.).

The validated methods were used for quantification of *Alternaria* mycotoxins (HPTLC) and DON, T2-toxin and zearalenone (ELISA) in winter wheat.

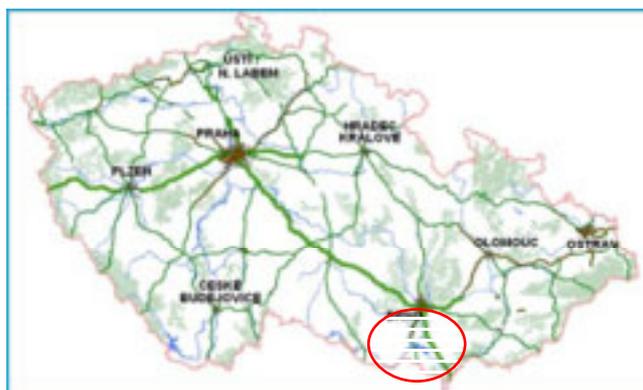


Fig. Sampling places

The results of *Alternaria* mycotoxins determination in winter wheat from domestic crop in year 2003 are presented in table 1.

Table 1: *Alternaria* mycotoxins determination in winter wheat from domestic crop in year 2003

Mycotoxin	Number of samples total/positive	Mean (µg/kg)	Range (µg/kg)	LoQ (µg/kg)
Altenuene	56/56	25	14,5 - 41	5
Alternariol	56/16	5,7 ¹	6,3 - 22,1	5
Alternariol monomethyl ether	56/0	-	-	5
Tenuazonic acid	56/0	-	-	25

¹ The concentration of alternariol <5 µg/kg considered as 1/2 limit of quantification (LoQ) = 2,5 µg/kg

The results of *Fusarium* mycotoxins determination in winter wheat from domestic crop in year 2003 are presented in table 2.

Table 2: *Fusarium* mycotoxins determination in winter wheat from domestic crop in year 2003

Mycotoxin	Number of samples total/positive	Mean (µg/kg)	Range (µg/kg)	LoQ (µg/kg)
Deoxynivalenol	42/42	330	250 - 3500	250
T-2 toxin	42/42	99	25 - 337	25
Zearalenone	42/0	-	-	50

Supported (one part of experiments, the determination of *Fusarium* mycotoxins) by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Project No.QF312).

The system approach to the identification of toxigenic microfungi in foodstuffs

Vladimir Ostry, Jarmila Skarkova, Ivana Prochazkova, Jiri Ruprich

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

Toxigenic microfungi are important microorganisms capable of producing different mycotoxins. Toxigenic fungal strains were isolated from foods of vegetable and animal origin (f.e. cereals, pulses, oilseeds, dried fruits, spices, milk products, meat products, and dried fish), soil, air and water. Mycological analyses are based on the valid standards and recommendations of the International Commission for Food Mycology (ICFM).

The research of toxigenic microscopic fungi needs now next to the traditional methods of plating, cultivation, and examination of morphological structures, „new methods“ for rapid recognition of microscopic fungi in foodstuffs f.e. PCR, AFLP, RAPD, chemotaxonomy and immunoassay. In food mycology „new methods“ (f.e. RT-PCR, biochips, sensors, chemotaxonomy) are being developed. However, the detection and identification of toxigenic microscopic fungi is still carried out following the traditional methods in practice.

The proposed system approach to the identification of toxigenic fungi is applicable for food mycology. The identification of isolated toxigenic fungi in foodstuffs and feedstuffs can be proved by using:

1. Classical mycological cultivation methods (morphological and cultural criteria of microfungi on CDA /Czapek Dox agar/ and MEA /malt extract agar/)
2. Diagnostic nutrient media ADMB (Aspergillus Differentiation Medium Base /HIMEDIA/), AFPA (Aspergillus Flavus and Parasiticus Agar /OXOID/), DRYES (Dichloran Rose Bengal Yeast Extract Sucrose agar /OXOID/), PDA (Potato Dextrose Agar /OXOID/), 6 MFA Medium, Hicrome OGYE Agar Base (Oxytetracycline Glucose Yeast Extract /HIMEDIA/)
3. Chemical identification is conducted by high performance thin-layer chromatography (HPTLC) determination of selected mycotoxins in YES (Yeast Extract Sucrose) medium after the incubation at 30⁰C for 14 days. This method was used for chemical identification of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus argentincus*, *Aspergillus tamaris*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium verrucosum* and *Penicillium nordicum* and *Fusarium graminearum* (chemotype I, IA, IB, II)
4. Molecular biological methods (PCR) have been used recently to assess the toxigenicity. They are independently confirmatory methods able to detect specific genes that encode enzymes participating in the biosynthesis of aflatoxins (f. e. *omt-1*, *ver-1*, *apa-2*), ochratoxin A (f. e. polyketide synthase gene (*pks*) and trichothecenes (f. e. *tri5*, *tri7*).

The system approach to the identification of aflatoxigenic fungi combines these four methods. Quality assurance (QA/QC) of laboratory results and a participation in proficiency testing are very important.

More than 100 strains of the aflatoxigenic microfungi and 30 strains of the ochratoxigenic microfungi were tested with above-mentioned methods.

Occurrence of *Alternaria* mycotoxins and *Alternaria* spp. in lentils and human health

Vladimir Ostry, Jarmila Skarkova, Jiri Ruprich

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

Among the world's oldest cultivated foods, lentils are also some of the most digestible legumes. Lentil soup, a remarkably healthy dish, has been a French favorite for centuries. Originally a food of the poor, the tiny legume is packed with protein, fiber, iron and potassium. India grows more than half the world's supply of lentils-about 800,000 tons per year-and eats it all, importing more from Turkey. Canada and Australia are important lentil exporters.

Imports of lentils to the Czech Republic have reached 6345 t in year 2002. A country of origin of 98,9 % (6273 t) lentils was Canada.

In the study were tested commercial samples of lentils from Canada of poor quality (a crop 2002). Mycological methods (dilution plating /CSN ISO 7698/ and direct plating without and with surface sterilization /1% chlorine for 2 min./, /YGC agar 25°C, 5 days/) and instrumental HPTLC method for determination of *Alternaria* mycotoxins were used. The results of total fungal count in non sorted lentil by dilution plating after rinsing are presented in table 1.

Table 1: The results of total fungal count in non sorted lentil by dilution plating after rinsing

Sample	n	Total fungal count (mean) (CFU/g)
Lentil (non sorted)	5	$5,3 \cdot 10^1$

The results of qualitative determination of microfungi in non sorted lentil by direct plating without and with surface sterilization are presented in table 2. The results of determination of mycotoxins in non sorted and sorted lentils are shown in table 3.

Table 2: The results of qualitative determination of microfungi in non sorted lentil

Sample	n	Qualitative determination of microfungi	
		without surface sterilization	with surface sterilization
Lentil (non sorted)	5	<i>Alternaria alternata</i> <i>Fusarium graminearum</i>	<i>Alternaria alternata</i>

Table 3: The results of determination of mycotoxins in lentil

Mycotoxin	Lentils		
	Non sorted	Sorted non damaged beans	Sorted damaged beans
	(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)
Altenuene	< 15	< 15	< 15
Alternariol	220 ± 33	110 ± 17	290 ± 44
Alternariol monomethyl ether	< 15	< 15	< 15
Tenuazonic acid	< 75	< 75	< 75

These are the first published data about the occurrence of *Alternaria* mycotoxins in lentils.

DON Calibrant: Towards the production of certified B-trichothecene calibrants

Parich A., Krska R

IFA-Tulln, Center for Analytical Chemistry, Konrad-Lorenz-Straße 20, A-3430 Tulln

JECFA, the Scientific Committee on Food of the European Commission and the Nordic Working Group on Toxicology has evaluated the impact of the most prevalent trichothecene mycotoxins on humans. DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON and NIV have been recognised as toxins which can lead to outbreaks of acute illness in humans. Better analytical capabilities and analytical quality assurance such as the use of certified calibrants could lead to more reliable analytical results and therefore reduce the risk of consumption of contaminated food and feed.

The objective of a recently EC-funded project (Proj. N° GRD1-2002-70018, DONCalibrant, coordinated by the IFA-Tulln) is to develop the ability to produce and certify calibrants for their concentrations of DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON and NIV related to the monitoring of these mycotoxins in cereals, food and feed. Certified reference materials (CRMs) of this kind are required to ensure the comparability and traceability of measurements of analytical test laboratories. The use of certified calibrants will be an important element in the quality assurance system of laboratories analysing B-trichothecenes. Systematic errors resulting from calibration with inconvenient calibrants could in future be avoided through a regular check by means of certified calibrants of these toxins. Therefore, the Technical Committee 275 / Working Group 5 within the European Committee for Standardisation (CEN / TC275 / WG 5) supports the efforts for its production.

The project has already led to optimised parameters for the isolation and purification of DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON and NIV from *Fusarium* cultures (e.g. DON has to be recrystallised twice times from ethyl acetate, 15-Ac-DON from petrolether/ethylacetate (1+1) and NIV from hot water, respectively). Hence for the first time NIV has been made available at a purity level >97%. All solid toxins have been thoroughly chemically characterised investigating a variety of analytical techniques. Elemental analysis have revealed that NIV occurs as monohydrate after recrystallisation from water, which is the usual procedure for the production of NIV standards. This observation has also been proved by the melting point and the FTIR showed that NIV is a hemiketal. However, this is generally not taken into consideration although it results into a weighing mistake of approx. 5 %. Therefore, in the project a correction factor for NIV will be calculated and applied for all NIV-calibrants. It also turned out that UV-spectroscopy, DSC, GC and LC/MS/MS experiments were not suitable for the quantification of the levels of impurities. In general all produced standards were of higher purity level than commercial available standards.

Information has also been obtained on how to appropriately ampoule B-trichothecene calibrants and has revealed the contamination of the calibrants if plastic joints come into contact with acetonitrile.

Moreover, it is an important goal of the project to determine internationally accepted molar absorption coefficients for DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON and NIV in acetonitrile. These coefficients are currently being determined by the main partners of the project and will also contribute to improved comparability of measurement results in B-trichothecene analysis at a European level since many laboratories determine or recheck the concentration of their in-house-calibrant by spectrophotometry.

The intercomparison study which will be carried out in May 2004 will also help to support a knowledge and experience exchange between laboratories in the field of *Fusarium* mycotoxin analysis which will also improve the agreement of results obtained during analysis of B-trichothecenes.

Influence of mycotoxin producing fungi on sulfur speciation in LMW subunits of glutenin in different suboptimally stored wheat samples

Alexander Prange¹, Barbara Birzele¹, Peter Köhler², Hartwig Modrow³

¹Landwirtschaftliche und Lebensmittel-Mikrobiologie, Institut für Pflanzenkrankheiten, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Meckenheimer Allee 168, D-53115 Bonn, E-mail: A.Prange@gmx.de

²Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Lichtenbergstraße 4, D-85748 Garching

³Physikalisches Institut, Nußallee 12, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, D-53115 Bonn

X-ray absorption near edge structure (XANES) spectroscopy using synchrotron radiation is an excellent method for examining (noncrystalline) biological samples *in situ* because X-rays penetrate samples easily [1]. Such investigations at the sulfur K-edge have been successfully applied to characterize sulfur bridges in rubbers, sulfur speciation in sulfur bacteria and very recently, sulfur speciation in gluten proteins [2,3]. In the present study, we applied XANES to probe the forms of sulfur in Low Molecular Weight (LMW) subunits of glutenin isolated from different suboptimally stored wheat samples (20% moisture content, 20°C, 12 weeks) highly infected with *Aspergillus* and *Penicillium* as well as from wheat of storage trials with *Fusarium* infected wheat. The obtained spectra were analyzed quantitatively using the Mn_Fit 4.04/15 software using MINUIT [4] to provide a quantitative description of the sulfur speciation. Whereas *Fusarium* spp. did not lead to significant changes in sulfur speciation, distinct changes were observed in samples infected with storage fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. A strong increase in sulfoxide and sulfonate state was determined. This leads to the assumption that only the infection with storage fungi leads to oxidation of cysteine residues to higher oxidation states (higher than disulfide!). These higher oxidation states can not contribute to thiol/disulfide exchange reactions during formation of the gluten network which results in lowered baking quality. Trichothecene contents and moulds determined in stored samples during storage trials yield evidence for competitive interactions of field and storage fungi.

[1] Prange A, Modrow H (2002) *Re/Views Environ Sci Bio/Technol* **1**: 259-276

[2] Prange A *et al.* (2001). *Eur Food Res Technol* **212**: 570-575

[3] Prange A *et al.* (2003) *J Agric Food Chem* **51**: 7431-7438

[4] http://zina06.physik.uni-bonn.de/~brock/mn_fit.html

Standardisierung eines indirekten PTA-ELISA zum Nachweis von *Fusarium* spp. in infizierten Getreidekörnern

Silke Rohde, Frank Rabenstein

Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für Resistenzforschung und Pathogendiagnostik, Postfach 1505, 06435 Aschersleben

Otto Unger, Manuela Heinze, Ralf Schachschneider

Nordsaat-Satzzuchtgesellschaft m.b.H., Hauptstraße 1, 38895 Böhnshausen

Pilzdiagnostische Nachweismethoden stellen eine wichtige Voraussetzung für die Schaffung und Selektion resistenter Getreidesorten mit reduziertem Mykotoxingehalt dar. Bisher wurden sie jedoch für die Bewertung von Genotypen im Rahmen von Zuchtprogrammen nur begrenzt eingesetzt. Da die Resistenz gegen Befall mit *Fusarium*-Arten quantitativ vererbt wird, ist eine möglichst frühzeitige und exakte Bewertung einer großen Anzahl von Genotypen innerhalb kürzester Zeit erforderlich.

Basierend auf ausgewählten polyklonalen Antiseren wurden immunologische Nachweisverfahren für Pilze der Gattung *Fusarium* entwickelt, die eine Quantifizierung der Pilzmenge in infizierten Ähren und Getreidekörnern routinemäßig ermöglichen. Ein indirekter plate trapped antigen-ELISA (PTA-ELISA) zur Erfassung spezifischer Exo-Antigene (ExoAg) in befallenen Proben wurde hinsichtlich verschiedener Einflussfaktoren überprüft und modifiziert. Es wurden folgende Parameter standardisiert: Probengröße, Probenaufschluss, Probenhomogenität, Füllhöhe, Reproduzierbarkeit innerhalb und zwischen den Experimenten sowie die Konzentration des primären und sekundären Antikörpers. Insbesondere die Veränderung der Zusammensetzung des Extraktionspuffers, die Erhöhung des Arbeitsvolumens auf 200 µl und das Abzentrifugieren der extrahierten Proben trug zur Verbesserung des PTA-ELISA bei. Die Arbeitsverdünnung des sekundären Antikörpers wurde ebenfalls optimiert.

Dieser modifizierte Test wurde für die Untersuchung von geschroteten Weizenproben, die aus Infektionsversuchen der Resistenzprüfung (Sprühinokulation) am Standort Böhnshausen stammten, erprobt und Korrelationen zwischen den visuellen Bonituren und den im ELISA gemessenen ExoAg-Gehalten erstellt.

Erste Auswertungen ergaben zwischen visueller Bonitur und immunologisch nachweisbarer ExoAg-Menge eine hohe Korrelation mit $r = 0,94$. Ausgewählte Proben wurden parallel zum PTA-ELISA (ExoAg) zusätzlich auf ihren Gehalt an Deoxynivalenol (DON) mit einem kompetitiven ELISA (DON-ELISA) und HPLC untersucht. Die Korrelationskoeffizienten der beiden DON-Bestimmungen zum *Fusarium*-spezifischen PTA-ELISA betragen $r = 0,93$ (DON-ELISA) bzw. $0,86$ (HPLC). Aufgrund der hohen Korrelationen kann aus diesen Ergebnissen geschlussfolgert werden, dass ein niedriger Pilzbefall der Ähre einen geringen ExoAg- und Mykotoxingehalt im Korn zur Folge hat. Somit könnte der PTA-ELISA bei der Bewertung von Genotypen im Rahmen von Zuchtprogrammen die teureren Mykotoxinbestimmungen mittels HPLC bzw. kompetitiven Immunoassays ersetzen. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob dies nur für Sprühinokulationen mit aggressiven *Fusarium*-Isolaten zutrifft oder auch unter natürlichen Befallsbedingungen möglich ist.

Bestimmung von Ochratoxin A in kleinvolumigen Serumproben

U.Rolle-Kampczyk¹, G.Köller¹, P.Popp², O.Herbarth¹

Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH,
¹Department Expositionsforschung und Epidemiologie,
²Department Analytik,
Permoser Str.15, 04318 Leipzig, Germany

Ochratoxin A ist ein Mykotoxin das kanzerogen, teratogen und immunmodulatorisch wirken kann[1,2]. Aufgrund des breiten Wirkungsspektrums und der relativ langen Halbwertszeit im Organismus wurden verschiedene Methoden zur Bestimmung von OTA in Blut, Serum und Plasma entwickelt. Die am meisten genutzten Methoden für die Bestimmung von OTA sind HPLC mit Fluoreszenzdetektion und Immunoassays [3,4].

Es soll eine neue, einfache und schnelle Methode zur Bestimmung von Ochratoxin A (OTA) in kleinvolumigen Serumproben auf der Basis der Kopplung der Kapillaronen-elektrophorese mit einem laserinduzierten Fluoreszenzdetektor vorgestellt werden. Dabei besteht die Aufreinigung der Proben lediglich aus einem Doppelextraktions-schritt. Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten und der Quantifizierung wurde mit zwei unterschiedlichen internen Standards gearbeitet. Die erreichte Nachweisgrenze beträgt 0.55 ng/mL, bei einem linearen bereich von 1-100 ng/mL OTA in gespikten Serumproben. Mit der neuen Methode ist es möglich, rasch die Belastung von potentiell belasteten Personen zu ermitteln, von denen nur ein geringes Probevolumen erhältlich ist (z.B. Säuglinge). Diese Technik soll in umweltepidemiologische Studien eingebettet werden.

Literatur

- [1] P.G.Mantle, International Biodeterioration & Biodegradation, 50 (2002) 143-146.
- [2] G.Wichmann and I.Lehmann, Immunobiology, 205 (2003) 220-221.
- [3] L.Solti, T.Pécsi, I.Barna-Vetró, F.Szász Jr, K.Biró, E.Szabó, Animal Reproduction Science, 56 (1999) 123-132.
- [4] B.Zimmerli and R.Dick, Journal of Chromatography B, 666 (1995) 85-99.

Interference of Mycotoxins on immune response to coccidiosis Vaccine

Elizabeth Santin, Alex Maiorka, Ana Vitória Fischer da Silva, Diego Alfaro, Elizabeth M. S. Schmidt- Popazoglo, Antonio Carlos Paulillo

Departamento de Zootecnia, UFPR, Curitiba – PR – Brazil

This study was carried out to evaluate the effect of mycotoxin on immune response to coccidiosis vaccine and the use of Modified glucomannan (MG) to reduce the losses in performance resultant of coccidiosis vaccine in broiler fed with naturally contaminated diet. A number of 120 broilers were distributed in a completely randomized design with three treatments and four replicates, where T1= control group fed with good quality corn on diet; T2= group fed with mycotoxin naturally contaminated corn on diet; T3= group fed with mycotoxin naturally contaminated corn on diet and MG. All groups were vaccinated against coccidiosis at first day. The naturally contaminated corn showed 15.3 ppb of aflatoxin B₁, 11.6 ppb of ochratoxin A, 1,200 ppb of zearalenone and 1,700 ppb of T-2. The mycotoxin levels were analyzed by HPLC. At 21 and 42 days of age of broilers, the performance parameters, oocyst number on litter and coccidiosis lesion score on intestine of broilers were evaluated.

The group fed with mycotoxin naturally contaminated corn on diet showed lower weight gain and worse feed conversion than birds fed with good quality corn. The use of MG on diet with naturally contaminated corn showed improve in theses parameters. There was not difference between treatments for oocyst number on litter, but there was difference for coccidiosis lesion. Bird fed with mycotoxin naturally contaminated diet showed intense coccidiosis lesion, especially on cecum, than birds fed with good quality corn and mycotoxin naturally contaminated corn plus MG.

Theses result showed that the vaccine did no cause evident coccidiosis lesion on intestine of broilers fed with a good quality corn but could cause severe lesion on broilers fed with mycotoxin naturally contaminated diet, resulting in reduction on performance. The use of modified glucomannan on mycotoxin naturally contaminated broilers showed reduction on theses deleterious effect of mycotoxin on coccidiosis vaccine response.

Table 1 – Performance of broilers vaccinated against coccidiosis submitted to different treatments at 42 days of age.

<i>Treatments</i>	Feed intake	Weight gain	Feed conversion
Mycotoxin naturally contaminated corn	2,831	1,839 ^b	1.541 ^{ab}
Mycotoxin naturally contaminated corn plus modified glucomannan	3,054	1,917 ^{ab}	1.593 ^a
Good quality corn	3,078	2,091 ^a	1.472 ^a
Probability	0.093	0.000	0.007

* different letters in the same column mean statistical differences

Fusarientoxingehalte in Mais und Produkten auf Maisbasis

Margit Schollenberger, Hans-Martin Müller, Winfried Drochner

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

Ernteprodukte von Mais sind häufig mit Fusarientoxinen kontaminiert. Daten liegen v.a. über das Vorkommen von Deoxynivalenol (DON), Nivalenol (NIV) und Zearalenon (ZON) vor. Zur Belastungssituation von Lebens- und Futtermitteln aus Mais mit einem breiten Spektrum an Typ A und Typ B Trichothecenen existieren aber nur wenige Studien. Daher wurden in der vorliegenden Untersuchung Vorkommen und Gehalt der Typ A Trichothecene Scirpentriol (SCIRP), 15-Monoacetoxy-scirpenol (MAS), Diacetoxy-scirpenol (DAS), HT-2 Toxin (HT-2) und T-2 Toxin (T2), T-2 Triol, T-2 Tetraol und Neosolaniol, sowie der Typ B Trichothecene DON, 15-Acetyldeoxynivalenol (15-ADON), 3-Acetyldeoxynivalenol (3-ADON), NIV, Fusarenon-X (FUS) und des ZON in Körnermais, Frischmais, Maissilage, Maiskleber, Maiskeimen, Maisnachprodukten sowie Grieß und Mehl ermittelt. Die Proben stammten aus dem Lebensmittelhandel, wurden von Firmen bzw. staatlichen Stellen zur Verfügung gestellt oder von Mitarbeitern der Universität Hohenheim in den Jahren 2000 und 2001 entnommen. Die Bestimmung der Trichothecene erfolgte mittels GC/MS nach Probenaufarbeitung mit Festphasenextraktion, die Nachweisgrenzen für die Toxine lagen zwischen 1 und 12 µg/kg, die Bestimmung des Zearalens erfolgte mittels HPLC/Fluoreszenzdetektion nach Probenaufarbeitung mit Immunoaffinitätschromatographie. Die Nachweisgrenze lag bei 1 µg/kg.

In einer Gesamtzahl von 106 Proben waren alle 14 untersuchten Fusarientoxine nachweisbar, DON und ZON wurden mit der höchsten Häufigkeit, DON und NIV mit den höchsten Gehalten ermittelt. Die Toxine der Scirpenolgruppe SCIRP, MAS und DAS waren in 14, 27 und 3 % der Proben nachweisbar, die Toxine der T-2 Gruppe T-2, HT-2, T-2 Triol und T-2 Tetraol mit 33, 66, 2 und 7 %.

Die Toxingehalte der Futtermittel waren im Vergleich zu denen der Lebensmitteln deutlich höher. So lagen die Maximalgehalte für DON, NIV und ZON in Futtermitteln bei 6700, 5900 und 1600 µg/kg in Lebensmitteln bei 450, 60 und 140 µg/kg. Der Grenzwert für DON von 500 µg/kg in Getreide und Produkten für den menschlichen Verzehr wurde in keiner der Lebensmittelproben überschritten, für ZEA jedoch kam es zu Überschreitungen des Grenzwertes von 50 µg/kg in mehreren Proben.

Influence of reduced cellular glutathione level on the mutagenicity of patulin in cultured mouse lymphoma cells

David Schumacher, Jörg Wagner, Leane Lehmann, Manfred Metzler

Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Karlsruhe,
Kaiserstr. 12, D-76131 Karlsruhe

The mycotoxin patulin (PAT) occurs in mouldy apples and can reach concentrations of up to 1 g per kg in mouldy parts. PAT is known to react with thiol and amino groups of proteins. An important cellular thiol is glutathione (GSH), which can reach intracellular concentrations of up to 10 millimolar.

Our laboratory has previously shown that PAT exhibits aneugenic and clastogenic potential in cultured human AG01522C cells and in Chinese hamster V79 cells. Moreover, we could demonstrate that PAT induces mutations of the hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase gene locus in V79 cells. After reduction of intracellular GSH levels, the mutagenic potential is increased in these cells.

However, it is still unknown, which kind of mutations are induced by PAT on the molecular level. The thymidine kinase mutation assay allows to distinguish between point mutations and larger deletions. LY5178Y tk +/- mouse lymphoma cells (MLC) were used for this assay. Intracellular GSH levels were reduced by incubation of MLC for 24 h with buthionin-sulfoximine.

Incubation of MLC for 24 h with concentrations of 0.6 micromolar or more PAT proved to be highly cytotoxic. Reduced intracellular GSH levels further increased cytotoxicity. Therefore, we used concentrations of 0.5 micromolar or less PAT for the mutagenicity assay. After treatment of MLC with PAT, we observed a concentration-dependent and significant (≥ 0.3 micromolar PAT) increase of mutations, which was slightly increased by reduced GSH levels. Mutations comprised both, point mutations and larger deletions. Reduced GSH levels did not affect the type of mutations.

The EU has set a maximum level of 50 microgram / kg PAT in fruit juices, which corresponds to 0.32 micromolar. The very low concentrations used in this study already exhibit genotoxic and mutagenic effects. This study provides additional evidence that PAT exhibits toxic activity in mammalian cells in vitro. Reduced intracellular GSH levels increase genotoxic and mutagenic potential of PAT. This may be of relevance for tissues with low levels of GSH, e.g. the pancreas.

Supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (Grant Me 574/14-2).

Occurrence of Deoxynivalenol (DON) and Ochratoxin (OTA) in dog foods

Songsermsakul P., Razzazi E., Böhm J., Zentek J.

Department of Veterinary Public Health, Institute of Nutrition, University of Veterinary Medicine, Veterinärplatz 1, A-1210 Vienna Austria

Deoxynivalenol (DON) is a mycotoxin produced by *Fusarium* species whereas ochratoxin (OTA) is produced by *Aspergillus* and *Penicillium* species. DON and OTA have been found to contaminate cereals, feedstuff and other agricultural products.

DON has been found to be highly toxic in animals if present in feed. One of adverse effects of DON is the suppression of immune system. OTA has been proved to be a nephrotoxic substance in animal study.

There have been rare reports on the occurrence of mycotoxin in pet foods. One of reports has been published the investigation of mycotoxin contamination in 26 canned and 17 dry pet foods for cats and dogs. OTA could be detected in 47 % of the pet food samples. Those found positive generally contained low amounts of OTA (0.1 – 0.8 µg/kg pet food). Higher levels were only detected in two pet food samples (3.2 and 13.1 µg/kg) (Razzazi et al. 2001). Another experimental feeding trials with DON in dogs and cats has been performed to determine the dietary amounts of deoxynivalenol (DON) in food, which are required to produce overt signs of toxicity e.g., vomiting or reduced food intake. The authors have elaborated toxicity and metabolism studies with Beagles and Brittany Spaniels. Food intake was significantly reduced at DON concentrations of 4.5 mg DON per kg food (Hughes et al. 1999).

In this study, the occurrence of DON and OTA in 40 dog food samples (29 dry foods and 11 wet foods) was investigated. The commercially available samples (11 wet food and 9 dry food) were purchased from the retail stores in Vienna, Austria. The other 20 dry food samples were sent from Germany.

After an extraction step with distilled water for DON and 70/30 (v/v) Methanol/Water for OTA, ELISA Ridascreen® DON, R Biopharm and AgraQuant® Total Ochratoxin Test Kit, Romer Labs were applied for the quantitation analysis of DON and OTA. The microwells were measured optically by a microplate reader with an absorbance filter of 450 nm. The detection limit of the method for DON is 18.5 ppb and 1.9 ppb for OTA.

Dry food samples were found to be contaminated with DON in the concentration range of 22-1837

µg/kg and 95-170 µg/kg (dry substance) in wet food with 8 samples were below the detection limit (18.5ppb). Those positive samples with concentration more than 1000 µg/kg DON were analysed and verified by HPLC-MS.

For OTA analysis, there were 7 samples of dry food found to be contaminated with OTA with the range of measured concentrations between 7-40 µg/kg. The rest of dry food samples were below detection limit (1.9 ppb). In wet pet food samples, there were only 2 samples found to be contaminated with OTA (45 and 115 µg/kg dry substance respectively). The other 9 wet food samples were below the detection limit.

The results indicate that DON is present in dog food. However concentrations are obviously not high enough to induce clinical problems.

Screening von Epoxidhydrolase-bildenden Mikroorganismen auf Deoxynivalenol-Transformation

Simone Theisen*, Sibylle Berger

Institut für Phytomedizin (360), Universität Hohenheim, Otto-Sander-Str. 5,
70599 Stuttgart

*aktuelle Adresse: Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, TU München, Weihenstephaner Steig 16, 85350 Freising

Mykotoxine der Gruppe Trichothecene sind Sesquiterpene, die als molekulares Grundgerüst das tetrazyklische 12-Epoxytrichothec-9-en-Ringsystem besitzen. In seinem Vorkommen dominierend ist das Trichothecen Deoxynivalenol (DON, Vomitoxin, 12,13-Epoxy-3,7,15-trihydroxy-trichothec-9-en-8-on). Bisher konnte nur bei wenigen Mikroorganismen eine Transformation bzw. Detoxifizierung von Trichothecenen nachgewiesen werden [1]. Untersuchungen mit Pansen saft von Wiederkäuern zeigten, dass DON von Pansen-mikroorganismen zu Deepoxy-DON transformiert werden kann [2]. Hierbei wird die Epoxidgruppe zwischen C₁₂ und C₁₃ reduziert. Epoxidhydrolasen katalysieren generell die Hydrolyse von Epoxiden zu deren korrespondierenden Diolen durch Addition von Wasser.

In dieser Arbeit wurden im Rahmen eines Screenings 30 verschiedene Mikroorganismen (Bakterien, Hefen, Pilze), die zumeist Epoxidhydrolasen bilden, auf eine Transformation von DON untersucht. Die Arten der getesteten Stämme waren *Agrobacterium radiobacter*, *Alternaria alternata*, *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*, *Alternaria citri*, *Alternaria kikuchiana*, *Armillaria mellea*, *Aspergillus niger*, *Beauveria bassiana*, *Collybia velutipes*, *Myrothecium roridum*, *Myrothecium verrucaria*, *Pezizola corticola*, *Pseudomonas spec.*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus ruber*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizophyllum commune*, *Stachybotrys bisbyi*, *Stachybotrys chartarum*, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces arenae*, *Streptomyces fradiae*, *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Ulocladium chartarum* sowie *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Die Inkubation der Mikroorganismen erfolgte in jeweils spezifischen Medien, teilweise mit Zugabe eines oder mehrerer Modellsubstrate (Epichlorohydrin, 1,2-Epoxyhexan, *cis*-2,3-Epoxyheptan, 1,2-Epoxyoctan, *trans*-Stilbenoxid, Styrenoxid) oder mit Verrucarin A bzw. Kulturüberstand von fluoreszierenden Pseudomonaden als mögliche Induktoren. Es wurden einerseits ganze Zellen und andererseits ein Extrakt aus aufgeschlossenen Zellen zur DON-Transformation (Endkonzentration 200 µg/ml) eingesetzt. Mehrere Probenentnahmen des Kulturüberstandes erfolgten über einen Zeitraum von 14 Tagen. Die Proben wurden mit Ethylacetat extrahiert, getrocknet, in Ethylacetat aufgenommen und mittels Dünnschichtchromatographie (DC-Alufolien RP-18 F_{254S}) analysiert. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Licht aufgrund Fluoreszenzlöschung. Anschließend wurden die DC-Alufolien derivatisiert. Dieses System ermöglicht eine Trennung von DON und Deepoxy-DON. Ein Isolat von *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* zeigte als einziges Isolat nach Inkubation mit DON und *trans*-Stilbenoxid mit und ohne Kulturüberstand von Pseudomonaden eine zusätzliche, polarere Bande auf der DC-Platte. Allerdings war die ursprünglich eingesetzte DON-Menge auf den DC-Platten teilweise immer noch zu sehen. Um welches DON-Transformationsprodukt es sich bei der zusätzlichen Bande handelt, muss noch geklärt werden. Alle anderen Mikroorganismen zeigten keine DON-Transformation mit diesem Test.

[1] Karlovsky P (1999) Nat. Toxins 7: 7-23.

[2] King RR, McQueen RE, Levesque D, Greenhalgh R (1984) J. Agric. Food Chem. 32(5): 1181-1183.

Mykotoxine in Innenräumen – Nachweis im Staub

Ilka Toepfer, Karin Petersen

Institut für Toxikologie und Umwelthygiene, INTOX GmbH, c/o Universität Oldenburg
Carl-von-Ossietzky-Str. 9-11, D-26129 Oldenburg

Mykotoxine sind im Bereich der Lebensmittelforschung umfassend untersucht und ihre Wirkung auf den menschlichen Körper nach oraler Aufnahme ist bekannt. Weniger erforscht ist die Wirkung nach inhalativer Aufnahme der Toxine. Zunehmend bereiten Schimmelpilze im Innenraum Probleme. Daher stellt sich die Frage, ob eine hohe Sporenbelastung der Raumluft neben den mykogenen Allergien und Mykosen auch Mykotoxikosen verursachen können. Es gibt bisher einzelne Fallstudien, in denen nachgewiesen wurde, dass die Exposition gegenüber extremer Sporenkonzentrationen in der Atemluft zu Mykotoxikosen führen können. Diese stark sporenhaltigen Stäube kommen z. B. bei der Müllverwertung und in landwirtschaftlichen Produktionsstätten vor. Bisher sind keine Werte ermittelt worden, ab welchen Konzentrationen mit einer gesundheitlichen Beeinträchtigung zu rechnen ist. Weiter stellt sich die Frage, ob die orale Aufnahme von toxinhaltigem Staub besonders durch Kleinkinder zu Problemen führen kann. Kleinkinder bis 6 Jahre verschlucken durchschnittlich pro Tag 20 bis 100 mg, im ungünstigsten Fall sogar bis zu 500 mg Boden- und Hausstaub.

Der Staub unterschiedlicher, stark pilzbelasteter Innenräume wurde auf Mykotoxine untersucht. Vorab wurde der Staub auf lebensfähige Keime untersucht, so dass bekannt war, ob und welche potentiellen Toxinbildner vorkommen.

In einem Bürogebäude, in dem ein Wasserschaden innerhalb der Lüftungsanlage vorlag, konnte ein erhöhter Sporengehalt von *Aspergillus ochraceus* auf dem Teppichboden festgestellt werden. Der Frischstaub von 9 Büros wurde mittels kompetitiven ELISA auf Ochratoxin A untersucht. In 7 Staubproben konnte das Toxin in Konzentrationen bis zu 5 µg/kg Staub nachgewiesen werden.

In einem Privathaus mit Lüftungsanlage, das sowohl auf Material als auch in der Luft keine Probleme hinsichtlich Schimmelpilzbefall aufwies, enthielt der Staub 20.000 KBE/g eines Vertreters der *Aspergillus glaucus* Gruppe und wies einen Ochratoxin A-Gehalt von bis zu 7,2 µg/kg auf.

Da nicht alle Konidien im Staub keimfähig sind, wurden auch Proben auf Toxine getestet, in denen keine lebensfähigen Toxinbildner entdeckt wurden. In einem feuchtebelasteten Privathaushalt konnten 4,4 µg/kg Ochratoxin A mittels ELISA im Staub nachgewiesen werden.

Es existieren auch von anderen Institutionen erste Untersuchungen in diese Richtung. Um aber zu klären, ob es sich bei den nachgewiesenen Toxingehalten um Hintergrundbelastungen oder gesundheitlich kritische Belastungen handelt, müssten zahlreiche Staubproben aus pilzbelasteten und unbelasteten Haushalten untersucht werden. Es sollte außerdem ein Abgleich der Ergebnisse aus dem kompetitiven ELISA mit anderen Methoden, wie z. B. DC oder HPLC, erfolgen. Weiterhin ist von Interesse, ob die Toxine im Blut der Raumnutzer nachweisbar sind.

Gibt es einen Carry-over von Deoxynivalenol in Hühnereier ?

Hana Valenta und Sven Dänicke

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

Die Frage, ob es Rückstände von Deoxynivalenol (DON) und seinen Metaboliten in Eiern und essbaren Geweben von Geflügel geben kann, ist für die Lebensmittelsicherheit von Bedeutung. Darüber hinaus wäre es für Untersuchungen zur Wirkung von so genannten Dekontaminationsmitteln bei Geflügel wichtig, einen messbaren Parameter wie die DON-Konzentration in einem tierischen Gewebe zu finden, der eine Wirkung eindeutig anzeigt.

Zum Carry-over von DON in Eier und essbare Gewebe von Geflügel gibt es bisher Untersuchungen, bei denen nur DON, aber keine Metaboliten und Konjugate von DON bestimmt wurden, sowie Untersuchungen mit radioaktiv markiertem DON. Bei 2 Fütterungsversuchen mit Legehennen mit 4-5 bzw. 83 mg/kg DON im Futter wurde kein DON in Eiern gefunden. In Untersuchungen mit radioaktiv markiertem DON wurde ein Übergang in Eier nachgewiesen, aber nur 10 % der Radioaktivität im Ei wurde in einer vorläufigen Analyse als DON identifiziert

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb im Rahmen eines 16-wöchigen Fütterungsversuchs mit Legehennen unter anderem auch der Übergang von DON und dessen Metaboliten De-epoxy-DON in Eier untersucht. Eine Gruppe von 25 Tieren (Gruppe 1) erhielt eine Ration mit einer DON-Konzentration von 11,9 mg/kg Trockensubstanz, die Kontrollgruppe (Gruppe 2) mit ebenfalls 25 Tieren eine Ration mit einer DON-Konzentration von 0,5 mg/kg Trockensubstanz. Die Rationen bestanden aus 70 % Mais, der im Falle der Gruppe 1 hoch mit DON, daneben mit Zearalenon, 15-Acetyl-DON und Nivalenol, kontaminiert war. In der 2., 4., 8. und 16. Versuchswoche wurden Eier für die DON-Analytik gesammelt, in Eidotter und Eiklar getrennt, teilweise gepoolt, gefriergetrocknet und gemahlen.

DON in Futtermitteln und DON sowie De-epoxy-DON in Eidotter und Eiklar wurden mit HPLC-DAD (Hochleistungsflüssigchromatographie mit Diodenarraydetektor) bestimmt. Futtermittel und Eidotter wurden mit Wasser extrahiert und der Extrakt über Immunoaffinitätssäulen (IAC, DONprep, r-biopharm) gereinigt. Eiklar wurde mit Acetonitril/Wasser extrahiert und der Extrakt vor der Aufgabe auf IAC vorgereinigt. Zur Miterfassung von Glucuronid-Konjugaten wurden die Eiklarproben sowie ein Teil der Eidotterproben vor der Extraktion mit β -Glucuronidase inkubiert. Die Wiederfindungsraten für DON/De-epoxy-DON lagen im Falle von Eidotter bei 87%/84%, im Falle von Eiklar bei 75%/64%. Die Nachweisgrenzen für beide Toxine betragen ca. 20 ng/g (Eidotter) bzw. 15 ng/g (Eiklar), bezogen auf gefriergetrocknete Proben; das entspricht ca. 10 ng/g bzw. ca. 2 ng/g bezogen auf Frischmasse.

In bisher untersuchten Eidotter- bzw. Eiklarproben konnten DON bzw. De-epoxy-DON nicht nachgewiesen werden. Durch Änderungen der Methode wird zur Zeit versucht, die Nachweisgrenze für Eidotter zu reduzieren. Außerdem wird die Eignung der Methoden zur Analyse von Muskel und Leber getestet.