



ARBEITSGEMEINSCHAFT FÜR LEBENSMITTEL-, VETERINÄR-  
UND AGRARWESEN

**MOLD-MEETING 2008**

**DER**

**ALVA-FACHGRUPPE  
MIKROBIOLOGIE & MOLEKULARBIOLOGIE**

**„Mykotoxine entlang der Lebensmittelkette“**

---

ALVA-Mitteilungen Heft 7/2009

ISSN 1811-7317

---

© 2009, Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und Agrarwesen (ALVA), Wien

ZUSAMMENGESTELLT: Dr. Andreas Adler

BEZUGSMÖGLICHKEITEN: Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und Agrarwesen (ALVA)  
Geschäftsstelle der ALVA, Grünbergstraße 24, 1130 Wien

HERSTELLUNG: RepaCopy Wien DC  
Triesterstraße 122  
1230 Wien

## **Mold-Meeting 2008: Mykotoxine entlang der Lebensmittelkette**

Am 4. und 5. Dezember 2008 fand im Gemeinderatssaal im alten Rathaus der Stadt Linz das 12. Mold-Meeting unter dem Generalthema „Mykotoxine entlang der Lebensmittelkette“ statt. Die Fachtagung wurde in einer wiederum sehr gelungenen Kooperation zwischen der ALVA, der AGES-Akademie und der Humboldt-Universität Berlin organisiert. Als Veranstalter freue ich mich über die erfolgreiche Zusammenarbeit mit allen Partnern.

Der vordringlichen Aktualität der Mykotoxinproblematik im Sinne hochwertiger Qualitätsproduktion und maximaler Lebensmittelsicherheit verdankte das Mold-Meeting 2008 auch wieder großen Zuspruch und einen Besuch von etwa 100 interessierten Teilnehmern.

Die Produktion unbelasteter und gesunder, qualitativ hochwertiger Nahrungsmittel ist die wichtigste Voraussetzung für einen vorbeugenden Verbraucherschutz und eine hohe Lebensmittelsicherheit. Wie ist die Mykotoxinsituation in Österreich? Aktuelle EU-Regelungen? Rahmenbedingungen und Lösungsansätze auf Produktionsebene? Analytischer Nachweis und Möglichkeiten einer effektiven Kontrolle von Mykotoxinen?

Die Mykotoxinproblematik wurde in Fachvorträgen aus Sicht der Produktion und der Vermarktung vor allem unter dem Aspekt der Risikominimierung näher beleuchtet. Mikrobiologische und mykotoxikologische Aspekte einer hochwertigen landwirtschaftlichen Qualitätsproduktion sowie einer maximalen Lebensmittel- und Ernährungssicherheit stellten daher zentrale Themen für das Mold-Meeting dar.

Die nachfolgend publizierten Arbeiten stellen einen Auszug aus dem Fachprogramm des „Mold-Meetings“ bei der Vortragstagung 2008 in Linz dar.

Großer Dank gebührt den Autoren der Fachbeiträge und all denen, die zum Gelingen der Tagung beigetragen haben, insbesondere dem Geschäftsführer der ALVA, Herrn Dipl.-Ing. Wolfgang Palme, sowie dem Team vom ZAM Linz für die Unterstützung bei Technik und Organisation der Tagung. Dem Präsidenten der ALVA, Herrn Hofrat Univ. Doz. Dr. Gerhard Bedlan, sei für die Publikation dieses Bandes sehr herzlich gedankt.

*Dr. Andreas Adler*

Vorsitzender der ALVA-Fachgruppe  
Mikrobiologie und Molekularbiologie

**Teil 1: Vorträge und Poster**

F. Vojir

**Mykotoxinrisiko aus Sicht der amtlichen Lebensmittelkontrolle** 6

Elke Rauscher-Gabernig & R. Grossgut

**Aflatoxine B1, B2, G1, G2 und M1 in Lebensmitteln des österreichischen Marktes  
Abschätzung der Verbraucherexposition** 10

Elisabeth Viktoria Reiter, F. Vouk, J. Böhm & E. Razzazi-Fazeli

**Analyse von Aflatoxinen in Reis - Evaluierung der in Österreich erhältlichen Produkte** 14

G. Schatzmayr & Dian Schatzmayr

**Strategien zur Entgiftung Mykotoxin-kontaminierter Futtermittel und Zulassung von  
Mykotoxin-Inaktivatoren in der EU** 18

H.-P. Kaul, M. Büchter, S. Wichmann, Claudia Zeitlhofer & M. Lemmens

***Fusarium*-Populationsentwicklung unter dem Einfluss produktionstechnischer  
Maßnahmen an einem Trockenstandort** 23

Rebecca Schuster & F.M. Ellner

**Welchen Einfluss hat der Prozess der Weizenblüte auf die Infektion mit  
*Fusarium graminearum* und die Mykotoxinbildung** 27

T. Hirschfeld, F.M. Ellner, H. Buschhaus, Monika Goßmann & Carmen Büttner

**Einfluss von Thiophanat-Methyl und Methyl-Benzimidazol-2-yl-Carbamat auf  
mykotoxinbildende *Fusarium* spp.** 31

K. Brunner, Maria Paula Kovalsky, Guadalupe Paolino, H. Bürstmayr, M. Lemmens, F. Berthiller,  
R. Schuhmacher, R. Krska & R. L. Mach

**Eine quantitative PCR Methode zur *Fusarium* Resistenzbestimmung** 35

Vinay Vishwanath, M. Sulyok, R. Krska & R. Schuhmacher

**Determination of moulds and their metabolites in indoor environments** 41

J. Böhm, Elisabeth Reiter, M. Hollmann & E. Razzazi-Fazeli

**Mykotoxikosen beim Hund** 47

Sabine Kemmlein, H. Klaffke & Angelika Preiß-Weigert

**Erarbeitung von Analysemethoden zur Bestimmung von Mutterkornalkaloiden und  
Monitoring in ausgewählten Lebensmitteln** 50

Ulla Reichhart	
<b>Mykotoxine aus Sicht der Futtermittelkontrolle</b>	54
Elke Rauscher-Gabernig & R. Grossgut	
<b>Abschätzung der Verbraucherexposition für Ochratoxin A und Patulin durch den Verzehr von Lebensmitteln des österreichischen Marktes 2003 - 2007</b>	57
Alexandra Scholz, Susanne von Barga, F. Hennig, Monika Goßmann & Carmen Büttner	
<b>Schnellmethode zur Pathogenitätsprüfung von <i>Fusarium</i> spp. an Spargeljungpflanzen</b>	61
Karin Griessler & Ursula Hofstetter	
<b>Studie über das weltweite Vorkommen von Mykotoxinen in DDGS Proben</b>	65
Karin Griessler & Ursula Hofstetter	
<b>Vorkommen von unterschiedlichen Mykotoxinen in Europa</b>	68
Alexandra Molinelli, Barbara Cvak & Rudolf Krska	
<b>Entwicklung von semi-quantitativen immunodiagnostischen Schnelltests für den Nachweis von Mykotoxinen in Weizen und Mais</b>	71
O. Vendl, F. Berthiller, C. Crews, R. Schuhmacher, G. Adam & R. Krska	
<b>Detektion maskierter <i>Fusarium</i> Mykotoxine in getreidebasierten Lebensmittel</b>	76
W. Brodacz & A. Della Rosa	
<b>GC-Analytik von B-Trichothecenen in Bier</b>	81
R. Köppen, M. Sulyok, M. Koch, R. Krska & R. Schuhmacher	
<b>Entwicklung und Validierung einer Methode zur exakten Bestimmung von gesetzlich geregelten Mykotoxinen mittels Isotopenverdünnung-Massenspektrometrie - Erste Ergebnisse</b>	85
M. Oberforster	
<b>Systeme zur Bewertung der Anfälligkeit von Getreidesorten gegenüber <i>Fusarium</i> in europäischen Ländern</b>	92
 <b>Teil 2: Weitere Beiträge</b>	
A. Adler, P. Kiroje, F. Glösmann & Sandra Brunner	
<b><i>Fusarium</i>-Arten und DON-Gehalt in Weizen aus Österreich, Erntemonitoring 2005 - 2007</b>	97
A. Adler & P. Kiroje	
<b><i>Fusarium</i>-Arten und Mykotoxine bei Mais in Österreich, Erntemonitoring 2004 - 2007</b>	103

## **Mykotoxinrisiko aus Sicht der amtlichen Lebensmittelkontrolle**

*Mycotoxin-risk from point of view of official food control*

F. VOJIR

**Zusammenfassung:** Die Europäische Kommission, Generaldirektion SANCO, ist die zuständige Behörde um Risikomanagementmaßnahmen im Bereich Lebensmittel und Futtermittel zu treffen. Sofortmaßnahmen gemäß Art. 53 VO (EG) Nr. 178/2002 oder intensivierete Importkontrollen gemäß Art. 15 VO (EG) Nr. 882/2004 sind mögliche Instrumente des Risikomanagements. Derzeit sind eine Reihe von Sofortmaßnahmen als Entscheidungen der Kommission in Geltung, die sich auf Mykotoxine (Aflatoxine) beziehen. Dabei werden Produkte und zugehörige Drittstaaten nach ihrem Risiko und ihrer Vertrauenswürdigkeit bei Eigenkontrollen der Unternehmer und der Exportkontrollen der zuständigen Behörden beurteilt. Seit dem Jahr 2002 hat sich ein eingespieltes System für solche Importkontrollen in Österreich etabliert.

**Summary:** The European Commission, General Direction SANCO, is the competent authority for setting risk management measures in the field of food and feed. Emergency measures as laid down in art. 53, regulation (EC) No 178/2002 or more extensive import control activities as laid down in art. 15, regulation (EC) No 882/2004 are measures for risk management. At present a number of emergency measures published as decisions of the commission concerning mycotoxins (aflatoxines) are in force. Products and belonging third countries are judged by their risk and confidence of the self control systems of the food operators and the export control systems of the competent authorities. Since 2002 a system for realising such import controls was well established in Austria.

**Key words:** amtliche Importkontrolle, nichttierische Lebensmittel, Mykotoxine  
official import control, food of nonanimal origin, mycotoxins

Der Europäischen Kommission, Generaldirektion SANCO, als zuständige Behörde der Europäischen Gemeinschaft für Risikomanagementmaßnahmen im Bereich Import nichttierischer Lebensmittel und Futtermittel, stehen hauptsächlich zwei Rechtsinstrumente für Maßnahmen bezüglich mykotoxinkontaminierter Ware zur Verfügung.

- 1) **Sofortmaßnahmen** gemäß Artikel 53 Verordnung (EG) Nr. 178/2002 für den Fall, dass ein Lebensmittel oder Futtermittel aus einem Mitgliedstaat oder aus einem Drittland wahrscheinlich ein ernstes Risiko für die Gesundheit von Mensch oder Tier oder für die Umwelt darstellt. Diese Sofortmaßnahmen werden als Entscheidungen der Kommission veröffentlicht und sind als solche direkt geltendes Recht für die Mitgliedstaaten. Sie enthalten meist sehr detaillierte Vorschriften (Gesundheitszertifikate, Analysenzertifikate,

Importkontrollen der Gemeinschaft), die von den Exportländern erfüllt werden müssen, um die Ware importieren zu können.

- 2) **Intensivierte Importkontrollen** gemäß Artikel 15 der Verordnung (EG) Nr. 882/2004 durch die Mitgliedstaaten entsprechend einer Risikobewertung der Produkte und der Exportländer. Entsprechend Artikel 15 Absatz 5 wird von der Europäischen Kommission eine Liste von risikoreichen Lebensmitteln und Futtermitteln erstellt und im Ständigen Ausschuss für die Lebensmittelkette und die Tiergesundheit von den Mitgliedstaaten diskutiert und freigegeben. In einer Arbeitsgruppe der Europäischen Kommission wird zur Zeit eine Verordnung diskutiert, die als Anhang diese Liste enthält. Die Liste soll die betroffenen Exportländer, die risikoreiche Ware, den zu kontrollierenden Parameter und die Kontrollfrequenz mit der die Importe zu überprüfen sind umfassen.

Derzeit sind eine Reihe von Sofortmaßnahmen, die sich auf Mykotoxine beziehen als Entscheidungen der Kommission in Geltung, wobei immer die Kontamination mit Aflatoxinen angesprochen wird.

#### Derzeit geltende Entscheidungen der Kommission bezüglich Aflatoxine

Produkt	Ursprungsland	% der zu kontrollierenden Importe
Feigen, Haselnüsse, Pistazien und Erzeugnisse daraus	Türkei	10 5 (ganze Haselnüsse)
Erdnüsse und Erzeugnisse daraus	China	10
Pistazien und Erzeugnisse daraus	Iran	100
Mandeln und Nuss- oder Trockenfrüchtemischungen, die Mandeln enthalten	USA	100 5 bei VASP (Voluntary Aflatoxin Sampling Plan)
Erdnüsse und Erzeugnisse daraus	Ägypten	20
Paranüsse in Schale und Nuss- oder Trockenfrüchtemischungen die Paranüsse in Schale enthalten	Brasilien	100
Erdnüsse und Erzeugnisse daraus	Brasilien	50

Die einzelnen Produkte und Drittstaaten werden aufgrund von Meldungen von Ergebnissen von Importkontrollen der Mitgliedstaaten oder aufgrund der Ergebnisse von Kontrollen des Food and Veterinary Office (FVO) vor Ort in den Exportstaaten als risikobehaftet bestimmt. Bei den Drittstaatenkontrollen wird neben der Beurteilung der Quellen und der Abhilfemaßnahmen von Mykotoxinkontaminationen auch die Vertrauenswürdigkeit der Eigenkontrollen der Erzeuger und der Exportkontrollen durch die Behörden der Drittländer überprüft.

Grenzwerte, die zur Beurteilung der Waren heranzuziehen sind, sind in der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 festgelegt. Während die Vorgangsweise bei der Probenziehung, bei der Probenvorbereitung im Untersuchungslabor der amtlichen Proben und die Mindestleistungskriterien, die die zur Aflatoxinuntersuchung angewandten Methoden erfüllen müssen, in der Verordnung (EG) Nr. 401/2006 enthalten sind.

In der Praxis teilen die Zollbehörden jeden in Frage kommenden beabsichtigten Import den Lebensmittelaufsichtsbehörden mit und diese entscheiden gemäß den vorgeschriebenen Kontrollfrequenzen ob die Lieferung beprobt wird oder ohne Probenahme verzollt werden darf. Wird eine Probenahme durchgeführt, bleibt die Ware unter Zollaufsicht (maximal 15 Arbeitstage) bis das Untersuchungsergebnis vorliegt. Dann wird von der Lebensmittelaufsichtsbehörde entschieden, ob die Lieferung zur Verzollung freigegeben wird oder der Import verweigert wird. Der Lebensmittelunternehmer hat dann zu entscheiden, ob die Ware zurückgesandt wird, einer anderen Verwendung zugeführt wird oder vernichtet wird. Wird ein Import verweigert, wird diese Information gleichzeitig auch über das RASFF-System (Schnellwarnsystem) der Europäischen Kommission an die Kommission und die anderen Mitgliedstaaten weitergeleitet, um einen neuerlichen Importversuch an einer anderen Zollstelle in einem der Mitgliedstaaten zu verhindern.

Diese Art der Importkontrolle wird seit dem Jahr 2002 durchgeführt. Über die Jahre wurde der Umfang der zu kontrollierenden Produkte und Exportländer erweitert. Dabei werden die Ergebnisse der Kontrollen regelmäßig evaluiert. So wurde die Kontrollfrequenz für Pistazien aus dem Iran nicht verändert, da nach wie vor hohe Beanstandungsraten gefunden werden. Bei ganzen Haselnüssen aus der Türkei wurden zunächst 10% der Produkte kontrolliert. Aufgrund des Rückgangs der Beanstandungen wurde die Kontrollfrequenz auf 5% reduziert. Bei Haselnusspaste, geriebenen oder geschnittenen Haselnüssen blieb die Kontrollfrequenz aufrecht, da sich die Beanstandungsraten nicht wesentlich verändert haben.

Hinsichtlich der Verordnung gemäß Artikel 15 Absatz 5 der Verordnung (EG) Nr. 882/2004 ist noch vieles nicht geklärt, sodass eine endgültige Darstellung des geplanten Inhalts noch nicht gegeben werden kann.

Der zuletzt vorgelegte Vorschlag für die Tabelle im Anhang der Verordnung enthält bezüglich Mykotoxine folgende Produkte, Drittstaaten, Kontaminanten und Kontrollfrequenzen. Diese Tabelle soll flexibel handhabbar sein, sodass man kurzfristig auf neu auftretende Probleme reagieren kann.

**Vorschläge im Verordnungsentwurf zu Art. 15 (5) der VO (EG) Nr. 882/2004**

<b>Produkt</b>	<b>Ursprungsland</b>	<b>Parameter</b>	<b>% Kontrolle der Importe</b>
Erdnüsse und Produkte	Argentinien	AFLA	10
Erdnüsse und Produkte	Brasilien	AFLA	50
Erdnüsse und Produkte (speziell Erdnussbutter)	Ghana	AFLA	100
Erdnüsse und Produkte	Vietnam	AFLA	10
Haselnüsse und Produkte	Aserbeidschan	AFLA	20
Gewürze	Indien	AFLA	50
Sonnenblumenkerne	Ägypten	AFLA	50
Melonenkerne und Produkte	Nigeria	AFLA	50
Basmati Reis	Pakistan	AFLA	20
Basmati Reis	Indien	AFLA	5
Getrocknete Weintrauben	Afghanistan	OTA	10
Getrocknete Weintrauben	Usbekistan	OTA	50

**Autor:**

Dr. Franz VOJIR, Bundesministerium für Gesundheit, Familie und Jugend, Radetzkystraße 2, 1030 Wien, Austria

# **Aflatoxine B1, B2, G1, G2 und M1 in Lebensmitteln des österreichischen Marktes**

## **Abschätzung der Verbraucherexposition**

*Aflatoxins B1, B2, G1, G2 and M1 in food stuff of the Austrian market*

*Assessment of consumer exposure*

ELKE RAUSCHER-GABERNIG & R. GROSSGUT

### **Summary**

Aflatoxins may occur in cereals, nuts, dried fruit and spices originating from regions with warm and humid climates. Regulation (EC) No 1881/2006 sets up maximum levels for aflatoxins in certain food stuffs to protect consumers. About 16 % of the 1311 tested food samples were contaminated with aflatoxins to a certain extent. However, most of the concentrations were well below the maximum levels. Only in 2.2 % of the samples concentrations above the maximum levels were measured. The calculated MoE-values may indicate some concern for human health. However these values are not equivalent to the incidence of hepatocellular carcinoma which is much lower. Due to low MoE-values all measures have to be taken to keep aflatoxin concentrations in food as low as possible.

**Keywords:** aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin G2, aflatoxin M1, consumer exposure

### **Zusammenfassung**

Aflatoxine können vor allem in Getreide, Nüssen, Trockenfrüchten und Gewürzen aus Regionen mit warmem, feuchtem Klima enthalten sein. Die Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 legt Höchstgehalte für Aflatoxine in bestimmten Lebensmitteln zum Schutz der Verbraucher fest. Rund 16 % der 1311 untersuchten Lebensmittel wiesen eine Belastung mit Aflatoxinen auf. Die gemessenen Gehalte an Aflatoxinen lagen zum Großteil unter den gesetzlichen Höchstgehalten. Nur 2,2 % aller Proben enthielten Gehalte, welche die Höchstgehalte überschritten. Die berechneten MoE-Werte für Aflatoxine weisen zwar auf mögliche Bedenken für die Gesundheit des Menschen hin. Diese sind jedoch nicht gleichzusetzen mit der Inzidenz der Leberkrebserkrankungen, welche viel niedriger liegt. Aufgrund der niedrigen MoE-Werte sind alle Maßnahmen zu treffen, um die Aflatoxingehalte in Lebensmittel so niedrig wie möglich zu halten.

**Schlüsselwörter:** Aflatoxin B1, Aflatoxin B2, Aflatoxin G1, Aflatoxin G2, Aflatoxin M1, Verbraucherexposition

## **Einleitung**

Aflatoxine B1, B2, G1 und G2 werden von Pilzen der Gattung *Aspergillus* in Regionen mit warmem, feuchtem Klima gebildet. Sie kontaminieren vor allem Getreide, Nüsse, Trockenfrüchte und Gewürze. Aflatoxin M1 ist ein Metabolit von Aflatoxin B1, der in Milch nachgewiesen werden kann. Das häufigste und am besten untersuchte Aflatoxin ist Aflatoxin B1, welches genotoxisch und kanzerogen ist. Um die Verbraucher vor einer unannehmbaren Belastung zu schützen, wurden daher in der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 Höchstgehalte für Aflatoxine in bestimmten Lebensmitteln festgelegt (Europäische Kommission, 2006).

## **Gefahrenidentifizierung**

Aflatoxine sind stabile Difuranocumarin-Derivate, die bei der herkömmlichen Lebensmittelzubereitung nicht zerstört werden können (MacDonald und Castle, 1996).

## **Gefahrencharakterisierung**

Aflatoxine können Leberkrebs verursachen, zusätzlich können sie einige wichtige toxische Effekte auslösen. In hohen Konzentrationen führen Aflatoxine zu akuter Toxizität und Tod, chronische subletale Dosierung nimmt Einfluss auf den Ernährungszustand und das Immunsystem (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA), 2007). Aflatoxine zählen zu den wirksamsten bekannten mutagenen und kanzerogenen Substanzen, wobei Aflatoxin B1 die wirksamste davon ist (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 1998). Für genotoxische Kanzerogene kann kein Schwellenwert festgelegt werden, bis zu dem die Aufnahme der Substanz ohne negative Effekte angenommen werden kann.

## **Expositionsabschätzung**

Im Zeitraum 2003 - 2007 wurden in Österreich 1124 Proben von Lebensmitteln auf die Aflatoxine B1, B2, G1 und G2 und 187 Proben auf Aflatoxin M1 untersucht. Die durchschnittlichen Gehalte wurden jeweils für alle Messdaten einer Lebensmittelgruppe berechnet, indem Ergebnisse unterhalb der Nachweisgrenze gleich der Hälfte der Nachweisgrenze gesetzt wurden und Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze gleich einem Sechstel der Bestimmungsgrenze. Die ermittelten durchschnittlichen Mykotoxingehalte in den einzelnen Lebensmittelgruppen sind Tabelle 1 zu entnehmen. Anhand der Untersuchungsdaten 2003-2007 und der österreichischen Verzehrdaten wurde die Exposition gegenüber den Aflatoxinen bei durchschnittlichem Verzehr aller relevanten Lebensmittel für verschiedene Bevölkerungsgruppen abgeschätzt. Die tägliche durchschnittliche Exposition betrug für Vorschulkinder 3,2 ng/kg KG für die Summe der Aflatoxine B1, B2, G1 und G2 und 0,016 ng/kg KG Aflatoxin M1, für Frauen 2,2 ng/kg KG für die Summe der Aflatoxine B1, B2, G1 und G2 und 0,004 ng/kg KG Aflatoxin M1, für Männer 1,9 ng/kg KG für die Summe der Aflatoxine B1, B2, G1 und G2 und 0,004 ng/kg KG Aflatoxin M1 (Tab. 2).

Tab. 1: Durchschnittliche Gehalte von Aflatoxinen in verschiedenen Lebensmittelgruppen

Lebensmittel- gruppe	Anzahl Proben gesamt/ positiv	Durchschnittliche Gehalte in µg/kg					
		Aflatoxin B1	Aflatoxin B2	Aflatoxin G1	Aflatoxin G2	Summe Aflatoxine B1, B2, G1, G2	Aflatoxin M1
Nüsse	432/101	0,44	0,1	0,36	0,1	1	-
Getreide	191/18	0,08	0,04	0,05	0,05	0,22	-
Trockenfrüchte	88/9	0,41	0,06	0,4	0,1	0,97	-
Gewürze	266/73	0,73	0,07	0,23	0,15	1,18	-
Kakao	59/7	0,12	0,06 <sup>a</sup>	0,1	0,08 <sup>a</sup>	0,36	-
Kerne, Samen, Öle	28/4	0,06	0,04 <sup>a</sup>	0,08	0,09	0,27	-
Kindernährmittel	60/1	0,01 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,01	0,04	-
Getreidebeikost							
Milch	187/0	-	-	-	-	-	0,0012 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Gehalte aller Proben lagen unter der Bestimmungsgrenze

Tab. 2: Durchschnittliche alimentäre Exposition zu Aflatoxinen für verschiedene Bevölkerungsgruppen

Bevölkerungs- gruppe	Durchschnittliche Exposition in ng/kg KG/d					
	Aflatoxin B1	Aflatoxin B2	Aflatoxin G1	Aflatoxin G2	Summe Aflatoxine B1, B2, G1, G2	Aflatoxin M1
Vorschulkinder	1,3	0,4	1,0	0,5	3,2	0,016
Frauen	0,9	0,3	0,7	0,3	2,2	0,004
Männer	0,8	0,2	0,6	0,3	1,9	0,004

### Risikocharakterisierung

Zur Risikobewertung genotoxischer Kanzerogene erfolgt die Berechnung des Margin of Exposure (MoE). Hierbei wird die geschätzte Exposition des Menschen der ermittelten Benchmark Dose (BMD) aus Tierversuchsstudien gegenübergestellt. Bei einem MoE-Wert von 10.000 oder höher wird das Risiko als ein „Risk of Low Concern“ angesehen (EFSA, 2005). Da nur für Aflatoxin B1 ausreichend Daten zur Verfügung stehen, wurde als konservativer Ansatz für die Risikobewertung angenommen, dass das kanzerogene Potential der Summe der Aflatoxine gleich dem von Aflatoxin B1 ist. Bei einer BMD von 170 ng/kg KG/d (EFSA, 2007) und durchschnittlicher

Exposition ergab sich ein MoE für Aflatoxin B1 von 131 für Vorschulkinder, von 189 für Frauen und von 213 für Männer. Die MoE-Werte für die Summe der Aflatoxine lagen bei durchschnittlicher Aufnahme zwischen 53 – 89. Die ermittelten MoE-Werte weisen zwar auf mögliche Bedenken für die Gesundheit des Menschen hin, jedoch sind diese nicht gleichzusetzen mit der Inzidenz der Leberkrebserkrankungen. Bei einer geschätzten Aflatoxin B1-Aufnahme von 1 ng/kg KG/d und geringer Prävalenz für Hepatitis B-Infektionen sind 0,01 Fälle einer zusätzlichen Leberkrebserkrankung pro 100.000 Einwohner und Jahr zu erwarten (JECFA, 1998). In 84 % der 1311 untersuchten Lebensmittelproben konnten keine Gehalte von Aflatoxinen nachgewiesen werden. Rund 16 % der Lebensmittel wiesen messbare Gehalte an Aflatoxinen auf. 2,2 % aller Proben enthielten Gehalte, die über den gesetzlichen Höchstgehalten lagen. Im Hinblick auf die niedrigen MoE-Werte sind alle Maßnahmen zu treffen, um die Aflatoxingehalte in Lebensmittel so niedrig wie möglich zu halten.

### **Literatur**

Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (2005): Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. The EFSA Journal 282, 1-31.

Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (2007): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. The EFSA Journal 446, 1-127.

Europäische Kommission (2006): Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln. Amtsblatt der Europäischen Union L 364, 20.12.2006, 5-24.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (1998): Safety evaluation of certain food additives and contaminants. World Health Organisation, Food Additives Series 40.

MacDonald S., Castle L. (1996): A UK retail survey of aflatoxins in herbs and spices and their fate during cooking. Food Addit Contam 13(1), 121-8.

### **Autoren:**

DI Elke RAUSCHER-GABERNIG und Dr. Roland GROSSGUT, AGES, Bereich Daten, Statistik, Risikobewertung, Spargelfeldstraße 191, 1220 Wien, Austria

# Analyse von Aflatoxinen in Reis - Evaluierung der in Österreich erhältlichen Produkte

## *Analysis of aflatoxins in rice samples*

ELISABETH VIKTORIA REITER, F. VOUK, J. BÖHM & E. RAZZAZI-FAZELI

### **Summary**

A limited number of rice samples has been collected in different markets in Vienna. After comminution aflatoxin contents were analysed. In total 76 rice and 5 puffed rice samples were investigated. Additionally, the samples were also separated in conventionally and organically produced rice, where 44 samples were produced conventionally and 37 organically. In 24 samples detectable amounts of aflatoxins were measured. The maximum levels set in the European Union were exceeded in three samples. Out of 24 contaminated rice samples only 3 were produced organically.

### **Keywords**

Rice, aflatoxin G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, immunoaffinity columns, HPLC

### **Zusammenfassung**

Eine Auswahl an Reisproben wurde in Märkten und Supermärkten in Wien erworben und nach ihrer vollständigen Zerkleinerung auf ihre Aflatoxinkonzentration untersucht. Insgesamt wurden 76 Reisproben sowie 5 Reiswaffeln analysiert, wovon 44 aus konventionellem Anbau und 37 aus biologischem Anbau stammten. In 24 Proben wurden Aflatoxine gefunden, wobei in drei Reisproben die in Europa festgelegten Höchstwerte überschritten wurden. Drei Reisproben biologischen Ursprungs enthielten Spuren von Aflatoxinen.

### **Schlüsselwörter**

Reis, Aflatoxin G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, Immunaффinitätssäulchen, HPLC

### **Einleitung**

Reis ist eines der wichtigsten Nahrungsmittel weltweit. Derzeit werden jährlich rund 661 Mio. Tonnen produziert. Der Pro-Kopf-Verbrauch beträgt weltweit jährlich rund 57.2 kg Reis. Einem geringen Reiskonsum von nur 3.9 kg pro Person in Österreich stehen rund 200 kg pro Kopf in Asien gegenüber [1, 2]. Die Überprüfung von Reis und Reisprodukten zeigte in letzter Zeit immer wieder die mögliche Kontamination mit Aflatoxinen. Als Beispiel ist hier das Auftreten von AFM<sub>1</sub> in Milch zu nennen, welches auf die Verfütterung von mit Aflatoxinen kontaminierten Nebenprodukten der Reisherstellung zurückzuführen war. Hier konnten Höchstkonzentrationen von 154 µg kg<sup>-1</sup> in Reissfüttermitteln, einem Nebenprodukt der Basmatireisherstellung, nachgewiesen werden [3].

Eine Überprüfung von je 10 Basmati- und Jasminreisproben zeigte geringe Konzentrationen von Aflatoxinen B<sub>1</sub> (<1.5 µg kg<sup>-1</sup>) in allen Basmatireisproben und Spuren von AFB<sub>1</sub> in einer Jasminreisprobe [4]. Laut RASFF konnten im heurigen Jahr bisher in 26 Proben Aflatoxine, die den festgesetzten Grenzwert überschritten, nachgewiesen werden, wobei überwiegend Reisproben aus Indien und Pakistan mit Aflatoxinen kontaminiert waren [5].

In Vietnam wurden 100 Reisproben, je zur Hälfte aus der Trocken- bzw. Regenzeit, auf deren mögliche Kontamination mit AFB<sub>1</sub> untersucht, wobei in 51% der Proben AFB<sub>1</sub> nachgewiesen werden konnte. Zehn Proben haben die erlaubten Höchstgehalte der EU von 2 µg kg<sup>-1</sup> überschritten. In der Regenzeit konnten höhere AF-Konzentrationen nachgewiesen werden [6].

In der Elfenbeinküste wurden Reisproben auf AFB<sub>1</sub> untersucht, wobei in allen 10 Proben AFB<sub>1</sub> in Konzentrationen von unter 1,5 µg kg<sup>-1</sup> Reis nachgewiesen werden konnte [7]. In 1511 indischen parboiled Reis-Proben konnte bei 38% eine AFB<sub>1</sub>-Konzentration von >5 µg kg<sup>-1</sup> in 17% eine Konzentration von > 30 µg kg<sup>-1</sup> festgestellt werden [8]. In dieser Studie wurden Reis und Reisprodukte am Österreichischen Markt erhoben.

## Material und Methoden

Die zu untersuchenden Reis und Reisprodukte unterschiedlicher Herkunft wurden in verschiedenen Geschäften in Wien und Umgebung erworben. Neben handelsüblichen Packungen (0.5 bzw. 1kg) wurden auch größere Gebinde mit 2, 2.5 und 5 kg erworben und anschließend mittels Schlagmühle zerkleinert (1mm)

50 g Probe wurden mit 100 ml MeOH/H<sub>2</sub>O dest. (80:20) 30 Minuten auf einem Magnetrührer extrahiert und anschließend über einen Faltenfilter filtriert. Ein Aliquot (2 ml) wurde mit 14 ml PBS verdünnt und auf die Immunaффinitätssäule aufgetragen und anschließend mit 20 ml PBS nachgewaschen und mittels Anlegen von Vakuum trockengesaugt. Die Elution erfolgte mit 1.5 ml Methanol (5 min Einwirkzeit) und Backflushing und in Epruvetten gesammelt. Anschließend wurde mit 1,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> nachgewaschen und gevortext. Ein Aliquot (100 µl) wurde direkt in die HPLC Anlage injiziert.

## Ergebnisse

In 24 der 81 Proben konnten Aflatoxine nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist, dass es sich bei 22 der positiven Proben um Basmatireis handelt, bei 2 Langkornreis. Es wurde überwiegend AFB<sub>1</sub> detektiert, in einer Probe ägyptischen Langkornreis konnten jedoch AFB<sub>2</sub> und AFG<sub>2</sub> nachgewiesen werden. Die weiteren positiven Reisproben stammen aus Indien (21) und Pakistan (2). Drei Reisproben enthielten Aflatoxin-Konzentrationen über den in der EU gesetzlich erlaubten Höchstwerten (2 µg kg<sup>-1</sup> AFB<sub>1</sub> bzw. 4 µg kg<sup>-1</sup> Aflatoxin total). Bei den Reisproben aus biologischem Anbau

konnten lediglich in 3 Fällen, allerdings in geringen Konzentrationen (<LOD), Aflatoxine nachgewiesen werden. Eine Übersicht über die AF-Konzentrationen ist in Tabelle 1 ersichtlich.

	Anzahl der Proben	Positive Proben	Aflatoxinkonzentration $\mu\text{g kg}^{-1}$				
			AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	AFT
Basmatireis	39	22	0,45 - 9,40	1,5	-	-	0,45 – 11,36
Jasminreis	11	-	-	-	-	-	-
Langkornreis	10	2	1,15	< LOQ	-	< LOQ	1,15
Rundkornreis	5	-	-	-	-	-	-
Naturreis	11	-	-	-	-	-	-
Reiswaffeln	5	-	-	-	-	-	-

**Tabelle 1:** Aflatoxin-Konzentrationen in Reis und Reiswaffeln

Eine Ursache, warum vor allem Basmatireis von einer Kontamination durch Aflatoxine betroffen ist, könnten die bei dieser Reissorte üblichen langen Lagerungszeiten sein, die mit Texturveränderungen einhergehen. Dies ist durch die Präferenzen der einzelnen Konsumenten zu erklären, wobei in China und Japan eher frischer Reis bevorzugt wird, wird hingegen in Indien eher gelagerter Reis präferiert [9].

### Schlussfolgerungen

Im Vergleich zu RASFF-Warmmeldungen spiegelt es sich in den dargestellten Ergebnissen wieder, dass überwiegend Reis aus Pakistan und Indien kontaminiert sind. Dennoch ist ein Screening insbesondere bei Basmatireissorten zu empfehlen (Lagerung!!!). Auch der Einfluss von Nebenprodukten der Reisproduktion als Tierfutter ist zu berücksichtigen (Beispielsweise AFM<sub>1</sub>).

### Referenzen

1. FAO, Rice is Life. International Year of Rice 2004 and its implementation. 2005, Rome.
2. Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, U.u.W., Lebensmittelbericht 2008. web: <http://www.lebensmittelnet.at/article/articleview/63881/1/24306>, 7<sup>th</sup> July, 2008.
3. Nordkvist, E., A. Stepinska, and P. Häggblom, Aflatoxin contamination of consumer milk caused by contaminated rice by-products in compound cattle feed. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2008. 89(2): p. 359 - 361.

4. Nordkvist, E., P. Häggblom, and A. Stepinska. Rice by-products as source for aflatoxin contamination in milk - a case study. in XII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, May 21.-25. 2007. Istanbul.
5. RASFF, Rapid Alert System for Food and Feed, Weekly Overview Reports: [http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/archive\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/archive_en.htm) 8<sup>th</sup> October. 2008.
6. Nguyen, M.T., et al., Occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub>, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. Food Chemistry, 2007. 105(1): p. 42-47.
7. Sangare-Tigori, B., et al., Co-occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub>, fumonisin B<sub>1</sub>, ochratoxin A and zearalenone in cereals and peanuts from Cote d'Ivoire. Food Additives & Contaminants: Part A, 2006. 23(10): p. 1000-1007.
8. Toteja, G.S., et al., Aflatoxin B<sub>1</sub> contamination of parboiled rice samples collected from different states of India: A multi-centre study. Food Additives & Contaminants: Part A, 2006. 23(4): p. 411-414.
9. Zhou, Z., et al., Ageing of Stored Rice: Changes in Chemical and Physical Attributes. Journal of Cereal Science, 2002. 35(1): p. 65-78.

**Autoren:**

Elisabeth Viktoria REITER, F. VOUK, Josef BÖHM und Ebrahim RAZZAZI-FAZELI, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, 1210 Wien, Austria

# Strategien zur Entgiftung Mykotoxin-kontaminierter Futtermittel und Zulassung von Mykotoxin-Inaktivatoren in der EU

*Strategies for detoxifying mycotoxin contaminated feed and authorisation of mycotoxin deactivators in the EU*

G. SCHATZMAYR & DIAN SCHATZMAYR

## Summary

In spite of all efforts to implement effective prevention strategies mycotoxin contaminations still occur. Recent survey studies showed that many grain based agricultural commodities contain at least one of the major mycotoxins. For a comprehensive mycotoxin risk management mycotoxin deactivating products play therefore an important role on the global market. As mycotoxins vary in their chemical structures and thus differ in their physical and biochemical properties, mycotoxin deactivators should comprise different strategies, including adsorption, biotransformation/-degradation as well as bioprotection. The feed additive Regulation (EC) 1831/2003, however, does not recognise yet mycotoxin deactivators. Thus it is at present impossible to submit an application for a respective feed additive in Europe. Initiated by BIOMIN, the European Federation of the Feed Additive Manufacturers (FEFANA) has therefore set up a Task Force with the aim to get a new functional group opened in the category of technological feed additives, defined as “mycotoxin adsorbents and/or mycotoxin deactivators” and to subsequently create a legal basis for such products for the benefit of producers and consumers.

**Key words:** Mycotoxin deactivators, *Eubacterium BBSH*, *T. mycotoxinivorans*, Task Force for Mycotoxin Inactivators

## Zusammenfassung

Trotz aller Bestrebungen, die Bildung von Mykotoxinen durch präventive Maßnahmen in den Griff zu bekommen, treten nach wie vor beträchtliche Kontaminationen auf. Neueste Studien haben gezeigt, dass die meisten landwirtschaftlichen Produkte (Getreide basierend), zumindest eines der wesentlichen Mykotoxine beinhalten. Für ein umfassendes Mykotoxin-Risikomanagement spielen daher am Weltmarkt Mykotoxin-Inaktivatoren eine wesentliche Rolle. Mykotoxine variieren in ihrer chemischen Struktur, was zu Unterschieden in ihren physikalischen und biochemischen Eigenschaften führt. Aufgrund dieser Unterschiede sollten Mykotoxin-Inaktivatoren auch unterschiedliche Strategien zur Mykotoxin-Bekämpfung beinhalten, wie Adsorption, Biotransformation/-degradation sowie Bioprotektion. In der Futtermittelzusatzverordnung (EC) 1831/2003 sind bis heute Additive zur Bekämpfung von Mykotoxinen nicht berücksichtigt, wodurch

die gesetzliche Grundlage fehlt, solche Produkte in der EU erfolgreich zu registrieren. Aufgrund einer Initiative von BIOMIN gründete daher die Europäische Vereinigung von Futtermitteladditiv-Herstellern (FEFANA) eine Arbeitsgruppe („Task Force“) mit dem Ziel, in der Verordnung (EC) 1831/2003 eine neue funktionelle Gruppe für Mykotoxin-Inaktivatoren unter der Kategorie „Technologische Futteradditive“ geöffnet zu bekommen, um damit den legalen Einsatz solcher Produkte zum Nutzen von Produzenten und Konsumenten zu ermöglichen.

**Schlüsselwörter:** Mykotoxin Inaktivatoren, *Eubacterium BBSH 797*, *Trichosporon mycotoxinivorans*, Task Force für Mykotoxininaktivatoren

Obwohl präventive Maßnahmen zur Reduktion des Schimmelpilzwachstums und der Bildung von Mykotoxinen bereits umfassend Eingang in die Produktion von Lebens- und Futtermitteln gefunden haben, sind Mykotoxinkontaminationen noch weit verbreitet, wie dies durch Ergebnisse verschiedener Monitoring Programme verdeutlicht wird. So haben Binder *et al.* (2007) beispielsweise gezeigt, dass in den Jahren 2003 – 2005 66% von 1507 untersuchten landwirtschaftlichen Produkten (Mais, Soja, Weizen, Futter, etc.) mit Deoxynivalenol kontaminiert waren. Um den Einfluss der Mykotoxine auf die Tiergesundheit zu vermindern, werden in der landwirtschaftlichen Praxis daher Mykotoxin-inaktivierende Produkte eingesetzt. Ein Großteil dieser Produkte besteht aus Tonmineralen, die Mykotoxine im Verdauungstrakt von Tieren binden und damit der Resorption entziehen sollen. Wie eine Studie mit über 85 kommerziell erhältlichen Produkten gezeigt hat, funktioniert die Bindung von Aflatoxinen mit dem Großteil der Produkte in einem *in vitro* Puffersystem sehr gut – die besten Produkte konnten 200 µg/kg Aflatoxin B1 bei einer Einsatzkonzentration von 0,2% sowohl bei pH3 als auch pH6,5 vollständig binden (Abbildung 1).

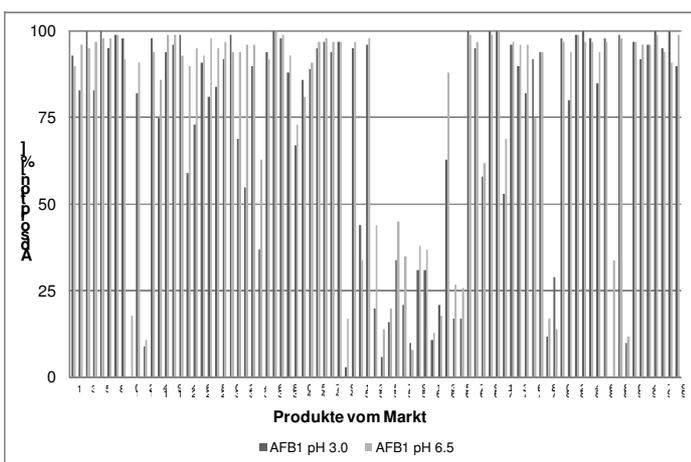


Abbildung 1: Aflatoxin B1 (AFB1) Adsorptionsverhalten von kommerziell erhältlichen Produkten in einem *in vitro* Puffersystem (pH 3, pH 6,5)

Im Vergleich dazu konnte keines der getesteten Produkte Deoxynivalenol in ausreichendem Maße adsorbieren. Die maximalen Bindungsraten in dem *in vitro* Testsystem (0,2% Produkt; 2 mg/kg DON) betragen 25% bei pH3 und 20% bei pH 6,5 (Abbildung 2).

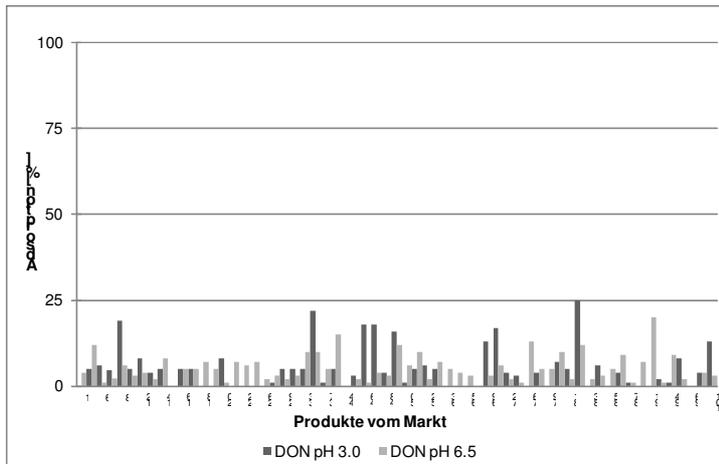


Abbildung 2: Deoxynivalenol (DON) Adsorptionsverhalten von kommerziell erhältlichen Produkten in einem *in vitro* Puffersystem (pH 3, pH 6,5)

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass man mit einer einzigen Strategie (Adsorption) das Problem von Mykotoxinen in Futtermitteln nicht in den Griff bekommen kann, da man es mit einer Gruppe von chemisch sehr unterschiedlichen Schimmelpilz-Sekundärmetaboliten zu tun hat. Zur umfassenderen Mykotoxinentgiftung bereits kontaminierter Futtermittel ist es daher unumgänglich, zusätzlich weitere Strategien in Angriff zu nehmen. Ein wirksamer Weg ist der Einsatz von speziellen Mikroorganismen und deren Enzymen, die Mykotoxine in ungiftige oder deutlich weniger giftige Metaboliten biotransformieren oder biodegradieren können. Unsere Forschungsgruppe isolierte bereits Ende der 1990er Jahre ein anaerobes Bakterium (BBSH 797) aus dem Pansen von Wiederkäuern (Binder *et al.*, 1998), das imstande ist, Trichothecene durch eine Reduktion am 12,13 Epoxid Ring zu entgiften (Fuchs *et al.*, 2002; Schatzmayr *et al.*, 2006). Einige Jahre später konnte ein neuer Hefestamm isoliert und charakterisiert werden (Molnar *et al.*, 2006), der Ochratoxine durch Abspaltung des Phenylalaninrings in das ungiftige Ochratoxin alpha überführen kann. Dieser Stamm ist auch in der Lage, Zearalenon durch Ringspaltung in einen nicht östrogenen Metaboliten zu überzuführen (Schatzmayr *et al.*, 2006). Neben den landwirtschaftlich relevanten Mykotoxinen (Aflatoxine, Trichothecene, Zearalenon, Ochratoxine, Fumonisine, etc.) gibt es noch weitere ca. 300 identifizierte Mykotoxine, deren Wirkungsweise zum Teil noch nicht geklärt ist. Daher wird auch die Strategie der „Bioprotektion“ zur Linderung von Mykotoxinverursachten Gesundheitsproblemen praktisch im Tierernährungsbereich eingesetzt. Diese Strategie umfasst den Einsatz von Pflanzenextrakten und Algenbestandteilen, die einerseits eine hepatoprotektive Wirkung ausüben und andererseits das Immunsystem unterstützen können. Der Einsatz von Mykotoxin-inaktivierenden Futtermittelzusätzen ist jedoch derzeit in der EU nicht geregelt. Da unter keiner der in der Futtermittelzusatzverordnung (EC) 1831/2003 definierten vier

Kategorien (siehe ANNEX I) eine funktionelle Gruppe für diese Produkte existiert und es damit auch keine Vorgaben zur Erstellung und Bewertung entsprechender Dossiers gibt, war es in der Vergangenheit auch praktisch nicht möglich, in Europa eine offizielle Zulassung für diese Produkte zu bekommen. Nachdem weltweit mittlerweile mehr als 250 solcher Produkte, vorwiegend als Mykotoxinbinder deklariert, eingesetzt werden und davon nachfragebedingt ein beachtlicher Teil auch am europäischen Markt unter anderen „claims“ verkauft und eingesetzt wird, besteht der dringende Bedarf einer gesetzlichen Regulierung derartiger Produkte in Europa. Mit dem grundlegenden Ziel, eine legale Basis für den Einsatz von Mykotoxin-inaktivierenden Produkten am europäischen Markt zu schaffen und gleichzeitig das in Verkehr bringen von nicht geeigneten Produkten zu verhindern, wurde auf Initiative BIOMINs vor rund drei Jahren eine entsprechende FEFANA Task Force gegründet, die seither stetig an der gesetzlichen Öffnung dieser neuen funktionellen Gruppe für Mykotoxin-Inaktivatoren arbeitet. So wurde von der Arbeitsgruppe unter anderem ein Report erstellt, der die Notwendigkeit von Mykotoxin-Inaktivatoren wissenschaftlich begründet, und Methodenvorschläge zur Evaluierung der Wirksamkeit solcher Produkte entwickelt. Diese Arbeit trägt bereits die ersten Früchte: Über die Öffnung der neuen Funktionalität wurde im Ständigen Ausschuss kürzlich umfassend diskutiert. Die dabei erkennbar positive Haltung der einzelnen Mitgliedsstaaten lässt nun erwarten, dass bei der geplanten Abstimmung im Jänner 2009 für die Öffnung einer neuen funktionellen Gruppe unter der Kategorie „Technologische Futteradditive“ gestimmt und die EFSA in der Folge offiziell mit der Erstellung von entsprechenden Leitlinien beauftragt wird. Im günstigsten Fall könnten sich dann bereits 2010-2011 die ersten Mykotoxin-Inaktivatoren als solche legal am europäischen Markt befinden.

## **Literatur**

Binder, J., Schatzmayr, G., Heidler, D., Ellend, N., Braun, R. and Binder, E.M., 1998. Microbial inactivation of trichothecenes - development of a feed additive. In: Proceedings of the 5th Feed Production Conference, Piacenza, Italy, 15-16 June 1998, edited by G. Piva, published by Tipolitografia Benedettina, Parma, pp. 71-87.

Binder, E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J. and Richard, J. (2007). Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology*, 137:265-282

Fuchs, E., Binder, E.M., Heidler, D. and Krska, R., 2002a. Structural characterisation of metabolites after the microbial degradation of A-trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797. *Food Additives and Contaminants* 19:379-386.

Molnar, O., Schatzmayr, G., Fuchs, E. and Prillinger, H.J., 2004. *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. *Applied and Systematic Microbiology* 27:661-671.

Schatzmayr, G., Zehner, F., Täubel, M., Schatzmayr, D., Klimitsch, A., Loibner, A.P., Binder, E.M. 2006. Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50 (6), pp. 543-551

**Autoren:**

Dr. Gerd SCHATZMAYR und Dian SCHATZMAYR, BIOMIN Research Center, Technopark 1,  
3430 Tulln Austria

## ***Fusarium*-Populationsentwicklung unter dem Einfluss produktionstechnischer Maßnahmen an einem Trockenstandort**

*Fusarium* population dynamics as affected by crop husbandry on a dry site

H.-P. KAUL, M. BÜCHTER, S. WICHMANN, CLAUDIA ZEITLHOFFER & M. LEMMENS

### **Summary**

The present study is based on a field experiment that has been established in 2002 and includes the factors crop rotation, tillage and irrigation. Until 2008 the incidence and severity of *Fusarium* head blight symptoms were visually scored. The expected increase in disease incidence with treatments prone to higher infection (*i.e.* short rotation, reduced tillage, irrigation after heading) was not evident. Obviously the effect of weather conditions was dominant, and only in two years with elevated infection the disease promoting effect of reduced tillage and irrigation was confirmed. Including a break crop (pea) in the crop rotation was not important.

**Key words:** *Fusarium* head blight, year, rotation, tillage, irrigation

### **Zusammenfassung**

Die vorliegende Studie basiert auf einem Feldversuch, der 2002 etabliert wurde und die Faktoren Fruchtfolge, Bodenbearbeitung und Bewässerung umfasst. Bis 2008 wurden Befallshäufigkeit und -intensität von Ährenfusariosen bei Winterweizen durch visuelle Bonituren untersucht. Der erwartete Anstieg des Befallsdrucks in Behandlungsvarianten mit erhöhter *Fusarium*-Gefährdung (enge Fruchtfolge, pfluglose Bewirtschaftung, Bewässerung nach dem Ährenschieben) konnte nicht nachgewiesen werden. Vielmehr dominierte der Witterungseinfluss, und nur in zwei Jahren mit erhöhtem Befallsniveau waren die befallsfördernden Effekte des Pflugverzichts und der Beregnung deutlich zu beobachten. Die Aufnahme von Erbsen als Nicht-Wirtspflanze in die Fruchtfolge hatte keine Wirkung.

**Schlüsselworte:** Ährenfusariosen, Jahr, Fruchtfolge, Bodenbearbeitung, Beregnung

### **Einleitung**

In Österreich sowie in vielen anderen Ländern haben die unter Ährenfusariosen zusammengefassten Pflanzenkrankheiten insbesondere an Weizen zugenommen. Die Erreger sind Pilze der Gattung *Fusarium*, wobei *F. graminearum* und *F. culmorum* überwiegend auftreten. Das Auftreten und die Intensität der Krankheit sind abhängig von Umwelteinflüssen. Besonders die klimatischen Faktoren spielen eine bedeutende Rolle, aber auch die pflanzenbaulichen Maßnahmen – in erster Linie Fruchtfolgegestaltung, Sortenwahl und Bodenbearbeitung – haben Einfluss. Ziel der vorliegenden Studie war es, bei Anbau einer durchschnittlich anfälligen Weizensorte auf einem trockenen Standort in Ostösterreich, also unter generell geringer *Fusarium*-Gefährdung, die relative Bedeutung der Faktoren Fruchtfolge, Bodenbearbeitung und Bewässerung für das Krankheitsgeschehen

über sechs Jahre hinweg vergleichend zu untersuchen. Erwartet wurden ein Anstieg der Populationsdichte und in der Folge erhöhte Befallswerte bei Kombination kritischer Maßnahmen (enge Fruchtfolge, pfluglose Bewirtschaftung, Bewässerung nach dem Ährenschieben) gegenüber den gefährdungsarmen Kontrollvarianten.

## Material und Methoden

Seit August 2002 wird ein Feldversuch auf den Versuchsflächen Raasdorf der Versuchswirtschaft Groß-Enzersdorf (Marchfeld, Niederösterreich, 156 m NN, mittlere Jahrestemperatur 9,8 °C, Jahresniederschlag 546 mm, Parabraunerde-Tschernosem, schluffiger Lehm) durchgeführt. Der Versuch wurde in einer Spaltanlage in 3 Wiederholungen angelegt, die Parzellen sind 9 x 12 m<sup>2</sup> groß. Düngung und Pflanzenschutzmaßnahmen erfolgen betriebsüblich, wobei keine Wirkstoffe mit *Fusarium*-Wirksamkeit ausgebracht werden. Die Versuchsfaktoren sind:

Erntejahr:	2003 - 2008
Fruchtfolge:	Körnermais - Winterweizen - ZF (Senf) Körnermais - Winterweizen - ZF (Senf) - Erbse - ZF (Senf) Körnermais (mit Gras-Untersaat) - Winterweizen - ZF (Raps)
Bodenbearbeitung:	Konventionelle Bodenbearbeitung (Pflug) Nicht-wendende Bodenbearbeitung (Grubber)
Bewässerung:	Ohne Beregnung Mit Beregnung (100 mm in 3 Gaben: Ende Mai, Anfang u. Mitte Juni)

Bei den Fruchtfolgen werden in jedem Jahr alle Früchte parallel angebaut. Die Winterweizensorte war Josef (*Fusarium*anfälligkeit 5 = mittel).

Durch visuelle Bonitur von 100 Ähren pro Parzelle wurden die Befallshäufigkeit (% befallener Ähren) und -intensität (% befallene Ährchen pro Ähre) im Stadium BBCH 75-77 bestimmt. Im ersten Versuchsjahr wurden nur Zufallsstichproben untersucht, da die Versuchsfaktoren für die ersten Weizenbestände im Versuch noch keine differenzierenden Nachwirkungen haben konnten. Im Jahr 2007 wurden keine Bonituren durchgeführt. Zu Beginn der Untersuchungen systematisch sowie anhand von Stichproben auch im weiteren Verlauf wurden die *Fusarium*-Infektionen verifiziert und die Artenzusammensetzung festgestellt (nach NELSON et al., 1983). Mit einem Versuchsmähdrescher wurde auf 13,5 m<sup>2</sup> in der Mitte der Parzellen der Kornertrag ermittelt. Die Befallsbonituren sowie die Kornerträge wurden entsprechend der faktoriellen Versuchsanlage mit der Prozedur GLM von SAS varianzstatistisch geprüft. Korrelationen und lineare Regressionen wurden mit der Graphik-Software SigmaPlot berechnet.

## Ergebnisse und Diskussion

Am Untersuchungsstandort wurden zu Beginn der Untersuchungen nach Vorfrucht Wintergerste im Mai 2003 an Ernterückstandsproben die auf dem Trockenstandort erwarteten niedrigen *Fusarium*-

Kontaminationsdichten beobachtet (BÜCHTER et al. 2003). Bei den von Maiskörnern im Versuch isolierten *Fusarium*-Arten handelte es sich hauptsächlich um Arten der *Liseola*-Sektion, insbesondere *F. subglutinans* und *F. proliferatum* (BÜCHTER et al. 2004). Auf Weizenkörnern wurden vorwiegend *F. graminearum* und *F. culmorum* gefunden (Daten nicht gezeigt).

Die Varianzanalysen ergaben als dominierende Varianzursache für Befallshäufigkeit und -intensität das Jahr. Effekte von Bewässerung sowie Bodenbearbeitung und deren Interaktionen mit dem

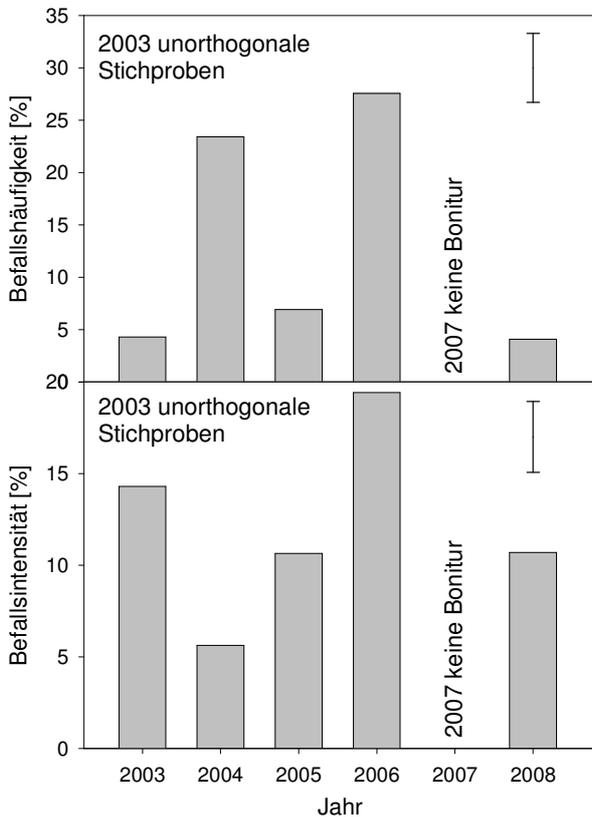


Abb. 1: Befallshäufigkeit und -intensität in Abhängigkeit vom Jahr (Grenzdifferenz  $p=0.05$ )

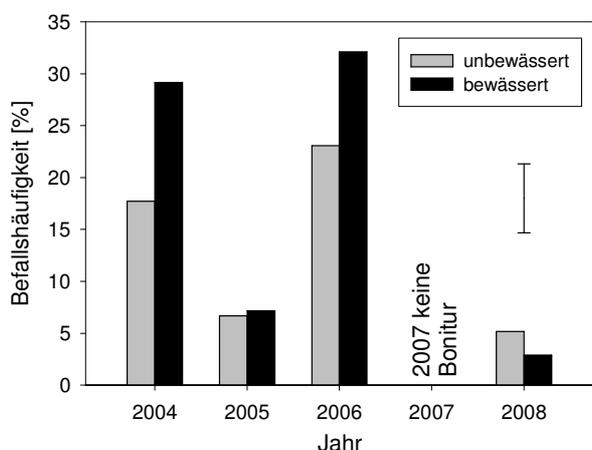


Abb. 2: Befallshäufigkeit in Abhängigkeit von Jahr und Beregnung (Grenzdifferenz  $p=0.05$ )

Jahr waren nur auf die Befallshäufigkeit nachweisbar.

Die Befallshäufigkeit war in den Jahren 2004 und 2006 deutlich erhöht gegenüber den Jahren 2003, 2005 und 2008 (Abb. 1). Der Zusammenhang zur Befallsintensität war nicht sehr eng, so dass 2004 trotz hoher Befallshäufigkeit besonders niedrige Befallsintensitäten auftraten, während der Befall in 2006 sowohl häufig als auch intensiv ausgeprägt war. Bei beiden Merkmalen war kein klarer Trend zu ansteigenden Werten mit zunehmender Versuchsdauer festzustellen.

In Bezug zu den monatlichen Durchschnittstemperaturen und Niederschlagssummen war eine signifikante Korrelation nur zwischen der Befallshäufigkeit und den Niederschlägen im April ( $r = 0,87^*$ ) gegeben. Die hohen Befallshäufigkeiten im Jahr 2006 korrelierten nachweislich negativ ( $r = -0.90^*$ ) mit dem Weizenertrag.

Der jahresabhängige Einfluss der Bewässerung auf die Befallshäufigkeit führte dazu, dass in den beiden Jahren mit hohem Befall die Beregnungsdosen diesen zusätzlich deutlich erhöht haben (Abb. 2). Dasselbe gilt hinsichtlich der jahresabhängigen Wirkung der Bodenbearbeitung (Abb. 3). Auch hier trat der erwartete befallsfördernde Effekt des Pflugverzichts nur in jenen Jahren in deutlichem Maße auf, in denen die Umweltbedingungen generell den Befall begünstigen.

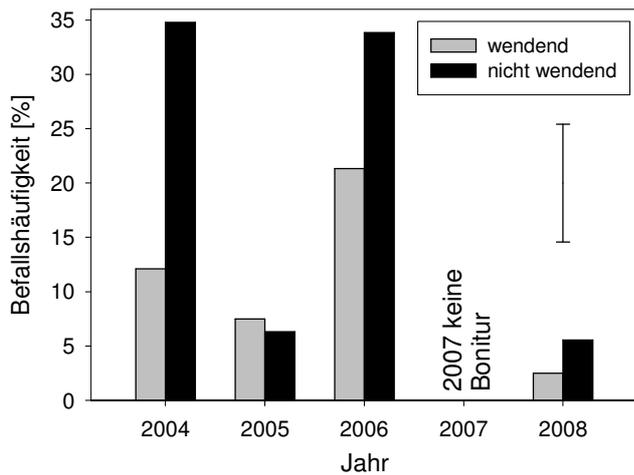


Abb. 3: Befallshäufigkeit in Abhängigkeit von Jahr und Bodenbearbeitung (Grenzdifferenz  $p=0.05$ )

Die Fruchtfolgen hatten vergleichsweise geringeren Einfluss; die Aufnahme von Erbsen als Nicht-Wirtspflanze in die Fruchtfolge hatte keine befallsmindernde Wirkung. Im Mittel der Jahre war die Befallshäufigkeit besonders hoch (ca. 25 %), wenn der Weizen nach Mais mit einer Untersaat, vor winterharter Zwischenfrucht und ohne Pflugeinsatz angebaut wurde. (Daten nicht gezeigt). Der hohe Anfall an organischer Masse in dieser Fruchtfolge wird als Quelle für vermehrtes Pilz-Inokulum vermutet (WICHMANN et al., 2006).

## Literatur

- Büchter, M., M. Lemmens, H.-P. Kaul, 2003: Standortkartierung von Getreidefusariosen im Trockengebiet Ostösterreichs. Mitt. Ges. Pflanzenbauwiss. **15**, 358-359.
- Büchter, M., M. Lemmens, H.-P. Kaul, 2004: Abhängigkeit der Kolbenfusariose von der Bodenkontamination mit *Fusarium* spp. und Bewirtschaftungsfaktoren. ALVA-Jahrestagung, 17.-19. Mai 2004, Wien, 126-129.
- Nelson, P. E., T. A. Tousson, W. F. O. Marasas, 1983: *Fusarium* species. An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press, University Park and London, 193 pp.
- Wichmann, S., M. Lemmens, H.-P. Kaul, 2006: Der Befall von Winterweizen mit *Fusarium* spp. in Abhängigkeit von verschiedenen Bewirtschaftungsmaßnahmen. Mitt. Ges. Pflanzenbauwiss. **18**, 8-9.

## Autoren:

Univ.Prof. Dr. Hans-Peter KAUL, Dr. Manfred BÜCHTER, Dr. Stefan WICHMANN, DI Claudia ZEITLHOFER; Universität für Bodenkultur, Department für Angewandte Pflanzenwissenschaften und Pflanzenbiotechnologie, Gregor Mendel Straße 33, 1180 Wien

Ao. Univ.Prof. Dr. Marc LEMMENS; Universität für Bodenkultur, Department für Agrarbiotechnologie, IFA Tulln, Konrad-Lorenz-Straße 20, 3430 Tulln

# Welchen Einfluss hat der Prozess der Weizenblüte auf die Infektion mit *Fusarium graminearum* und die Mykotoxinbildung

*Effect of the flowering process of wheat on Fusarium infection and mycotoxin formation*

REBECCA SCHUSTER & F.M. ELLNER

## Zusammenfassung

Die Frage, ob beim Weizen die Blütchenöffnung während des Blühvorgangs und die Anwesenheit entleerter Antheren die Stärke von Primärinfektionen mit *Fusarium species* beeinflusst, führte zu zwei Versuchen: 1. Offenes und geschlossenes Blühen wurde imitiert durch Injektion von Konidien in bzw. zwischen die Blütchen von Weizenährchen. 2. Während einer Sprühinfektion wurde der Zustand von Weizenblütchen (Öffnung und Antheren) mittels digitaler Fotografie dokumentiert. Die Mykotoxin-Analyse mittels HPLC ergab in beiden Versuche signifikant höhere Deoxynivalenol-Gehalte, wenn Sporen ins Blütcheninnere gelangten. Die Anwesenheit entleerter Antheren führte zu keiner Infektionserhöhung.

**Schlüsselwörter:** *Fusarium*, Weizenblüte, Antheren, Mykotoxinbildung

## Summary

The question whether the opening of flowers during blossoming and the presence of extruded anthers take an influence on primary infections had led to two different experiments: 1. Both blossoming with open and closed flowers was simulated by depositing conidia either in a single spikelet or between two spikelets; 2. Documenting the flowering status of spikelets of wheat heads by digital photographs immediately before spray inoculation.

Mycotoxin analysis by HPLC revealed significantly higher quantities of deoxynivalenol in either experiment in case spores had been deposited inside a spikelet. The presence of extruded anthers did not increase the infection level.

**Keywords:** *Fusarium*, wheat flowering, anthers, mycotoxin formation

## Einleitung

Primärinfektionen von Weizenähren mit *Fusarium species* treten am häufigsten zur Zeit der Blüte auf, während der sich die Spelzen der Blütchen öffnen. Sporen können so ins Blütcheninnere gelangen, wo sie später auskeimen und Infektionen verursachen können.

Untersuchungen von Kang und Buchenauer (2000) haben zwar gezeigt, dass auch Sporen die nur auf der Außenseite eines Blütchens zur Keimung kommen zu erfolgreichen Infektionen führen können, ihre Infektionswahrscheinlichkeit ist jedoch geringer. Offenblütigere Weizen-sorten gelten allgemein als anfälliger, auch wenn bisher dafür keine quantitativen Studien vorliegen wie z.B. für Gerstensorten: Geschlossen blühende, zweizeiligen Sorten sind hier weniger *Fusarium* anfällig als

die sechszeiligen, offen blühenden Sorten (Yoshida et al 2007). Außerdem wird die Bedeutung der an den Blütchen verbleibenden, entleerten Antheren im Infektionsprozess diskutiert (Strange and Smith 1971; Sutton 1982).

Im Mittelpunkt unserer Versuche standen die Fragen, ob eine Reduzierung der Blütchenöffnung während des Blühvorgangs die Stärke von Primärinfektionen reduzieren kann und ob die Anwesenheit von verblühten Staubbeuteln Infektionen fördert. Wir imitierten zunächst offenes (chasmogames) und geschlossenes (cleistogames) Blüten durch Injektion von Konidien-Suspensionen in bzw. zwischen die Blütchen von Weizenähren (**Abb 1**). In einem weiteren Versuch dokumentierten wir den Öffnungszustand (geöffnet oder geschlossen) von Weizenblütchen und die Anwesenheit von Antheren während einer Sprühinfektion (*F. gram.*) durch digitale Fotografie. Die Infektionsstärke einzelner Weizenährchen wurde bestimmt durch die Analyse der Mykotoxine mittels HPLC und Nachsäulenderivatisierung.

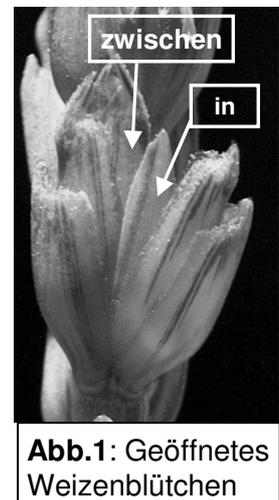
### Material und Methoden

In Gewächshausexperimenten wurden fünf Liter Töpfe mit Weizen bepflanzt.

**Versuch I:** Sommerweizen wurde zu Beginn der Blüte (BBCH 59-61) durch Injektion von ca. 300 Konidien (2 µl einer definierten Konidien suspension, *F. graminearum*) inokuliert. Die Spelzen wurden vorsichtig auseinander gebogen, so dass **in** die Blütchen und **zwischen** zwei Blütchen injiziert werden konnte (Abb.1). Die infizierten Ähren wurden für drei bzw. zehn Tage mit Plastiktüten bedeckt.

**Versuch II:** Kurz vor der Blüte (BBCH 55-59) wurden 24 Winterweizen-Ähren in ein Drahtgestell eingespannt, so dass der Zustand der einzelnen Blütchen während der Sprühinokulation (*F. graminearum*,  $1,2 \times 10^6$  Konidien/ml) mit einer digitalen Kamera dokumentiert werden konnte. Die infizierten Ähren wurden für fünf Tage mit Plastiktüten bedeckt.

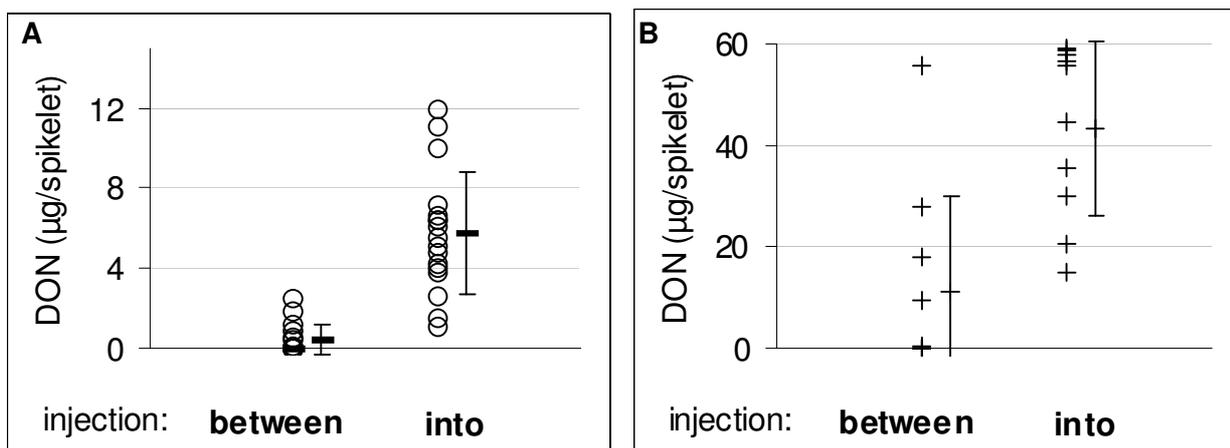
Die Ährchen beider Versuche wurden in 2ml-vials geerntet, unter flüssigem Stickstoff mit einem Metallstab zerstampft, extrahiert und der Mykotoxin-Gehalt mittels HPLC (Fluoreszenz-Detektion und Nachsäulenderivatisierung) bestimmt (Nachweisgrenze:  $0,08 \mu\text{g}/\text{Ährchen}$ )



**Abb.1:** Geöffnetes Weizenblütchen

### Ergebnisse Versuch I

Die Injektionen der Konidien in die Blütchen ergaben sowohl nach früher (3 Tage) als auch nach später (10 Tage) Ernte signifikant höhere DON-Gehalte als die Injektionen zwischen die Blütchen (Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$ , Irrtumswahrscheinlichkeiten  $P=0,7 \times 10^{-3}$  und  $P=1,5 \times 10^{-6}$ ). Die Mittelwerte für Spritzungen in die Blütchen lagen bei  $5,8 (+/-3,0) \mu\text{g}/\text{Ährchen}$  und  $43,4 (+/-17,2) \mu\text{g}/\text{Ährchen}$ . Die Mittelwerte für Spritzungen zwischen die Blütchen ergaben  $0,4 (+/-7,0) \mu\text{g}/\text{Ährchen}$  und  $11,1 (+/-19,0) \mu\text{g}/\text{Ährchen}$  (Abb.2).



**Abb.2:** DON-Konzentrationen einzelner Ährchen nach Injektion von 300 Konidien (*F. gram.*) zwischen bzw. in jeweils 17 Blütchen mit jeweiligen Mittelwerten und Standardabweichungen; Inkubationszeit 3 Tage (A) und 10 Tage (B);

## Versuch II

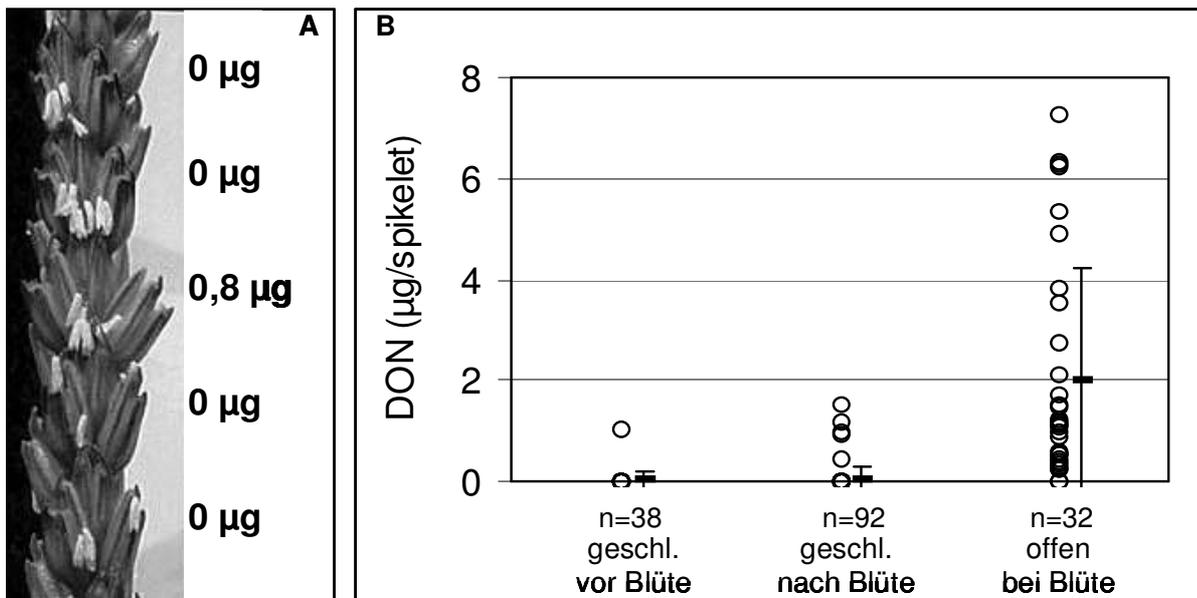
Exemplarisch für die ausgewerteten Ähren mit insgesamt 166 Blütchen zeigt Abb. 3 A eine Ähre mit vier geschlossenen Blütchen (nach der Blüte) ohne detektierbare DON-Gehalte und ein geöffnetes Blütchen, in dem 0,8 µg DON gemessen wurden. Abb. 3 B zeigt die DON-Gehalte aller Ährchen, wobei die Auswertung der digitalen Fotos zur Kategorisierung der Blütchen in drei Gruppen führte:

1) 38 Ährchen mit geschlossenen Blütchen vor der Blüte also ohne heraushängende Antheren: In dieser Gruppe enthielt nur ein Ährchen DON (1,0 µg/Ährchen), während in allen anderen DON unter der Nachweisgrenze lag (Mittelwert 0,3 (+/-0,2) µg/Ährchen). 2) 96 Ährchen mit geschlossenen Blütchen nach der Blüte also mit heraushängende Antheren: Hier enthielten fünf Ährchen DON (0,5 bis 1,5 µg/Ährchen), bei 91 Ährchen konnte kein DON nachgewiesen werden (Mittelwert 0,1 (+/-0,2) µg/Ährchen). 3) 32 Ährchen mit mindestens einem geöffneten Blütchen während des Blühvorgangs:

Es fanden sich 30mal DON-Konzentrationen von 0.2 bis 7.2µg/Ährchen und nur in 2 Fällen war kein DON nachweisbar (Mittelwert 2,0 (+/-2,2) µg/Ährchen). Der Unterschied zwischen den DON-Gehalten der geschlossenen Blütchen vor und nach der Blüte (also mit und ohne heraus-hängende Staubbeutel) ist nicht signifikant (Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$ , Irrtumswahrscheinlichkeit  $P=0,5$ ). Die Anwesenheit von Antheren führte nicht zu höheren Infektionen. Der DON-Gehalt öffneter Blütchen ist dagegen signifikant höher als der der beiden anderen Gruppen (Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$ , Irrtumswahrscheinlichkeit  $P=1,5 \times 10^{-5}$ ).

## Schlussfolgerungen

Die Fusarium-Infektionsstärke gemessen über den Mykotoxin-Gehalt ist signifikant höher wenn Fusarium-Konidien in die Blütchen gelangen. Ziel sollte sein, die Anzahl der Sporen im Blütcheninneren zu minimieren, was über die Züchtung kleistogamer Weizensorten gelingen



**Abb.3:** DON-Konzentrationen in µg pro Ährchen nach Sprühinfektion mit Konidien suspension ( $1,2 \times 10^6$  Konidien/ml, *F. gr.*) in geschlossene Blütchen vor und nach der Blüte und in geöffnete Blütchen; A: Blütchen einer Ähre; B: Alle Blütchen der drei Kategorien mit jeweiligen Mittelwerten und Standardabweichungen; Inkubationszeit 5 Tage;

könnte. Obwohl in unseren Versuchen die Anwesenheit entleerter Antheren die Infektionsstärke nicht beeinflusste, könnten auch bezüglich dieses Problems cleistogame Sorten eine Lösung sein, denn die Antheren verblieben hier in den Blütchen und würde erst später mit dem sich entwickelnden Korn aus dem Blütchen heraus geschoben.

### Literatur

Kang Z, Buchenauer H (2000): Cytology and ultrastructure of the infection of wheat spikes by *Fusarium culmorum*. *Mycol Res* 104: 1083-1093.

Strange, RN, Smith H (1971): A fungal growth stimulant which predisposes wheat to attack by *Fusarium graminearum*. *Physiol. Plant Pathol.* 1: 141-150.

Sutton JC (1982): Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Trans Br Mycol Soc* 70: 187-192.

Yoshida, M, Kawada, N, Nakajima, T (2007): Effect of infection timing of FHB and mycotoxin accumulation in open- and closed-flowering barley. *Phytopathology* 97: 1054-1062.

### Autoren:

Rebecca SCHUSTER und Dr. Frank M. ELLNER, Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz, Königin-Luise-Straße, 19, D-14195 Berlin

## **Einfluss von Thiophanat-Methyl und Methyl-Benzimidazol-2-yl-Carbamat auf mykotoxinbildende *Fusarium* spp.**

*Effect of thiophanate-methyl and methyl-benzimidazole-2-yl-carbamate on mycotoxin producing *Fusarium* spp.*

T. HIRSCHFELD, F.M. ELLNER, H. BUSCHHAUS, MONIKA GOßMANN & CARMEN BÜTTNER

### **Zusammenfassung**

Bei der Untersuchung des Einflusses von Thiophanat-Methyl und Methyl-Benzimidazol-2-yl-Carbamat auf mykotoxinbildende Arten von *Fusarium* spp. konnte beobachtet werden, dass Thiophanat-Methyl einen deutlich stärkeren Einfluss auf die Biosynthese der Mykotoxine als auf das Wachstum der Pilze aufwies. Die Ergebnisse deuten an, dass durch Thiophanat-Methyl ein Wirkungsmechanismus ausgelöst zu werden scheint, der die Mykotoxinbildung von *Fusarium* spp. unabhängig vom Myzelwachstum hemmen kann.

**Schlüsselwörter:** *Fusarium* spp., Thiophanat-Methyl, Carbendazim, Mykotoxinbildung

### **Summary**

Investigations into the effect of thiophanate-methyl and methyl-benzimidazole-2-yl-carbamate on mycotoxin producing species of *Fusarium* spp. revealed that the biosynthesis of mycotoxins was more influenced than the fungal growth. The data support an additional mode of action of thiophanate-methyl inhibiting mycotoxin formation of *Fusarium* spp. independently of the growth of the mycelium.

Keywords: *Fusarium* spp., thiophanate-methyl, carbendazim, mycotoxin production

### **Einleitung**

Thiophanat-Methyl (TM) ist ein fungizider Wirkstoff, der über 30 Jahre gegen eine Vielzahl phytopathogener Pilze der Basidiomycota bzw. Ascomycota im Pflanzenbau eingesetzt wurde. TM ist derzeit in Deutschland lediglich für die Indikationen Lagerfäulen an Äpfeln und Weißstängeligkeit im Raps zugelassen, befindet sich jedoch für die Anwendung im Weizen und Triticale zur Unterdrückung der Mykotoxinbildung im Zulassungsverfahren. Die Primärwirkung von TM besteht in einer Störung der Zellteilung während der Mitose, die durch den Metaboliten Methyl-Benzimidazol-2-yl-Carbamat (MBC) ausgelöst wird, indem es an das pilzliche Tubulin bindet und so den Aufbau des Spindelapparates zur Trennung der homologen Chromosomen unterbricht. Eine Sekundärwirkung wurde in *Rhizoctonia solani* sowie *Sacharomyces graminis* nachgewiesen und liegt in der Hemmung der Cytochrom C Oxidase als

Schlüsselenzym der Respiration. Zur Wirkung von TM auf Pilze der Gattung *Fusarium* gibt es bislang nur wenige Untersuchungen.

In Freilandversuchen von Buschhaus und Ellner (2007) an Weizen, der mit *Fusarium graminearum* inokuliert wurde, führte die Applikation von TM zur Blüte zu deutlich reduzierten Mykotoxinkonzentrationen im Erntegut, obwohl der Effekt auf den Anteil *F. graminearum*-infizierter Körner nicht so ausgeprägt war wie in den Vergleichsvarianten mit Azolfungiziden. Sie postulierten daher, dass eine durch TM ausgelöste Hemmung der Respiration in Folge des entstehenden Energiemangels die Mykotoxinbildung von *F. graminearum* einschränkt, da Mykotoxine energiereiche Sekundärstoffwechselprodukte darstellen.

Zur Prüfung dieser Hypothese wurde der Einfluss von TM und MBC auf das Wachstum und die Mykotoxinbildung einiger im Getreideanbau relevanten *Fusarium*-Arten *in vitro* untersucht. Isolate von *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. poae*, *F. subglutinans*, *F. nygamai* und *F. globosum* wurden auf einem Maisextrakt-Agar (MA) bzw. einem Weizenmehl-Agar (WMA) mit TM-Konzentration zwischen 0 und 10mg/l oder MBC-Konzentrationen bis 1mg/l kultiviert und die täglichen Zuwachsraten bestimmt. Begleitend wurden morphologische Veränderungen der Isolate durch mikroskopische bzw. makroskopische Bonituren festgehalten. Nach drei Wochen Inkubation wurde der Agar aufbereitet und der Mykotoxin- sowie Ergosterolgehalt mittels hochauflösender Flüssigchromatographie (HPLC) analysiert.

### **Morphologische Veränderungen von *Fusarium* spp. durch TM und MBC**

Alle untersuchten Isolate von *Fusarium* spp. wiesen bei gleichen Aufwandmengen von TM ähnliche makro- und mikroskopische Veränderungen auf. Bereits ab einer Konzentration von 1mg TM bzw. 2,5mg MBC je Liter Agar zeigte das Myzel bei vergleichbarem Wachstum zur unbehandelten Kontrolle eine deutlich intensivere Farbpigmentierung. Außerdem fand sowohl die Bildung der Makro- und Mikrokonidien als auch der Chlamydosporen bei den Chlamydosporenbildnern wie *F. graminearum* früher sowie in einem stärkeren Umfang statt. Sowohl die intensivere Pigmentierung als auch die frühere und reichlichere Konidienbildung, einschließlich frühzeitigerer und stärkerer Chlamydosporenbildung könnten Anzeichen dafür sein, dass der pilzliche Organismus in Folge des Energiemangels aufgrund der gehemmten Respiration schneller altert und früher von der logarithmischen Wachstumsphase in ein reproduktives Entwicklungsstadium übergeht.

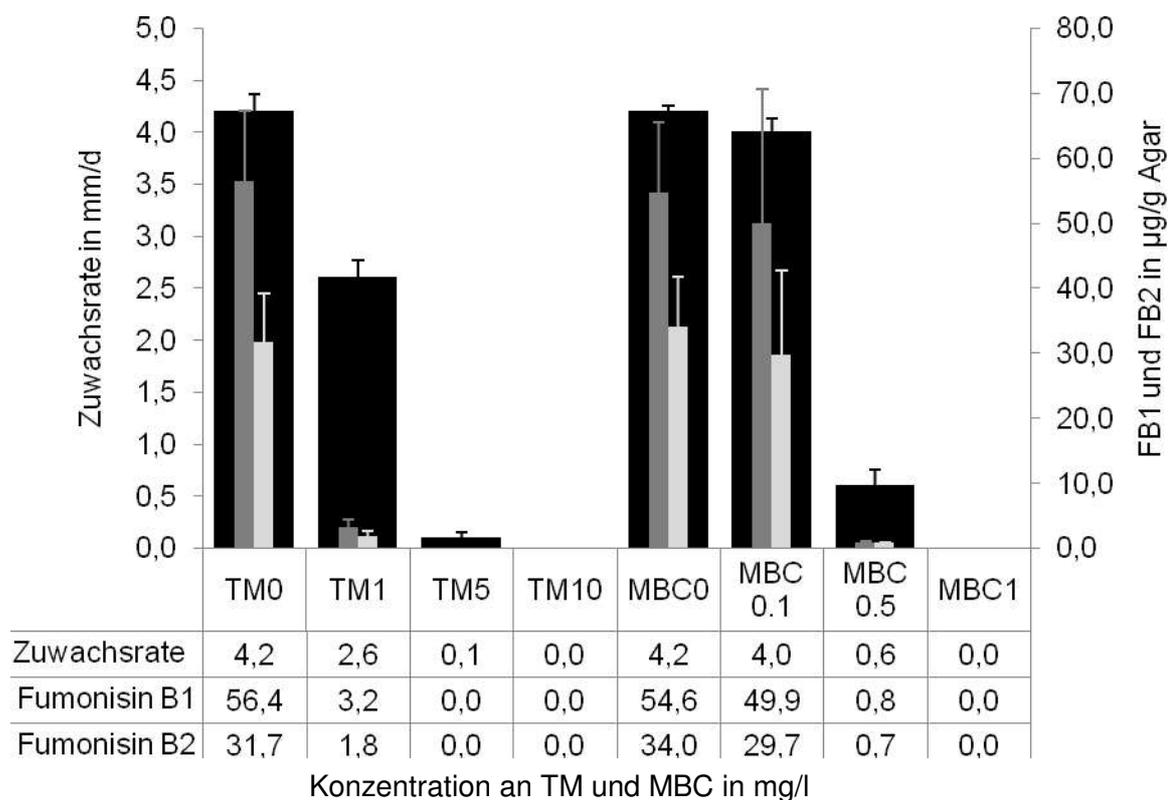
### **Einfluss von TM und MBC auf das Wachstum und die Mykotoxinbildung**

Der Einfluss von TM auf die Fumonisinbildung von *F. verticillioides* war stärker ausgeprägt als auf das Myzelwachstum. Das Wachstum ging bei einer Aufwandmenge von 1mg/l TM um 40% zurück, die Produktion von Fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) und Fumonisin B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) dagegen um

94% (Abb. 1). Ab einer Aufwandmenge von 5mg/l war das Myzelwachstum nahezu komplett gehemmt und keine Fumonisine mehr nachweisbar.

Im Gegensatz dazu wurden Wachstum sowie Fumonisinproduktion von *F. verticillioides* durch MBC in einem vergleichbaren Ausmaß reduziert. Bei Aufwandmengen von 0,1mg/l MBC bzw. 0,5mg/l MBC wurde das Myzelwachstum um 5% bzw. knapp 90% gehemmt und die Bildung von FB<sub>1</sub> und FB<sub>2</sub> um 9-13% bzw. 98% limitiert.

Ein ähnlicher Einfluss von TM und MBC auf das Myzelwachstum und die Synthese von FB<sub>1</sub> und FB<sub>2</sub> konnte für *F. globosum* nachgewiesen werden.

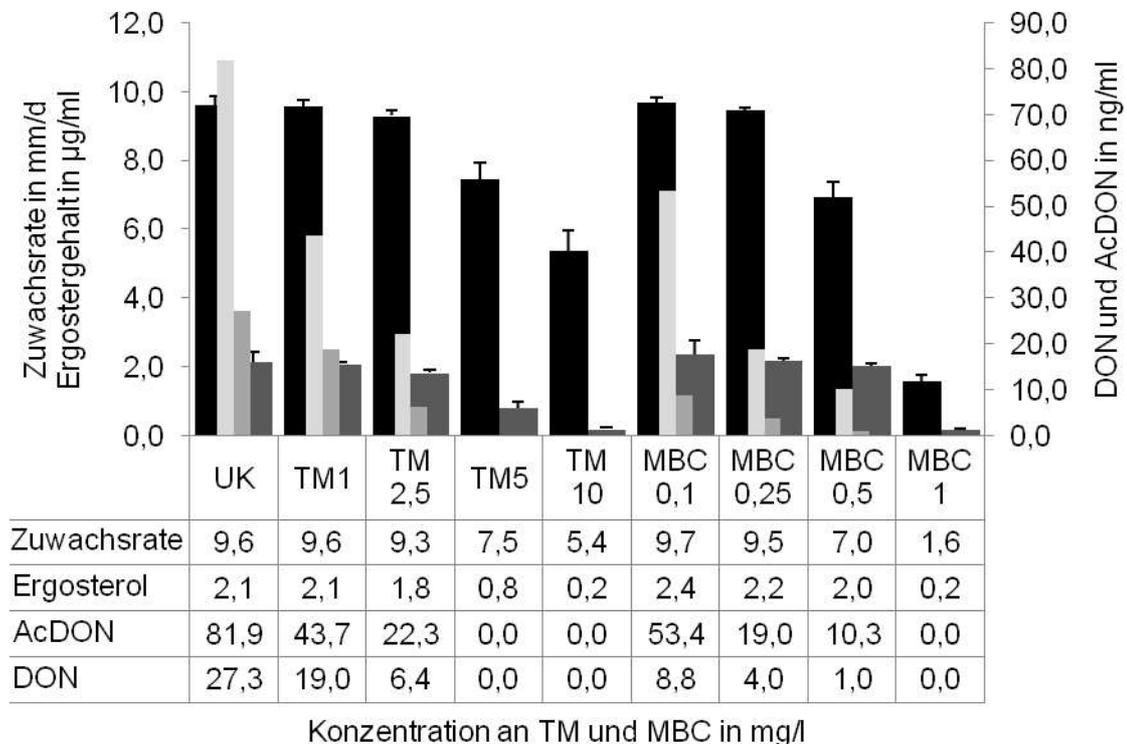


**Abb. 1:** Wachstum und Fumonisinbildung von *F. verticillioides* bei bestimmten Konzentrationen an TM und MBC

Bei den Trichothecenebildenden *Fusarium*-Arten *F. culmorum* und *F. graminearum* wurde die Toxinproduktion ebenfalls deutlich stärker durch TM beeinflusst als das Wachstum. *F. culmorum* reagierte auf Konzentrationen von 1mg/l bzw. 2,5mg/l TM mit einem Rückgang des Myzelwachstums um 0% bzw. 3-15% wohingegen die Produktion der Trichothecene Deoxynivalenol (DON) und Acetyl-Deoxynivalenol (AcDON) um 30-50% bzw. 70-75% eingeschränkt wurde (Abb. 2). Ab einer Aufwandmenge von 5mg/l TM konnten keine Trichothecene mehr nachgewiesen werden. Das Myzelwachstum war im Vergleich dazu nur um 30-60% bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (UK) gehemmt. Im Gegensatz zu den fumonisinbil-

denden *Fusarium*-Arten zeigte MBC einen ähnlich ausgeprägten Effekt auf die Trichothecenproduktion von *F. culmorum* wie TM.

Dieser Effekt von TM und MBC auf die Trichothecenbildung konnte auch bei *F. graminearum* festgestellt werden.



**Abb. 2:** Wachstum und Trichothecen-Bildung von *F. culmorum* bei unterschiedlichen Konzentrationen an TM und MBC

Diese Ergebnisse unterstützen die aufgestellte Hypothese, da TM die Mykotoxinbildung von *Fusarium* spp. unabhängig vom Myzelwachstum hemmen konnte.

Darüber hinaus korrelierten der Ergosterolgehalt und die Zuwachsrate des Myzels von *F. graminearum* und *F. culmorum* nach Pearson in 80-86% aller gemessenen Einzelwerte, wodurch der Parameter Zuwachsrate als Maß für die gebildete Myzelmenge bestätigt wird.

#### **Autoren:**

Dipl.-Ing. Tim HIRSCHFELD und Dr. Frank. M. ELLNER, Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz, Königin-Luise-Str. 19, D-14195 Berlin

Dr. Herbert BUSCHHAUS, Nisso Chemical Europe GmbH, Berliner Allee 42, D-40212 Düsseldorf

Dr. Monika GOSSMANN und Prof. Dr. Carmen BÜTTNER: Humboldt-Universität Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55-57, D-14195 Berlin

## **Eine quantitative PCR Methode zur Fusarium Resistenzbestimmung**

K. BRUNNER, MARIA PAULA KOVALSKY, GUADALUPE PAOLINO, H. BÜRSTMAYR, M. LEMMENS, F. BERTHILLER, R. SCHUHMACHER, R. KRŠKA & R. L. MACH

**Summary:** The breeding of Fusarium tolerant wheat is one of the major efforts of plant breeders nowadays. Usually artificial inoculation is chosen to infect the new breeds and visual ratings or mycotoxin analyses are applied to acquire knowledge of plant resistance. We developed a quantitative PCR Method which allows fast and reliable assessment of disease resistance. In contrast to previous PCR techniques a reference system was used to compensate for unsteadiness of DNA isolation and sample preparation procedure. The results obtained by the newly developed technique were in perfect accordance with the toxin-method but provided in several cases different results than visual ratings.

**Key words:** Fusarium, plant resistance determination, quantitative PCR

### **Zusammenfassung:**

Die Züchtung von Fusarium-resistenten Weizensorten ist eine große Herausforderung für die Pflanzenzucht. Um neue Züchtungen hinsichtlich ihrer Resistenz zu bewerten, werden die visuelle Bonitur oder Analysen der gebildeten Mykotoxine herangezogen. An der TU Wien wurde eine quantitative PCR Methode entwickelt, die die Bestimmung des Infektionsgrades anhand der gefundenen Fusarium DNA Menge erlaubt. Es wurde ein Referenzsystem entwickelt, das Unregelmäßigkeiten in der DNA Isolation weitgehend kompensiert und somit PCR Analysen zuverlässig und vergleichbar macht. Die Ergebnisse der PCR Methode zur Resistenzbewertung deckten sich perfekt mit der Toxinanalytik, wiesen aber für einige Proben erhebliche Unterschiede zur visuellen Bonitur auf.

**Schlüsselwörter:** Fusarium, Resistenz, quantitative PCR

Der pflanzenpathogene Pilz Fusarium befällt Getreide und Mais und verursacht dadurch erhebliche Ertragseinbußen. Vermindertes Korngewicht und vor allem die Belastung des Korns mit toxischen Substanzen (Mycotoxinen) reduzieren die Qualität drastisch. Die Infektionen durch Fusarium werden durch feuchte Witterung, reduzierte Bodenbearbeitung und durch ungünstige Fruchtfolgen (Weizen auf Mais) begünstigt. Obwohl die Resistenzzüchtung von Weizen im Laufe des letzten Jahrzehntes bedeutende Fortschritte gemacht hat, sind hochresistente Sorten noch nicht am Markt erhältlich. Die Bewertung der Fusarium Resistenz von neuen Sorten erfolgt meist durch künstliche Infektion mittels Sprayinokulation oder über den natürlichen Infektionsweg unter erhöhtem Infektionsdruck durch das Ausbringen von Maisstoppeln oder befallenen Maiskörnern. Die Bestimmung des Befallsgrades erfolgt meist durch visuelle Bonitur und oft auch über die analytische Bestimmung des Mycotoxingehaltes im geernteten Korn. Beide Verfahren sind sehr

zeitaufwändig und eine vollständige Analyse des Mycotoxingehaltes sehr kostenintensiv. Um Kosten für die Toxinbestimmung zu sparen wird meist nur Deoxynivalenol (DON) gemessen und als Leittoxin betrachtet. Seit einigen Jahren ist aber bekannt, dass Pflanzen die Mycotoxine als Glucoside maskieren (Berthiller et al. 2005) und dadurch an den etablierten Analysemethoden vorbei schleusen können. Es wird vermutet, dass die Entgiftung durch Maskierung ein wesentlicher Mechanismus für erhöhte Resistenz von Pflanzen gegen Fusarium ist. Da aber die Glucose im Magen-Darmtrakt von Säugetieren wieder abgespalten wird, kommt die akute Toxizität des DON wieder voll zur Geltung.

Einen neuen Ansatz zur Bestimmung des Befallsgrades in einer Pflanze oder in geerntetem Korn bietet die quantitative PCR (Schnerr et al. 2001, Reischer et al. 2004, Waalwijk et al. 2004). Mit Hilfe der PCR wird die Menge an Fusarium DNA in einer Probe bestimmt. Diese Methode ist einerseits sehr sensitiv und Infektionen können bereits festgestellt werden bevor Symptome sichtbar sind und andererseits ist die Messung sehr selektiv. Der Befall mit anderen Pathogenen wird durch die Fusarium-PCR bewusst nicht erfasst. Diese Technik erlaubt einen sehr hohen Probendurchsatz und ist daher sehr kostengünstig. Damit die Aussagen über den Fusariumbefall jedoch ausreichend zuverlässig werden, ist eine aufwändige Optimierung der gesamten Analyseprozedur unerlässlich. An der Technischen Universität Wien wurde eine Methode entwickelt, die künftig schnelle und kostengünstige PCR basierte Analytik der Fusariummenge in Proben erlaubt.

### **Übersicht:**

Die Stärken der quantitativen PCR:

- Die PCR (Polymerase Kettenreaktion) weist einen Organismus anhand seiner DNA nach
- Die PCR ist sehr sensitiv, wenige Moleküle Fusarium DNA reichen für einen positiven Test
- Die PCR ist sehr selektiv; es wird nur ein bestimmter Organismus nachgewiesen, selbst wenn andere, ähnliche in einer Probe zu finden sind
- Die PCR ist sehr schnell und kostengünstig

### **Die Probenvorbereitung:**

Die Isolation von DNA aus einer Probe stellt einen Schlüsselprozess für die gesamte folgende Analyse dar. Um die Ausbeute an DNA zu maximieren wurden verschiedene Zerkleinerungsverfahren (Mühle, Ultraschall und flüssiger Stickstoff), verschiedene Puffersysteme und verschiedene Reinigungsschritte auf deren Tauglichkeit getestet und mit kommerziell erhältlichen DNA-Isolationskits verglichen.

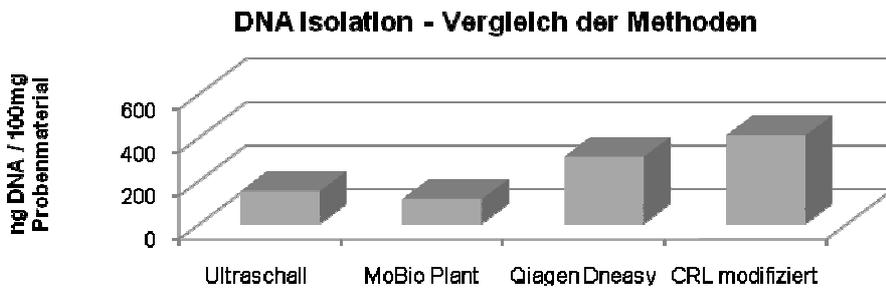


Abbildung 1: Vergleich der DNA Ausbeute einiger etablierter Isolationsmethoden.

Es zeigte sich, dass eine modifizierte Methode der Europäischen Referenzlaboratorien (CRL) mit Abstand die meiste DNA aus Weizen zu isolieren vermochte. Zusätzlich zur sehr hohen Ausbeute ermöglicht diese Methode auch sehr gute Wiederholbarkeit der Aufschlüsse und sie ist sehr einfach handzuhaben.

### Entwicklung eines Referenzsystems:

Der Vergleich von früheren Publikationen zum Thema Fusarium Messung mittels quantitativer PCR zeigte, dass oft kleine Unterschiede in der Probenvorbereitung zu drastischen Verfälschungen der Resultate führen. Daten aus unterschiedlichen Studien und unterschiedlichen Labors waren bisher kaum vergleichbar. Um diese Einschränkung der PCR Methode zu beseitigen wurde an der TU Wien ein Referenzsystem in Anlehnung an die etablierten PCR Nachweise für gentechnisch veränderten Mais entwickelt. Um Unregelmäßigkeiten in der Probenvorbereitung zu kompensieren, wird die Fusarium DNA Menge auf die gesamte extrahierte DNA bezogen und nicht wie in früheren Studien üblich, auf die eingesetzte Probenmenge.

<b>GVO Nachweis</b>	$\text{Verunreinigung in \%} = \frac{\text{GVO-Mais DNA}}{\text{gesamte extrahierte DNA}} \times 100$ <p>gesamte extrahierte DNA = (GVO-Mais DNA) + (nicht GVO-Mais DNA)</p>
<b>Fusarium Nachweis</b>	$\text{Infektion in \%} = \frac{\text{Fusarium DNA}}{\text{gesamte extrahierte DNA}} \times 100$ <p>gesamte extrahierte DNA = (Fusarium DNA) + (Weizen DNA)  oder:  gesamte extrahierte DNA = (Fusarium DNA) + (Mais DNA)</p>

Abbildung 2: Umlegung der etablierten PCR-Methode zum Nachweis von gentechnisch Verändertem Mais auf die Bestimmung der Infektion durch Fusarium.

### Die Korrelation zwischen PCR Ergebnissen, Toxinmenge und visueller Bonitur

Um die Aussagekraft der PCR-Analytik für Fusariumbefall in Weizen zu untersuchen, wurden 80 verschiedene Weizenproben mit unterschiedlichem Infektionsgrad mittels PCR vermessen. Unabhängig vom Jahr aus dem die Probe stammte und vom applizierten Fusarium Stamm zeigte sich eine äußerst gute Korrelation zwischen den Toxinwerten und der PCR Messung. Für die Toxinmenge wurde die Summe aus DON und DON-3-glukosid (maskiertes DON) herangezogen,

da in einigen Proben mehr als 50% des DON maskiert vorlagen. Andere Toxine wie zum Beispiel Nivalenol wurden nur in vernachlässigbaren Mengen nachgewiesen.

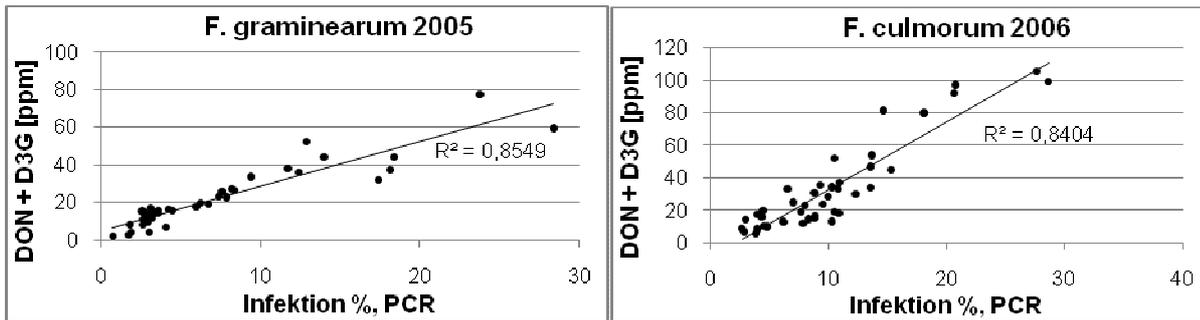


Abbildung 3: Die gebildete Toxinmenge korreliert unabhängig vom Jahr oder eingesetzten Stamm sehr gut mit der nachgewiesenen Menge an Fusarium.

Obwohl zu erwarten wäre, dass die Daten aus der visuellen Bonitur sehr gut mit dem PCR bestimmten Infektionsgrad übereinstimmen sollten, wurde hier eine wesentlich schlechtere Korrelation beobachtet als zwischen Infektion und der Toxinmenge.

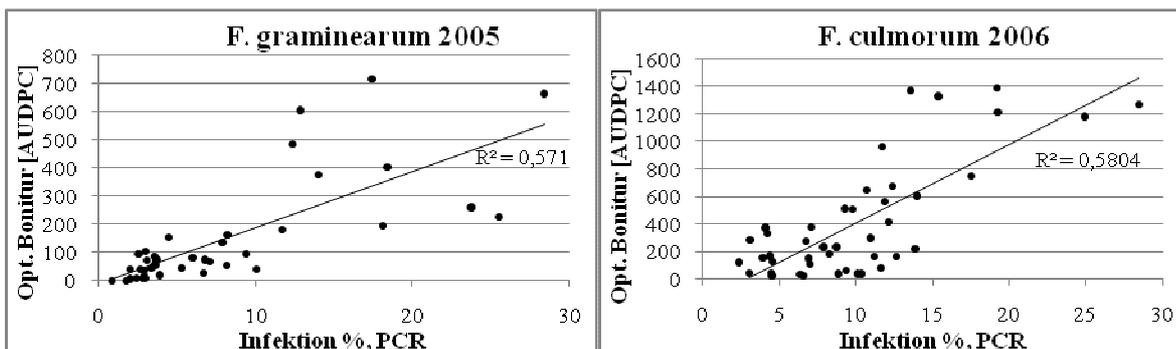


Abbildung 4: Korrelation zwischen visueller Bonitur (AUDPC – Area Under Disease Pressure Curve) und dem PCR bestimmten Infektionsgrad.

### Die Resistenzbewertung von 20 Weizensorten

20 Weizensorten mit sehr hoher bis sehr niedriger Resistenz gegenüber Fusarium wurden 2005 mit *F. graminearum* und 2006 mit *F. culmorum* infiziert. Die Versuche wurden jeweils in zwei Parzellen am Feld durchgeführt. Um die drei Methoden visuelle Bonitur, Toxinmessungen und PCR bestimmte Infektion vergleichen zu können wurden alle drei Methoden einander gegenübergestellt. In allen Fällen lieferten die Toxinwerte und die PCR-Methode idente Aussagen betreffend der Reihung der einzelnen Proben hinsichtlich Resistenz. Die Daten der visuellen Bonitur wichen besonders bei den resistenten Sorten oft deutlich von den beiden anderen Methoden ab.

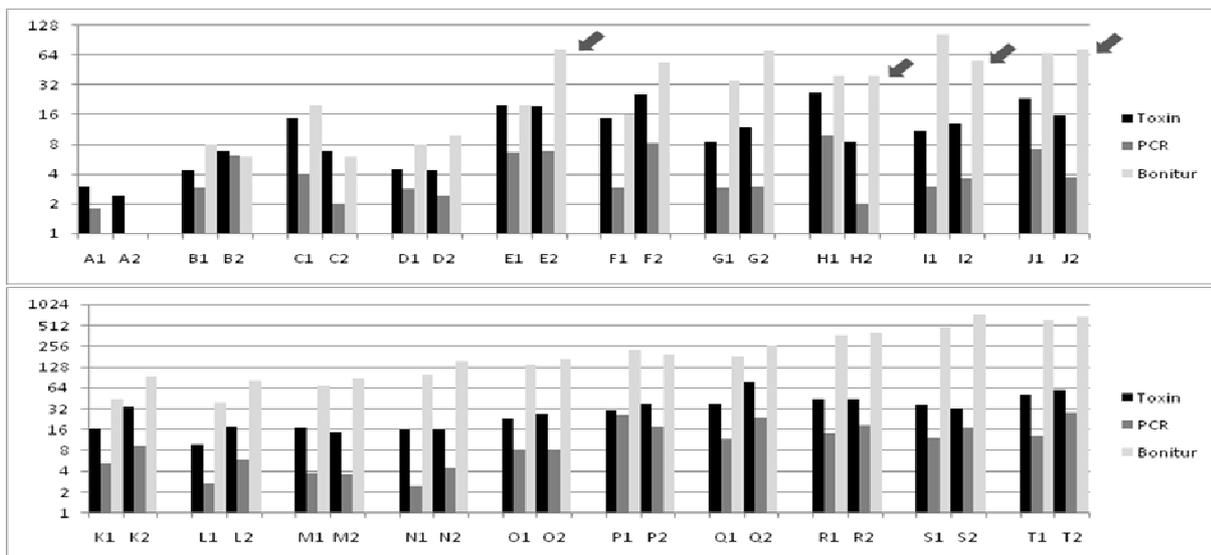


Abbildung 5: Inokulation mit *F. graminearum*. Die Buchstaben markieren die jeweiligen Sorten und ihre Feldwiederholung. A1: Parzelle 1 der Sorte A, A2: Parzelle 2 der Sorte A. Die Y-Achse gibt folgende Einheiten wieder: Toxinmenge [mg/kg], PCR-Methode [Infektions%] und visuelle Bonitur [AUDPC]. Die Pfeile markieren Feldwiederholungen mit deutlicher Abweichung der Boniturdaten von den beiden anderen Methoden.

Obwohl die Toxinanalytik und die PCR-Methode auf sehr unterschiedliche Weise die Resistenz von Weizen gegen *Fusarium* beurteilen, lieferten sie jedoch für *F. culmorum* und *F. graminearum* eine idente Reihung der Sorten hinsichtlich Resistenz. Es wäre zu erwarten, dass die visuell beurteilten Symptome sowohl mit der Toxinmenge als auch mit der Menge des Pilzes sehr gut korrelieren sollten, dennoch lieferte diese Methode oft abweichende Ergebnisse, besonders bei eher resistenten Sorten.

Im Zuge dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Bestimmung des Grades der Infektion mit *Fusarium* mittels quantitativer PCR sehr zuverlässige Ergebnisse liefert. Diese Methode erlaubt das Bearbeiten großer Probenmengen innerhalb sehr kurzer Zeit zu sehr geringen Kosten und stellt damit eine weitere Methode zur Resistenzbewertung neben den beiden etablierten dar.

## Referenzen:

Berthiller, F., dall'Asta, C., Schuhmacher, R., Lemmens, M., Adam, G. and Krska, R. (2005). Masked Mycotoxins: Determination of a Deoxynivalenol Glucoside in Artificially and Naturally Contaminated Wheat by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3421-3425.

Reischer G.H., Lemmens, M., Farnleitner, A.H., Adler, A. and Mach, R.L. (2004). Quantification of *Fusarium graminearum* in infected wheat by species specific real-time PCR applying a TaqMan probe. *J. Microbiol. Meth.* 59: 141-146.

Schnerr, H., Niessen, L. and Vogel, R.F. (2001). Real-time detection of the tri5 gene in Fusarium by LightCycler-PCR using SYBR Green I for continuous fluorescence monitoring. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 53-61.

Waalwijk, C., van der Heide, R., de Vries, I., van der Lee, T., Schoen, C., Corainville, G.C., Häusler-Hahn, I., Kastelein, P., Köhl, J., Lonnet, P., Demarquet, T. and Kema, G.H.J. (2004). Quantitative detection of Fusarium in wheat using TaqMan. *Europ. J. Plant Pathol.* 110: 481-494.

**Autoren:**

Kurt BRUNNER, Maria Paula KOVALSKY PARIS, Technische Universität Wien, IFA-Tulln, Analytikzentrum, Konrad Lorenz Straße 20, 3430 Tulln.

Hermann BÜRSTMAYR, Marc LEMMENS, IFA-Tulln, Pflanzenproduktion, Konrad Lorenz Straße 20, 3430 Tulln.

Franz BERTHILLER, Dr. Rainer SCHUHMACHER, Rudolf KRŠKA, IFA-Tulln, Analytikzentrum, Konrad Lorenz Straße 20, 3430 Tulln.

Guadalupe PAOLINO, Robert. L. MACH, Technische Universität Wien, Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften, Getreidemarkt 9, 1060 Wien

## Determination of moulds and their metabolites in indoor environments

VINAY VISHWANATH, M. SULYOK, R. KRKA & R. SCHUHMACHER

### Summary

Indoor mold growth has recently become a concern with regard to the health of residents. A primary requisite addressing this issue would be to scan various indoor samples and generate a knowledge bank of fungal, bacterial and other microbial species growing indoor. For the same a robust LC-MS/MS based qualitative and quantitative analytical method is developed. The method is an extension of an existing multi metabolite screening method developed for analysis of food samples with 87 analytes. The extended method encompasses a total of 168 fungal and bacterial metabolites with relevance to food, feed and indoor environments. Limit of detection (LOD) and extraction efficiency were analysed for silica rich house dust. Three extraction solvents methanol, ethyl acetate and acidified acetonitril/water were tested for extraction efficiency. Among the three, a mixture of acetonitril/water/acetic acid (79:20:1) proved to be the most efficient. The analysed water damaged building materials and settled house dusts were tested positive for fungal metabolites sterigmatocystin, meleagrins and emodin.

### Introduction

The quality of indoor air and architecture of living environment has a profound influence on the health of individuals. The importance of air sanitation and surface sterilisation of walls in houses are documented in ancient Vedic scriptures. The clinical symptoms such as fatigue, irritability, poor concentration and learning disabilities are observed in adults as well as in children with no previous history of neuro-psychiatric complaints. Surprisingly these symptoms are found at a higher frequency in the inhabitants of buildings with reported water damage or houses with inadequate ventilation. Exact reasons for these symptoms are unclear, hence grossly referred as symptoms of sick building syndrome (SBS). Further it may be attributed the symptoms observed in SBS are the result of cumulative influence of volatile and non-volatile metabolites of various micro flora growing indoor. The primary mode of entry of these metabolites are by the inhalation of volatile compounds from air or house dust containing bacterial and fungal spores and fragments of mycelia.

Species of *Penicillium*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Stachybotrys* and *Trichoderma* are the most common fungal dwellers of the damp buildings. These species produce metabolites such as meleagrins, sterigmatocystin, stachybotrylactam, chaetoglobosin, emodin, enniatins and histamines capable of influencing human health. Though clinical investigations have proved the biological consequences of some of these metabolites the actual amounts produced by the microbes indoor or on building materials, daily exposure concentrations and tolerable limits are still a matter of debate. As

a matter consequence this became the reason for anxiety and confusions among various strata of society.

The natural disasters in the past like hurricane Katrina over the Bahamas and southern Florida and Asian Tsunami have prompted the speedy formulation of unified guidelines for the assessment of building health. The issue has gained significant public and private sector attention in the aftermath of devastating hurricane Katrina, which caused huge amounts of loss to lives and properties. A pilot study in the affected houses of New Orleans done by US public health departments with universities in the aftermath of Katrina reported a baseline, cultivable mold ranging from 22,000 to 515,000 colony-forming units/ m<sup>3</sup>, spore counts ranging from 82,000 to 630,000 spores/m<sup>3</sup>, and endotoxin ranging from 17 to 139 endotoxin units/ m<sup>3</sup> (Chew GL et.al 2006).

The need of the hour is a rapid analytical method for assessing the building health and also for monitoring the effectiveness of preventive management methods in practice. Hyphenation of liquid chromatography and tandem mass spectrometry has become the method of choice for most toxicologists due to its precision and sensitivity. In the present study a previously described LC-MS/MS method (Sulyok M et.al 2007) is extended to 168 analytes by the addition of metabolites of indoor relevance. The method involves single step extraction with no additional clean up procedure. The salient features of the method are economised cost and time and high rates of analyte extraction.

Analyte extraction was optimised using spiked settled dust. Three widely used extraction solvents were compared for extraction efficiency. LOD was investigated for the analytes stable under acidic conditions. The overall goal of the study is to generate an accurate and comprehensive compendium of indoor microbiota, substrate specificity of microflora for growth and metabolite concentrations prevailing in different indoor environments.

## **Materials and methods.**

Unless stated all chemicals/reagents used are of highest purity or of analytical grade.

**Samples:** The samples were collected from houses with visible or reported water damage. Both organic and inorganic samples such as wood peelings, settled dust and wall scrapings were considered for analysis.

**Extraction:** Both spiked and real samples were extracted on orbiter shaker with 1:4 (w/v) of extraction solvent for 90 minutes at room temperature. Higher sample to solvent ratios were adopted in case of dust due to the highly absorptive nature of this matrix. Three extraction solvents methanol, ethyl acetate and acetonitril/water/acetic acid (79:20:1) were evaluated for extraction efficiency.

**LC-MS/MS:** Chromatographic separation was performed using an 1100 Series HPLC System (Agilent, Waldbronn, Germany) equipped with a Gemini® C18-column, 150×4.6mm i.d., 5 µm particle size, and a C18 4×3mm i.d. security guard cartridge (all from Phenomenex, Torrance, CA, USA) in gradient elution mode. Detection and quantification of the mycotoxins was performed with a QTrap 4000 LC-MS/MS System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipped with a Turbo V Ion source for electrospray ionisation (ESI).

**Microbiology:** Subcultivation and screening of mold was done as three-point-inoculations on Czapek Yeast Extract agar (CYA) and Yeast extract agar (YES) which were isolated on Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC). Subcultures were grown at 25 °C for 10 days and then stored at 4 °C. Identification was done by microscopy.

### Results and discussion.

During the method extension special emphasis was given to metabolites related to fungal and bacterial species that are described to be indoor relevant, e.g. *Stachybotrys* (satratoxins G and H, stachybotrylactam), *Aspergillus* (austocystin A, fumigaclavine A, fumagillin), *Chaetomium* (chaetochromin, cochliodinol), *Cladosporium* (calphostin C), *Nocardioopsis* (k 252a and k 252b) and *Streptomyces* (eg. valinomycin). A few of these 84 metabolites that were added to the LC-MS/MS protocol were not compatible with the acidic conditions during extraction and/or are not sufficiently stable in the solvents used for preparing multi-analyte standard solutions. Among the tested solvents acidified acetonitrile water mixture proved to yield best recoveries; extraction efficiency of 13 analytes were outside 100±50% in case of the acetonitrile/water/acetic acid mixture (79:20:1), where as 31 analytes were out of the range in case of methanol. The LODs were in the order of 0.01 to 10 µg/L for the investigated analytes.

An additional, 54 house samples with suspected or reported water damage was subjected to analysis with the extended method. 19, 17 and 15 samples, respectively, were positive for sterigmatocystin, meleagrins (Fig.1) and emodin reflects infection due to spp. of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Cladosporium*.

The numbers show a predominance of *Aspergillus* and *Penicillium* taxa followed by *Cladosporium* in the indoor environment. The emodin is a common metabolite produced by all three above mentioned species. Hence determining the source of emodin needs further investigation with molecular diagnostic methods or culture based screening procedures. Other less frequently detected metabolites were stachybotrylactam, cytochalasin D, beauvericin, alternariol-methylether and roquefortine C.

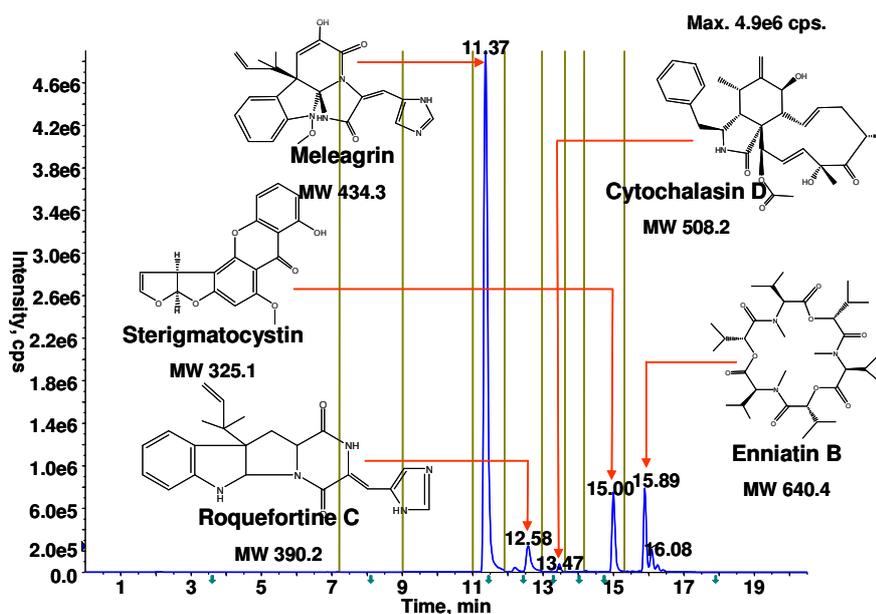


Figure 1: HPLC-ESI(+) MS/MS chromatogram of wall scrapings from a children's room. Identified species were *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus versicolor*.

The most prevalent metabolite streigmatocystin is a metabolite of few species of *Penicillium* and *Aspergillus*. From the toxicological perspective sterigmatocystin is a potential hepatocarcinogen and known to form reversible DNA adducts (Essigmann JM et al 1979). Earlier publications reported for the indoor carpet dust occurrence of *A. versicolor* as a potential source for sterigmatocystin (Engelhart S et al 2002). Selected samples with significant amounts of sterigmatocystin were screened by classical microbiological procedures. Based on experimental evidences and literature we designate *A. versicolor* as the source for sterigmatocystin in indoor samples.

The metabolite meleagrins was the second most frequently detected metabolite from the damp building samples. Substances such as insulation, gypsum wallboard, manufactured wood, ceiling tiles and textiles upon water damage are known to harbor species of *Penicillium* (Miller JD et.al 2007). Species of *Penicillium chrysogenum* produce the nitrogenated alkaloid metabolite meleagrins on building materials (de la Campa R et.al 2007). Toxicological studies with the extract of *P. atramentosum* containing rugulovasines, meleagrins and oxaline was reported to induce cytotoxicity in MTT-cell culture assay (Larsen TO et.al. 2002), though this is not a clear evidence for meleagrins induced cytotoxicity. Based on the earlier reports it can be speculated for a synergistic mode action of meleagrins with other mycotoxins in inducing cytotoxicity. Parallel to the findings from isolates of damp buildings, production of meleagrins is also reported by *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium expansum* strain isolated from Mir space station (Kozlovskii AG 2002). This suggests for a probable

co-existence of species of *Penicillium* and humans even in the absence water damage. Based on the literature and microbiological examination of building materials positive for meleagrins we conclude *Penicillium chrysogenum* to be the source of meleagrins.

Emodin is a widely distributed natural anthraquinoid metabolite found both in fungi and plants. It is a product of species of *Penicillium*, *Aspergillus* and *Chaetomium* growing on the damp surfaces. Plant rhizome extracts of *Rheum palmatum* containing emodin is shown to inhibit casein kinase II, a regulator of proliferation and differentiation of eukaryotic cells (Yim H et.al 1999). Another independent study comparing uncoupling effects of Emodin and Skyrin in rat liver mitochondria showed a stronger uncoupling influence of Emodin (Kawai K et.al 1984). Since the vital life processes such as cell proliferation and differentiation and energy metabolism can be influenced by emodin, it gains a critical analyte status in the indoor context. As expected earlier, several species belonging to *Cladosporium*, *Penicillium* and *Aspergillus* were identified in the culture isolates of damp wall scrapings.

The findings of the study show the applicability of liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for analysis of building materials and other infected indoor samples. The ability of accurate quantification makes this method a key tool for the assessment of water damage and authentication of building health. The present initiative is expected to include MVOCs (microbial volatile organic compounds) for assessing health and occupational risks with appropriate methods.

### **Acknowledgement**

The authors thank the FFG-Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft (project No:814304) for their financial support.

### **References**

1. Chew GL, Wilson J, Rabito FA, Grimsley F, Iqbal S, Reponen T, Muilenberg ML, Thorne PS, Dearborn DG, Morley RL. Mold and Endotoxin Levels in the Aftermath of Hurricane Katrina: A Pilot Project of Homes in New Orleans Undergoing Renovation. *Environ Health Perspect.* 2006 Dec;114(12):1883-9.
2. de la Campa R, Seifert K, Miller JD. Toxins from strains of *Penicillium chrysogenum* isolated from buildings and other sources. *Mycopathologia.* 2007 Mar;163(3):161-8. Epub 2007 Feb 15.
3. Engelhart S, Looek A, Skutlarek D, Sagunski H, Lommel A, Färber H, Exner M. Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Aug;68(8):3886-90.

4. Essigmann JM, Barker LJ, Fowler KW, Francisco MA, Reinhold VN, Wogan GN. Sterigmatocystin-DNA interactions: identification of a major adduct formed after metabolic activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Jan;76(1):179-83.
5. Horner WE, Worthan AG, Morey PR. Air- and dustborne mycoflora in houses free of water damage and fungal growth. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Nov;70(11):6394-400.
6. Kawai K, Kato T, Mori H, Kitamura J, Nozawa Y. A comparative study on cytotoxicities and biochemical properties of anthraquinone mycotoxins emodin and skyrin from *Penicillium islandicum* Sopp. *Toxicol Lett*. 1984 Feb;20(2):155-60.
7. Kozlovskii AG, Zhelifonova VP, Adanin VM, Antipova TV, Shnyreva AV, Viktorov AN. The biosynthesis of low-molecular-weight nitrogen-containing secondary metabolite-alkaloids by the resident strains of *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium expansum* isolated on the board of the Mir space station *Mikrobiologija*. 2002 Nov-Dec;71(6):773-7. Russian.
8. Larsen TO, Gareis M, Frisvad JC. Cell cytotoxicity and mycotoxin and secondary metabolite production by common penicillia on cheese agar. *J Agric Food Chem*. 2002 Oct 9;50(21):6148-52
9. Miller JD, Rand TG, McGregor H, Solomon J, Yang J. Mold ecology: recovery of fungi from certain moldy building materials. In: Prezant B, ed. *Indoor Mold: Recognition, Evaluation & Control*, American Industrial Hygiene Association Fairfax, VA, 2007(7).
10. Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R. 2007. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Anal Bioanal Chem*. 2007 Nov ;389(5):1505-23.
11. Yim H, Lee YH, Lee CH, Lee SK. Emodin, an anthraquinone derivative isolated from the rhizomes of *Rheum palmatum*, selectively inhibits the activity of casein kinase II as a competitive inhibitor. *Planta Med*. 1999 Feb; 65(1):9-13.

**Autoren:**

M.Sc. Vinay VISHWANATH, Dr. Michael SULYOK, Univ. Prof. Dr. Rudolf KRŠKA, Dr. Rainer SCHUHMACHER, Center for Analytical Chemistry, Department of Agrobiotechnology (IFA-Tulln), University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Konrad-Lorenz-Straße. 20, A-3430 Tulln. [vinay.vishwanath@boku.ac.at](mailto:vinay.vishwanath@boku.ac.at)

## Mykotoxikosen beim Hund

### *Mycotoxicosis in dogs*

J. BÖHM, ELISABETH REITER, M. HOLLMANN & E. RAZZAZI-FAZELI

#### Summary

Dogs may be injured through the mycotoxins aflatoxins and ochratoxin A. Liver and kidney damage and even death was observed during the last years in the USA. In Europe the deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEA) are predominant cereal mycotoxins in the dry dog food. Low OA contamination was registered. Unspecific subclinical reactions in immunosuppression, kidney lesions, cancer and reproduction disturbances can be suspected. It is evident that rigorous quality controls of ingredients are needed to produce low mycotoxin contaminated dog foods for healthy pets.

**Key words:** Mycotoxicosis, residues, dog foods, clinics, toxicology

#### Zusammenfassung

Hunde können durch die Mykotoxine Aflatoxine und Ochratoxin A gesundheitlich schwer an den Organen Leber und Nieren geschädigt werden. In den vergangenen Jahren verendeten in den USA durch Aflatoxin hunderte Hunde. In Europa findet man im Hundetrockenfutter besonders häufig und hoch Deoxynivalenol (DON) sowie das Zearalenon (ZEA) und Spuren von Fumonisin und Ochratoxin A. Subklinische Reaktionen wie Nierenschäden, Immunsuppressionen, Krebs und Reproduktionsstörungen können nicht ausgeschlossen werden. Rigorose Kontrollen der eingesetzten Komponenten sollten wenig Mykotoxin belastetes Futter für gesunde Hunde und Katzen gewährleisten

**Schlüsselwörter:** Mykotoxikosen, Rückstände, Hundefutter, Klinik, Toxikologie

Grundsätzlich können sämtliche Tierarten durch den Verzehr eines mykotoxinhaltigen Futter erkranken. Derartige Mykotoxikosen beobachtete man beim Hund, Schwein, Geflügel und Rind. Chronische und sekundäre Mykotoxikosen entstehen durch den lang anhaltenden Verzehr von niedrigen Dosen an Mykotoxinen. Die Folgen sind beim Nutztier reduzierte Produktionsleistungen, erhöhte Futteraufnahmen, erniedrigte Wachstumsraten, gestörte Reproduktion und verringerte Marktqualitäten der Produkte Fleisch, Milch und Ei. Gemeinsam mit anderen Stressoren können sie sich zu einer Mehrfaktorenkrankheit entwickeln und schwer diagnostiziert werden.

Die **Aflatoxikosen** sind historisch von Bedeutung; sie wurden beim Hund 1952 vor der klassischen Turkey-X-Disease beschrieben, jedoch waren sie in der modernen Landwirtschaft Europas selten zu beobachten. Aflatoxine sind krebserregende Stoffe und sollten in der Nahrungskette nicht nachweisbar sein. Aflatoxine werden durch verschiedene Aspergillen- und Penicillienarten bei

feuchtwarmen Lagerbedingungen gebildet. Das Krankheitsgeschehen ist gekennzeichnet von Müdigkeit und Fressunlust der betroffenen Tiere. Beim chronischen Verlauf zeigen sich neben einer allgemeinen Leberverfettung bindegewebige Einlagerungen (Fibrosierungen) in der Leber. Leistungsminderungen, Kümern der Tiere und Immunsuppressionen können bei einer subchronischen Aflatoxikose nicht ausgeschlossen werden. Rückstände von Aflatoxinen sind im Ei, Milch und in inneren Organen wie Leber und Niere möglich. Eine Lebensmittelüberwachung ist neben der Futteranalyse besonders von Importwaren wie z.B. Erdnüssen zwingend erforderlich. Gesetzliche Höchstwerte von max. 10 ppb im Hundealleinfutter dürfen nicht überschritten werden. In den USA wurden in den letzten Jahren (2003, 2005 und 2007) wiederholt Aflatoxikosen durch kontaminiertes Fertigfutter (bis 0,5 ppm) und Todesfolgen an hunderten Hunden beobachtet. Der Schaden war für die Hundefutterhersteller durch Rückholaktionen und Imageverlust infolge mangelnder Kontrolle enorm groß.

Eine **Ochratoxikose** erfolgt durch die orale Aufnahme von Ochratoxin (OA) kontaminiertem Futter, wobei vorwiegend Penicillien- und Aspergillenarten für die Bildung der Toxine während der unsachgemäßen Lagerung verantwortlich sind. Früher wurde besonders skandinavisches und kanadisches Getreide als OA-kontaminiert beobachtet. Heute weiß man, daß alle europäischen Futtermitteln geringgradig kontaminiert sein können. Meist wird neben dem Ochratoxin A das Citrinin als potenziertes Partner toxin gefunden. Beim monogastrischen Tier entstehen Leber- und Nierenschädigungen. Ein gestörter Wasserhaushalt wie erhöhte Harnmenge und gesteigerter Durst kann oftmals als Indiz für eine Ochratoxikose angenommen werden. Im chronischen Verlauf folgen Leistungsminderungen und Abgeschlagenheit. Ochratoxine können als Rückstände in die Nahrungskette gelangen. Deshalb sind Innereien und Blutmehle als Ausgangskomponenten streng zu kontrollieren.

**Fusarientoxine** und Fusariotoxikosen: Fusarien werden auch als Feldpilze vor der Ernte auf sämtlichen anfälligen Getreidearten in Europa angetroffen und sie bilden einerseits die toxischen Trichothecene, Fumonisine und andererseits das östrogene Zearalenon. Das **Zearalenon**-Syndrom wurde bei Sauen erstmals eingehender beschrieben, wobei präpubertäre Jungsaunen schon bei geringsten Belastungen erste Anzeichen eines Hyperöstrogenismus zeigen. Beim erwachsenen Rind sind Störungen der Fruchtbarkeit diagnostiziert worden.

Beim Hund können Störungen der Fortpflanzung erwartet werden, wenn eine hohe Dosis und längere Zearalenon- Einwirkung auf die Hündin besteht.

**Deoxynivalenol** (DON oder Vomitoxin) ist das bedeutendste Fusarientoxin. Es bewirkt eine verzögerte und verminderte Futtaufnahme mit einer Abnahme der Körpermassen bei Beagle Hunden. Eine Steigerung der DON-Aufnahme auf etwa 5 ppm führt zum Erbrechen. Im chronischen Verlauf kommt es zur Immunschwächung, wobei die einzelnen Mechanismen noch wenig aufgeklärt sind.

**Fumonisin** gilt als ein weiteres toxisches Mykotoxin von *Fusarien*, welches besonders beim Pferd eine Leukoenzephalomalazie (ELEM) und beim Schwein ein pulmonäres Ödem (PPE) bewirkt. Im Mais aus wärmeren Zonen kann es gelegentlich nachgewiesen werden. Fumonisin hat als Kanzerogen mehr Bedeutung in der Humanernährung und wird deshalb verstärkt kontrolliert.

Die Untersuchungen von 78 in Österreich vertriebenen Hundetrockenallegefuttern ergaben ein häufiges Vorkommen von DON und ZEA, geringgradig war FUM und OTA zu finden, Aflatoxin wurde in keiner Probe nachgewiesen (Koinig, 2008).

Das gemeinsame Auftreten mehrerer Toxine wirkt meistens leistungshemmend auf die Tiere. Junghunde sind besonders durch Mykotoxine als unerwünschte Substanzen im Hundefutter gefährdet. Kontaminierte Mehle und Getreideprodukte sind die hauptsächlichen Verursacher einer Mykotoxinbelastung.

Am wichtigsten erscheint die entsprechende Vorsorge. Die in der Hundefutterproduktion eingesetzten Futtermittel sollten von hoher Qualität sein. Strenge Kontrollen der Futtermittelkomponenten und der Fertigfutter müssen rechtzeitig beim Hersteller beim Einkauf und während der Produktion erfolgen, damit im Handel und beim Verkauf keine Mykotoxine im Hundefutter zu detektieren sind und teure Rückholaktionen bereits ausgelieferter Waren verhindert werden. Höchste Futterqualitäten sind anzustreben und einwandfreies Futter ist der Schlüssel für einen gesunden Hund.

## **Literatur**

Böhm, J. (2000): Fusariotoxins and their importance in animal nutrition. Übers. Tierernährung **28**, 95 – 132

Böhm, J. und Razzazi-Fazeli, E. (2005): Effects of mycotoxins on domestic pet species. (Ed. D. Diaz): The Mycotoxin Blue Book. Nottingham University Press, ISBN 1-904761-19-4, p. 77 – 92.

Böhm, J. (2006): Effects of mycotoxins in domestic pet species. (Ed. D.K. Laue, L.A. Tucker) Recent Advances in Pet Nutrition, Nottingham University Press, ISBN 10: 1-904761-11-9, p. 169 – 192.

Razzazi-Fazeli, E., Böhm, J., Adler, A., and Zentek, J. (2003): Fusariotoxine und ihre Bedeutung in der Nutztierfütterung, eine Übersicht. Wiener Tierärztliche Monatsschrift **90**, 202 – 210

Koinig, L. (2008): Untersuchungen zum Vorkommen der Mykotoxine Deoxynivalenol, Zearalenon, Fumonisine, Ochratoxin A und Aflatoxine in Trockenfuttern für Hunde. Dissertation Vetmed. Univ. Wien

## **Autoren:**

Josef BÖHM, Elisabeth REITER, Manfred HOLLMANN und Ebrahim RAZZAZI-FAZELI, Institut für Tierernährung, Department für Nutztiere und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Universität Wien Austria. josef.boehm@vu-wien.ac.at

# Erarbeitung von Analysemethoden zur Bestimmung von Mutterkornalkaloiden und Monitoring in ausgewählten Lebensmitteln

*Development of an analysis method for the determination and monitoring of ergot alkaloids in selected food products*

SABINE KEMMLEIN, H. KLAFFKE & ANGELIKA PREIß-WEIGERT

## Summary

Ergot alkaloids are mainly produced by the fastidious parasitic fungus *Claviceps spp.* which infects the ovary of various *Poaceae* such as rye, wheat, triticale, barley, sorghum and grasses of which rye, triticale and grasses are the most affected ones. Mean alkaloid content and pattern show considerable variability depending on the producing fungal strain, the host plant, the geographic origin of host and fungus and the climatic conditions. Up to now no analytical reference method for the determination of ergot alkaloids in feed and food is available. Occurrence data of single ergot alkaloids are scarce. Due to this background an analysis method for the determination of twelve ergot alkaloids in cereal based food was developed. First results for selected cereals and cereal products indicate total maximum alkaloid concentrations below 1000 µg/kg, which was used as reference maximum level established according to the Commission Regulation (EC) No 824/2000 [6].

**Key Words:** Ergot alkaloids, cereals, monitoring, sclerotia

## Zusammenfassung

Als Mutterkorn werden die von dem parasitären Pilz *Claviceps spp.* gebildeten Sklerotien (*Secal cornutum*) bezeichnet, die verstärkt in feuchten Jahren auf Getreideähren und Gräsern vorkommen können. Der Gehalt bzw. die Verteilung der in den Sklerotien enthaltenen Ergotalkaloide variiert dabei in Abhängigkeit von der produzierenden Pilzspezies, der befallenen Wirtspflanze, der geographischen Verbreitung und den Witterungseinflüssen. Bis dato ist kein analytisches Referenzverfahren zur Bestimmung von Ergotalkaloiden in Lebens- bzw. Futtermitteln verfügbar. Die Datenbasis zum Vorkommen einzelner Vertreter der Ergotalkaloide in Getreide, verarbeiteten Getreide (Brot, Backmischungen) und Futtermitteln, ist unzureichend. Vor diesem Hintergrund wurde ein Analyseverfahren zur Bestimmung von 12 Ergotalkaloiden in Lebensmitteln auf Getreidebasis entwickelt. Die hier präsentierten Ergebnisse ausgewählter Proben weisen maximale Gesamtalkaloidgehalte unterhalb eines auf Basis der Verordnung (EG) Nr. 824/2000 [6] als Referenz herangezogenen Höchstgehaltes von 1000 µg/kg auf.

**Schlüsselwörter:** Ergotalkaloide, Getreide, Monitoring, Sklerotien

## Einleitung

Als Mutterkorn werden die überwiegend vom parasitären Pilz *Claviceps spp.* gebildeten Sklerotien bezeichnet, die verstärkt in feuchten Jahren auf Getreideähren und Gräsern vorkommen können [1] [2] [3] [4]. In den Sklerotien sind Alkaloide enthalten, die als charakteristisches Merkmal die

chemische Struktur des tetrazyklischen Ergolins aufweisen. Als Derivate lassen sich u.a. die Lysergsäureamide (z.B. Ergometrin), die Ergopeptide (z.B. Ergotamin) und dielsoergopeptide (z.B. Ergotaminin) ableiten. Die Datenbasis zum Vorkommen der Mutterkornalkaloide in gereinigtem Rohgetreide und verarbeitetem Getreide und Futtermitteln ist unzureichend und die toxikologische Wirkungsweise noch nicht ausreichend untersucht [5]. Die Bewertung dieser Stoffgruppe gestaltet sich dabei schwierig, da der Gehalt bzw. die Verteilung der in den Sklerotien enthaltenen Mutterkornalkaloide in Abhängigkeit von der produzierenden Pilzspezies, der befallenen Wirtspflanze, der geographischen Verbreitung und den Witterungseinflüssen variiert. Höchstgehalte an Mutterkorn für den Bereich Lebensmittel sind bisher nur im Rahmen der Interventionsrichtlinie für Getreide (speziell für Weizen mit 0,05 % Mutterkornanteil) geregelt (VO EG 824/2000) [6].

Im Rahmen des Sonderforschungsprojektes des Bundesinstituts für Risikobewertung zur Bestimmung und zum Monitoring des Ergotalkaloidgehaltes in relevanten Lebens- und Futtermitteln wurde ein Analysenverfahren für Getreide und Getreidemehle (HPLC/FLD, SPE) entwickelt und in-house-validiert [7]. Insgesamt 157 verschiedene Getreidesorten, -mischungen und verarbeitete Getreideprodukte wurden bislang untersucht. Ausgewählte Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im Folgenden präsentiert.

### **Material und Methoden**

Ergocornin, Ergocorninin, Ergocristin, Ergocristinin,  $\alpha$ -Ergokryptin,  $\alpha$ -Ergokryptinin, Ergometrin maleat, Ergometrinin, Ergosin, Ergosinin, Ergotamin tartrat und Ergotaminin wurden als Leitanalyte ausgewählt. Die Probenaufarbeitung und Analyse erfolgte nach [7] und ist hier kurz dargestellt. Die Extraktion erfolgte mit einem Gemisch aus Methanol/Ethylacetat/wässriger Ammoniaklösung und anschließender Probenaufreinigung mit basischem Aluminiumoxid. Die Analysen wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Fluoreszenzdetektor (HPLC-FLD) durchgeführt. Das Analyseverfahren wurde im Laufe des Projektes modifiziert: Isopropanol wurde als Phasenvermittler zum Extraktionsgemisch hinzugefügt. Das verwendete Aluminiumoxid wurde vor der Verwendung mit Extraktionsmittel konditioniert und zur quantitativen Wiederfindung nach der Aufgabe des Probenextraktes mit 2 mL Extraktionsmittel eluiert.

### **Ergebnisse**

In Tabelle 1 sind der Mittelwert, Median und maximale Gesamtalkaloidgehalt der untersuchten Roggenmehle und -produkte (Deutschland, Ernte 2006/2007) aufgeführt. Die höchsten Gehalte konnten hierbei in Roggenmehl mit 715  $\mu\text{g}/\text{kg}$  und geschrotetem Roggen mit 740  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bestimmt werden. Ausgehend von einem zulässigen Höchstgehalt von umgerechnet 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nach [6] (0,05 % Sklerotien in Weizen  $\equiv$  0,2 % Ergotalkaloide  $\equiv$  1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) liegen die ermittelten Gehalte unterhalb dieses Höchstgehaltes.

Tabelle 1: Ergotalkaloidgehalte in Roggenmehlen und –produkten (Ernte 2006/2007) [7]

Probe	Probenzahl	Σ Alkaloidgehalt [µg/kg]		
		Mittelwert	Median	Max
Roggenmehl	22	138	85	715
Roggen	7	62	60	197
Roggen geschrotet	7	158	91	740
Roggenflocken	3	26	13	66

In Abbildung 1 sind die prozentualen Gehalte der Ergotalkaloide in den hoch belasteten Roggenproben im Vergleich zu der in der EFSA Stellungnahme [5] angegebenen gemittelten Verteilung dargestellt. Insbesondere für die Hauptalkaloide Ergocristin und Ergotamin ergeben sich gute Übereinstimmungen.

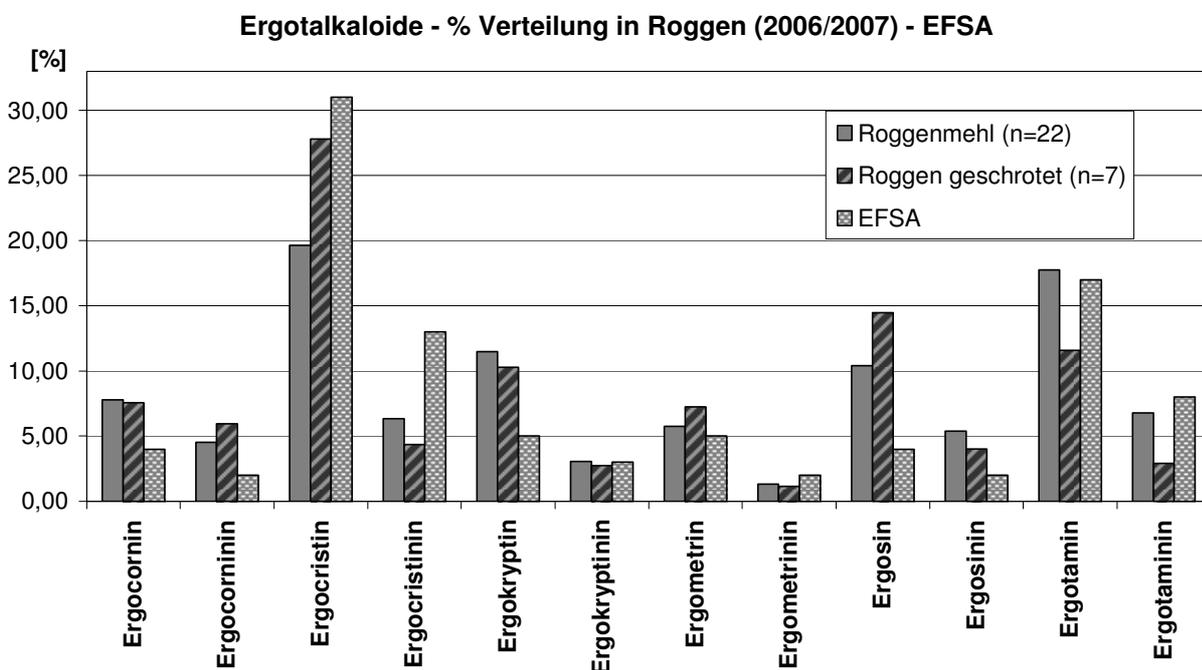


Abbildung 1: Vergleich der prozentualen Verteilung der Ergotalkaloide in den untersuchten Roggenproben mit der in der EFSA Stellungnahme aufgeführten Verteilung.

Tabelle 2 zeigt eine Auswahl an untersuchten verarbeiteten Roggenprodukten. Die maximalen Gehalte liegen deutlich unter dem als Referenz herangezogenen Höchstgehalt von 1000 µg/kg. Roggenknäckebrötchen weist hierbei mit 90 µg/kg den höchsten Gehalt auf.

Tabelle 2: Ergotalkaloidgehalte in verarbeiteten Lebensmitteln (Roggen, Dinkel) (2008)

Probe	Probenzahl	Σ Alkaloidgehalt [µg/kg]		
		Mittelwert	Median	Max
Roggenbrot	13	28	16	69
Roggenknäckebrötchen	5	78	88	90
Dinkelbrot	3	7	8	11

## Zusammenfassung und Ausblick

Von den insgesamt 157 im Rahmen des Sonderforschungsprojekts untersuchten Getreidemehlen und verarbeiteten Getreideprodukten liegen die maximalen Ergotalkaloidgehalte der hier präsentierten Ergebnisse (39 Proben Erntejahr 2006/2007, 21 Proben Erntejahr 2008) unterhalb des als Referenzwert herangezogenen Höchstgehaltes von 1000 µg/kg. Die höchsten Gehalte konnten in den Roggenmehlen und dem Roggenschrot der hier präsentierten Auswahl nachgewiesen werden. Die Dinkelbrote weisen die geringste Belastung mit Gehalten im Spurenbereich ( $\Sigma$  Alkaloidgehalt<sub>max</sub> 11 µg/kg) auf, wobei hier die geringe Anzahl der untersuchten Proben zu berücksichtigen ist (n=3). Insgesamt ist der Gehalt in den Broten im Vergleich zu den Mehlen tendenziell geringer. Eine abschließende Bewertung aller Getreideproben steht noch aus, auch unter dem Aspekt möglicher Spitzenbelastungen und der Berücksichtigung der Einzelalkaloidgehalte. Die Untersuchungen zu den Gehalten in Getreidemehlen und -erzeugnissen werden fortgeführt. Eine Ausdehnung der Untersuchungen auf den Bereich Futtermittel ist ebenfalls Teil des Sonderforschungsprojektes und wird im Anschluss an die Lebensmittelproben erfolgen.

## Literatur

- [1] A. Hofmann, Die Mutterkornalkaloide, Nachtschatten Verlag, Solothurn, 2000
- [2] J.C. Young, J. Environ. Sci. Health, 16 (1981), pp. 83-111
- [3] J.C. Young, Environ. Sci. Health, 16 (1981), pp. 381-393
- [4] J.C. Young, Z. Chen, Environ. Sci. Health, 17 (1981), pp. 93-107
- [5] EFSA, EFSA J., 225 (2005), pp. 1-27,  
[http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Scientific\\_Opinion/contam\\_op\\_ej225\\_ergot\\_en1,3.pdf](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Scientific_Opinion/contam_op_ej225_ergot_en1,3.pdf)
- [6] Verordnung (EG) Nr. 824/2000 der Kommission vom 19. April 2000 über das Verfahren und die Bedingungen für die Übernahme von Getreide durch die Interventionsstellen sowie die Analysemethoden für die Bestimmung der Qualität
- [7] C.Müller, S.Kemmlin, H.Klaffke, A.Preiß-Weigert, R.Wittkowski. A basic tool for risk assessment: A new method for the analysis of ergot alkaloids in rye and selected rye products. Mol. Nutr. Food Res., in press

## Autoren:

Dr. Sabine KEMMLEIN, H. KLAFFKE, Angelika PREIß-WEIGERT, Bundesinstitut für Risikobewertung, Thielallee 88-92, 14195 Berlin

## **Mykotoxine aus Sicht der Futtermittelkontrolle**

### *Mycotoxins from the view of the feed control*

ULLA REICHHART

#### **Zusammenfassung / Summary:**

Der Gehalt der wichtigsten bekannten Mykotoxinen in Futtermitteln ist wegen einer möglichen Beeinträchtigung von Tier und Mensch rechtlich geregelt. Einer hohen Mykotoxinbelastung kann durch geeignete Vorbeugemaßnahmen in der landwirtschaftlichen Praxis bzw. auf dem Futtermittelbetrieb entgegengewirkt werden. Die Kontrollergebnisse und Meldungen der AGES bzw. des BAES und der EFSA (Europäische Lebensmittelbehörde) zeigen, dass das Thema „Mykotoxinproblematik“ nach wie vor von großer Bedeutung ist. Vieles auf diesem Gebiet muss allerdings erst noch erforscht werden, denn derzeit kann die etwaige Gefahr einer Mykotoxikose aufgrund von unbekanntem Wechselwirkungen und versteckten Mykotoxinen auch bei einem scheinbar geringen Mykotoxingehalt nicht gänzlich ausgeschlossen werden. In den letzten Jahren wurden laufend Möglichkeiten, Pilzgifte im Futter in den Griff zu bekommen, erforscht. Aktuell wird in der Europäischen Kommission die Zulassung einer Funktionsgruppe von Mykotoxinbindemitteln im Bereich der Futtermittelzusatzstoffe (VO (EG) 1831/2003) diskutiert.

Due to the risk for animals and humans, the concentration of the most important, known mycotoxins in feed is regulated judicial. A high mycotoxin concentration can be avoided by taking preventive measures in the agricultural practise as well as at the feed establishment. The controls and notifications of AGES and EFSA show that the topic is still of large interest. A lot more has to be investigated in this matter as nowadays the danger of a mycotoxicosis cannot be eliminated entirely despite an apparantly low mycotoxin concentration because of unknown counteractions and masked mycotoxins.

There already exist a few possibilities how to deal with mycotoxins in feed. At the moment the authorisation of mycotoxin binders is discussed in the European Commission.

**Schlüsselworte / Key words:** Mykotoxine/mycotoxins, Mykotoxinbelastung/mycotoxin concentration, Mykotoxinbindemittel/mycotoxin binders

#### **Einleitung:**

Mykotoxine sind auch in Futtermittel weit verbreitet ytoxine DON, ZON, Ochratoxin A, und die Fumonisine B1 und B2 sind nachweislich durch „carry over“ auch in tierischen Lebensmitteln (Milch, Eier, Fleisch,...) zu finden und können somit auch an den Endverbraucher gelangen und hier eine Gesundheitsgefährdung für den Menschen darstellen. Der Mykotoxingehalt von Futtermittel stellt daher neben dem Risiko für die Tiergesundheit, auch einen Risikofaktor für die Lebensmittelsicherheit dar.

### **Vorkommen von Mykotoxinen in Futtermittel:**

Um die Gefahr von Mykotoxikosen für Tier und Mensch möglichst gering zu halten, ist Gehalt der wichtigsten bekannten Pilzgiften in Futtermitteln rechtlich mit Höchst- (Aflatoxin A) bzw. Richtwerten (DON, ZON, Ochratoxin A, Fumonisin B1 und B2, Mutterkorn) geregelt.

Im Jahr 2007 wurden im Rahmen der hoheitlichen Futtermittelkontrollen des Instituts für Futtermittel - BAES 313 Futtermittel auf Mykotoxine untersucht, fast alle auf DON, ZON, Ochratoxin A, 103 Proben auf Aflatoxin B1 und 5 auf Fumonisine. Nur eine Probe überschritt den Grenzwert von Aflatoxin B1.

Im europäischen Schnellwarnsystem RASFF wurden im selben Jahr 10, den Grenzwert von Aflatoxin überschreitende Futtermittel, gemeldet, das Inverkehrbringen der Ware musste daher gestoppt werden. 5 Futtermittel davon stellten Erdnüsse für den Einsatz als Vogelfutter dar, 3 waren Sonnenblumenkerne aus Ägypten und 2 weitere Einzelfuttermittel waren Kokosnußkuchen aus der Elfenbeinküste für Lebensmittel-produzierende Nutztiere. 2 Futtermittel wurden mit Überschreitung des ZON-Richtwerts gemeldet: es handelte sich um Sojahülsen aus Argentinien für Lebensmittel produzierende Nutztiere.

### **Vermeidung von Mykotoxinen in Futtermitteln:**

Vermieden werden können die Stoffwechselprodukte von Pilzen am landwirtschaftlichen Betrieb bereits durch die richtige Standort- und Sortenwahl, eine Erweiterung der Fruchtfolge, eine wendende Bodenbearbeitung, rechtzeitige und schonende Ernte, geringe Bestandsdichten sowie sachgerechte Düngung.

Am Futtermittelbetrieb ist die Lagerung der Produkte bei unter 18°C bei einem Wassergehalt der Ware von unter 13% ein ausschlaggebender Faktor zur Minimierung der Mykotoxin-Belastung. Angeschlagene Körner sollen aussortiert werden, da sie eine gute Angriffsfläche für Pilzbefall darstellen. Eine Konservierung mit organischen Säuren beugt einer Mykotoxinbildung vor. Eine gute landwirtschaftliche Praxis und die Führung des Betriebes nach HACCP Grundsätzen kann ebenfalls helfen die generelle Betriebshygiene zu verbessern. Eigenkontrollen und Mykotoxin-Analysen lassen das Gefährdungspotential besser abschätzen.

### **Umgang mit Mykotoxin belastetem Futter:**

Mit Mykotoxin belastete Futtermittel können in verschiedensten Weisen behandelt werden: wird der Grenzwert überschritten kann das Futtermittel entsorgt (z.B. über Biogasanlagen), gereinigt (z.B. durch Siebung bei Mutterkorn), oder dekontaminiert werden. Das Verschneiden oder die Verteilung von kontaminierten Futtermitteln an weniger empfindliche Tierarten von Futtermitteln ist bei einer Richtwertüberschreitung erlaubt, nicht jedoch bei einer Verletzung der Höchstgrenzen. Eine Dekontamination kann durch technische Behandlung (z.B. durch Erhitzung, Einsatz von Säuren) erfolgen; aber auch die in-vivo-Behandlung (z.B. durch Mykotoxinbindemittel) ist gängige

Praxis, rechtlich jedoch als mögliche Kontaminationsmaßnahme bei Grenzwertüberschreitungen nicht zugelassen.

Besondere Herausforderungen auf dem Gebiet sind jedoch noch immer die – wahrscheinlich – große Anzahl unbekannter Mykotoxine, sowie verschiedene Wechselwirkungen zwischen den Toxinen – ebenfalls großteils unbekannt. Weiters können maskierte Mykotoxine auftreten: Pflanzen haben die Möglichkeit die Pilzgifte in ihren Zellen umzubauen, die jedoch im tierischen Stoffwechsel oft wieder zurückgebaut werden. Somit kann trotz der Einhaltung der gesetzlichen Standards das Auftreten einer Mykotoxikose nicht zur Gänze ausgeschlossen werden.

Mykotoxinbindemittel sind Futtermittelzusatzstoffe, die Mykotoxine im Verdauungstrakt der Tiere inaktivieren und würden dadurch den Einsatz von Mykotoxin belastetem Futter ermöglichen und somit Ressourcen und Kosten sparen. Derzeit sind diese in der EU nicht zugelassen, ihre Zulassung ist jedoch geplant; als Voraussetzung dafür gilt der Nachweis ihrer Wirkung und Sicherheit. Außerdem darf die Betriebshygiene durch den möglichen Einsatz von Mykotoxinbindemittel nicht vernachlässigt werden.

#### **Literatur**

- [1] JEROCH H.; DROCHNER W.; SIMON O. (2008): Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere, S. 295-311
- [2] FEFANA – EU Feed Additives & Premixtures Association: Mycotoxin adsorbant or denaturant, July 2008
- [3] The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF): Annual Report 2007

#### **Autorin:**

Dipl.-Ing. Ulla REICHHART, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Institut für Futtermittel, Spargelfeldstrasse 191, 1220 Wien, Austria

# **Abschätzung der Verbrauchereexposition für Ochratoxin A und Patulin durch den Verzehr von Lebensmitteln des österreichischen Marktes 2003 - 2007**

*Assessment of consumer exposure to ochratoxin A and patulin through consumption of food stuff of the Austrian market 2003 – 2007*

ELKE RAUSCHER-GABERNIG & R. GROSSGUT

## **Summary**

The mycotoxins ochratoxin A and patulin may occur in various food stuffs like cereals and cereal products, fruit and fruit juices, nuts, dried fruit, coffee, cocoa and cocoa products and animal products. Regulation (EC) No 1881/2006 sets up maximum levels for ochratoxin A and patulin in certain food stuffs to protect consumers. About 22 % of the 1034 tested food samples were contaminated with ochratoxin A and patulin, respectively, to a certain extent. However, most of the concentrations were well below the maximum levels. Only in 1 % of the samples concentrations above the maximum levels were measured. The threshold levels of ochratoxin A and patulin were not exceeded in any population group by average food consumption. Therefore the health risk of the Austrian population through exposure to ochratoxin A and patulin in food seems to be low during the period of examination 2003 - 2007.

**Keywords:** ochratoxin A, patulin, food, consumer exposure

## **Zusammenfassung**

Die Mykotoxine Ochratoxin A und Patulin können in vielen verschiedenen Lebensmitteln enthalten sein, wie in Getreide und Getreideprodukten, Obst und Fruchtsäften, Nüssen, Trockenfrüchten, Kaffee, Kakaoerzeugnissen und tierischen Erzeugnissen. Die Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 legt Höchstgehalte für Ochratoxin A und Patulin in bestimmten Lebensmitteln zum Schutz der Verbraucher fest. Rund 22 % der 1034 untersuchten Lebensmittel wiesen zwar eine gewisse Belastung mit Ochratoxin A bzw. Patulin auf. Die gemessenen Gehalte an Ochratoxin A und Patulin lagen zum Großteil unter den gesetzlichen Höchstgehalten. Nur 1 % aller Proben enthielten Gehalte, welche die Höchstgehalte überschritten. Bei durchschnittlichem Verzehr wurden die Schwellenwerte von Ochratoxin A und Patulin bei keiner Bevölkerungsgruppe ausgeschöpft. Das Gesundheitsrisiko für die österreichische Bevölkerung durch die Aufnahme von Ochratoxin A und Patulin über Lebensmittel im Untersuchungszeitraum 2003 - 2007 erscheint daher gering.

**Schlüsselwörter:** Ochratoxin A, Patulin, Lebensmittel, Verbrauchereexposition

## **Einleitung**

Ochratoxin A und Patulin sind Mykotoxine, die von verschiedenen Pilzen der Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus* gebildet werden und ubiquitär vorkommen können. In einer Vielzahl von Lebensmitteln können diese Pilzgifte enthalten sein, wie zum Beispiel in Getreide und Getreideprodukten, Obst und Fruchtsäften, Nüssen, Trockenfrüchten, Kaffee, Kakaoerzeugnissen sowie in tierischen Erzeugnissen über Verfütterung kontaminierter Futtermittel. Sie können verschiedene toxikologische Symptome verursachen und sowohl akut als auch chronisch ein Gesundheitsrisiko darstellen. In Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 wurden daher Höchstgehalte für Ochratoxin A und Patulin in bestimmten Lebensmitteln festgelegt, um die Verbraucher vor einer unannehmbaren Belastung zu schützen (Europäische Kommission, 2006).

## **Gefahrenidentifizierung**

Ochratoxin A ist eine stabile Verbindung, die bei der herkömmlichen Lebensmittelzubereitung nicht zerstört wird (Boudra et al., 1995). Patulin ist hitzestabil bei pH 3,5 – 5,5 (Lovett und Peeler, 1973). Bei Fermentation von Fruchtsäften zu alkoholischen Getränken wird es abgebaut (Stinson et al., 1978; Altmayer et al., 1982).

## **Gefahrencharakterisierung**

Ochratoxin A ist nephrotoxisch, immuntoxisch, entwicklungstoxisch und verursacht Nierentumore in Versuchstieren. Auf Basis der Ergebnisse aus Kurzzeitfütterungsstudien mit Schweinen wurde eine tolerierbare wöchentliche Aufnahme (TWI) von 120 ng/kg KG/w abgeleitet (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit, 2006).

Patulin ist zytotoxisch, embryotoxisch, genotoxisch und immunsuppressiv. Basierend auf den Ergebnissen einer Karzinogenitätsstudie mit Ratten wurde für Patulin eine vorläufige maximal tolerierbare tägliche Aufnahmemenge (PMTDI) von 0,4 µg/kg KG abgeleitet (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1996).

## **Expositionsabschätzung**

Im Zeitraum 2003 - 2007 wurden in Österreich 870 Proben von Lebensmitteln auf Ochratoxin A und 164 Proben auf Patulin untersucht. Die ermittelten durchschnittlichen Mykotoxingehalte in den einzelnen Lebensmittelgruppen sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Anhand der durchschnittlichen Mykotoxingehalte und der durchschnittlichen Verzehrsmengen (Elmadfa und Freilings, 2004) wurde die Exposition gegenüber Ochratoxin A und Patulin für die Bevölkerungsgruppen Vorschulkinder, Frauen und Männer abgeschätzt. Die tägliche durchschnittliche Exposition betrug für Vorschulkinder 0,09 µg/d Ochratoxin A und 1,4 µg/d Patulin, für Frauen 0,14 µg/d Ochratoxin A und 2 µg/d Patulin, für Männer 0,16 µg/d Ochratoxin A und 2,3 µg/d Patulin (Tab. 2).

Tab. 1: Durchschnittliche Gehalte von Patulin und Ochratoxin A in verschiedenen Lebensmittelgruppen

Lebensmittelgruppe	Anzahl Proben gesamt/positiv	Durchschnittliche Gehalte in µg/kg	
		Patulin	Ochratoxin A
<b>Apfelsaft</b>	101/38	6,2	-
<b>Traubensaft</b>	63/15	4,3	-
<b>Nüsse</b>	37/1	-	<0,1
<b>Getreide und Getreideerzeugnisse</b>	257/36	-	0,23
<b>Trockenfrüchte</b>	136/51	-	2,48
<b>Kakao und Kakaoerzeugnisse</b>	44/18	-	0,51
<b>Kaffee geröstet</b>	211/70	-	0,32
<b>Löslicher Kaffee</b>	12/3	-	0,83
<b>Fleisch</b>	131/0	-	<0,1
<b>Geflügel</b>	30/0	-	<0,1
<b>Süßwasserfische</b>	12/0	-	<0,1

Tab. 2: Durchschnittliche alimentäre Exposition zu Patulin und Ochratoxin A und Schwellenwert-Auslastung für verschiedene Bevölkerungsgruppen

Bevölkerungsgruppe	Durchschnittliche Exposition µg/d		Schwellenwert-Auslastung %	
	Ochratoxin A	Patulin	Ochratoxin A	Patulin
<b>Vorschulkinder</b>	0,09	1,4	23	18
<b>Frauen</b>	0,14	2	14	8
<b>Männer</b>	0,16	2,3	14	8

### Risikocharakterisierung

Für Ochratoxin A und Patulin wurde je ein Schwellenwert festgelegt, bis zu dem die Aufnahme der Substanz ohne negative Effekte angenommen werden kann. Dieser Schwellenwert wurde der durchschnittlichen Exposition gegenüber gestellt. Für Ochratoxin A wurde bei durchschnittlicher Exposition der TWI zu 23 % für Vorschulkinder, zu jeweils 14 % für Frauen und Männer ausgeschöpft. Für Patulin wurde bei durchschnittlicher Exposition der PMTDI zu 18 % für Vorschulkinder, zu jeweils 8 % für Frauen und Männer ausgeschöpft.

In 78 % der 1034 untersuchten Lebensmittelproben konnten keine Gehalte von Ochratoxin A bzw. Patulin nachgewiesen werden. Rund 22 % der Lebensmittel wiesen messbare Gehalte an Ochratoxin A bzw. Patulin auf. 1 % aller Proben enthielten Gehalte, die über den gesetzlichen Höchstgehalten lagen. Die durchschnittlichen Gehalte von Ochratoxin A und Patulin führten jedoch bei durchschnittlichem Verzehr in keiner Bevölkerungsgruppe zu einer Ausschöpfung der

Schwellenwerte. Das Gesundheitsrisiko für die österreichische Bevölkerung durch die Aufnahme von Ochratoxin A und Patulin über Lebensmittel im Untersuchungszeitraum erscheint gering.

### **Literatur**

Altmayer B., Eichhorn K.W., Plapp R. (1982): Untersuchungen über den Patulingehalt von Traubenmosten und Wein. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und –Forschung A 175(3), 172-174.

Boudra H., Le Bars P., Le Bars J. (1995): Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. Appl Environ Microbiol 61, 1156–1158.

Elmadfa I., Freisling H. (2004): Wissenschaftliche Auswertung des neu erhobenen Datenmaterials zu den Aufnahmemengen von Lebensmitteln (erweiterte CFCS-Gruppierung) durch verschiedene Bevölkerungsgruppen in tabellarischer Form. Forschungsauftrag GZ 72005/9-IV/6/04 des Bundesministeriums für Gesundheit und Frauen. Institut für Ernährungswissenschaften der Universität Wien 2004 (nicht veröffentlicht).

Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (2006): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in food. The EFSA Journal 365, 1-56.

Europäische Kommission (2006): Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln. Amtsblatt der Europäischen Union L 364, 20.12.2006, 5-24.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (1996): Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food. WHO Food Additives Series 35, 377-402.

Lovett J., Peeler J.T. (1973): Effect of pH on the thermal destruction kinetics of patulin in aqueous solution. J Food Sci 38, 1094-1095.

Stinson E.E., Osman S.F., Huhtanen C.N., Bills D.D. (1978): Disappearance of patulin during alcoholic fermentation of apple juice. Appl Environ Microbiol 36(4), 620-622.

### **Autoren:**

DI Elke RAUSCHER-GABERNIG und Dr. Roland GROSSGUT, AGES, Bereich Daten, Statistik, Risikobewertung, Spargelfeldstraße 191, 1220 Wien, Austria

# Schnellmethode zur Pathogenitätsprüfung von *Fusarium* spp. an Spargeljungpflanzen

*Fast assay to evaluate the pathogenicity of Fusarium spp. on asparagus plants*

ALEXANDRA SCHOLZ, SUSANNE VON BARGEN, F. HENNIG, MONIKA GOßMANN &  
CARMEN BÜTTNER

## Zusammenfassung

Zwei *F. proliferatum*-, und fünf *F. oxysporum*-Stämme aus Spargel sowie ein *F. verticillioides*-Stamm aus Mais wurden einer Schnellmethode zur Überprüfung der Aggressivität und Pathogenität an 14 Tage alten Spargeljungpflanzen unterzogen. Nach einer zweiwöchigen Inkubation wurden die Parameter Befallsgrad und Frischmasse von Wurzel und Spross erfasst.

Die Pathogenität der *F. proliferatum*- und der *F. oxysporum*-Stämme wurde durch die Verbräunung der Leitgefäße der Spargelwurzeln bestätigt. *F. verticillioides* rief nur Verbräunungen der äußeren Epidermis hervor. Die Infektion der Spargeljungpflanzen führte bei allen Stämmen zu einem signifikant erhöhtem Befallsgrad gegenüber der Kontrollvariante. Innerhalb der Varianten erwies sich *F. proliferatum* als signifikant aggressiv. Zudem wiesen alle drei Varianten eine signifikante Reduzierung der Frischmassen von Wurzel und Spross auf.

Die geprüfte Schnellmethode erwies sich als geeignet, die Pilzstämme innerhalb von 28 Tagen hinsichtlich ihrer Pathogenität zu evaluieren und deren Aggressivität an Spargel vergleichend zu bewerten.

## Schlüsselwörter

*F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *in vitro*-Pathogenitätsschnelltest, Spargel

## Summary

A fast *in vitro* assay with asparagus plants was used to evaluate pathogenicity and compare the virulence of two Isolates of *F. proliferatum*, five Isolates of *F. oxysporum* from asparagus and one isolate of *F. verticillioides* from maize. Two weeks after inoculation of 14 days old asparagus plants with fungal isolates the disease rating class and the root and shoot fresh weights were determined and compared with untreated controls.

Pathogenicity of *F. proliferatum* and *F. oxysporum* could be shown by browning of the vascular bundles, whereas *F. verticillioides* colonized asparagus roots showed only browning of the epidermis. According to the disease rating, the *F. proliferatum*-Isolates were highly aggressive, whereas the *F. oxysporum*-Isolates exhibited a lower virulence. The inoculation of asparagus plants with different Isolates led to reduction of the fresh weight of roots and shoots.

Therefore it was possible to determine the aggressiveness and pathogenicity of the different isolates in only 28 days.

## Key words

*F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *in vitro* assay, pathogenicity, asparagus

## Einführung

Einige *Fusarium* spp. sind bedeutende Pathogene an Kulturpflanzen, einschließlich des Spargels und führen zu Qualitätsminderungen und Ernteeinbußen (GOßMANN et al. 2005, PAPST et al. 2007, SCHULTZ et al. 2007). Ein großes Problem ist zudem die mögliche Gefährdung von Mensch und Tier durch das Mykotoxinbildungspotential dieser Arten (MARASAS et al. 1984). Nicht alle *Fusarium*-Arten und deren Stämme sind in der Lage, Pflanzen zu infizieren. Um diese Saprophyten von pathogenen Stämmen zu unterscheiden, müssen Pathogenitätstests *ad planta* durchgeführt werden. Dabei sind herkömmliche Pathogenitätstest im Gewächshaus langwierig und platzaufwendig, während bei einem *in vitro*-Pathogenitätsschnelltest unter kontrollierten Bedingungen in kürzerer Zeit die Pathogenität von Stämmen überprüft werden kann.

## Material und Methoden

Zwei *F. proliferatum* (Fpro)- und fünf *F. oxysporum* (Foxy)-Stämme aus Spargel und ein *F. verticillioides* (Fver)-Stamm aus Mais (als Negativkontrolle) wurden für den Schnelltest an Spargeljungpflanzen eingesetzt. Oberflächendesinfizierte Spargelsamen wurden bei Dauerdunkel (25°C) bis zur Keimung auf Wasseragar inkubiert und nach 5 - 7 Tagen auf Hoagland-Agar umgesetzt. Die Kultivierung erfolgte in der Klimakammer bei 24°C (16 Std. Licht, 8 Std. Dunkelheit). Die Inokulation von je 21 Spargelpflanzen erfolgte mit 0,5 ml Sporensuspension je *Fusarium* spp.-Isolat (Konz. 10<sup>6</sup> Sporen/ml) nach 14 Tagen Inkubation. Als Kontrolle dienten unbehandelte Spargelpflanzen. Nach einer zweiwöchigen Inkubationszeit unter o. g. Bedingungen wurden die Spargelpflanzen bonitiert, indem die Pflanzen aufgrund der Wurzelverbräunung in 4 Schadensklassen eingeteilt (Tab. 1) und der Befallsgrad (MARTINEZ-LOPEZ 2007) errechnet wurde. Zudem wurden die Leitgefäße der Wurzeln mikroskopisch auf Verbräunungen überprüft sowie die Frischmassen der Wurzeln und Sprosse aller 21 Spargelpflanzen pro Variante erfasst.

Tab. 1: Schadensklassen 0-3 der Wurzelbonitur zur Ermittlung des Befallsgrades

Schadensklasse	Beschreibung
0	keine Symptome
1	Haupt- und Seitenwurzeln leicht verbräunt: < 25 %
2	Haupt- und Seitenwurzel verbräunt: 25-50 %
3	Haupt- und vor allem auch Seitenwurzeln stark verbräunt: 50-75 % zudem Vermorschungen

## Ergebnisse

Mikroskopische Untersuchungen der Wurzeln zeigten bei den *F. proliferatum*- und den *F. oxysporum*-Varianten eine Verbräunung der äußeren Epidermis, des Parenchyms und der Leitbahnen. *F. verticillioides* rief nur Verbräunungen der äußeren Epidermis hervor. Die *F. proliferatum*-Stämme unterschieden sich in ihrer Aggressivität signifikant (Mann-Whitney-U-Test,  $p \leq 0,05$ ) von den restlichen Varianten und wiesen Befallsgrade von über 55 % auf, während die der *F. oxysporum*-Stämme zwischen 31 und 43 % lagen. Diese unterschieden sich

untereinander nicht signifikant, aber von der *F. verticillioides*-Variante und der Kontrolle. Die mit *F. verticillioides* infizierten Spargelpflanzen zeigten nur leichte Verbräunungen der äußeren Epidermis, unterschieden sich aber mit 6 % Befallsgrad signifikant von der Kontrolle (Abb. 1).

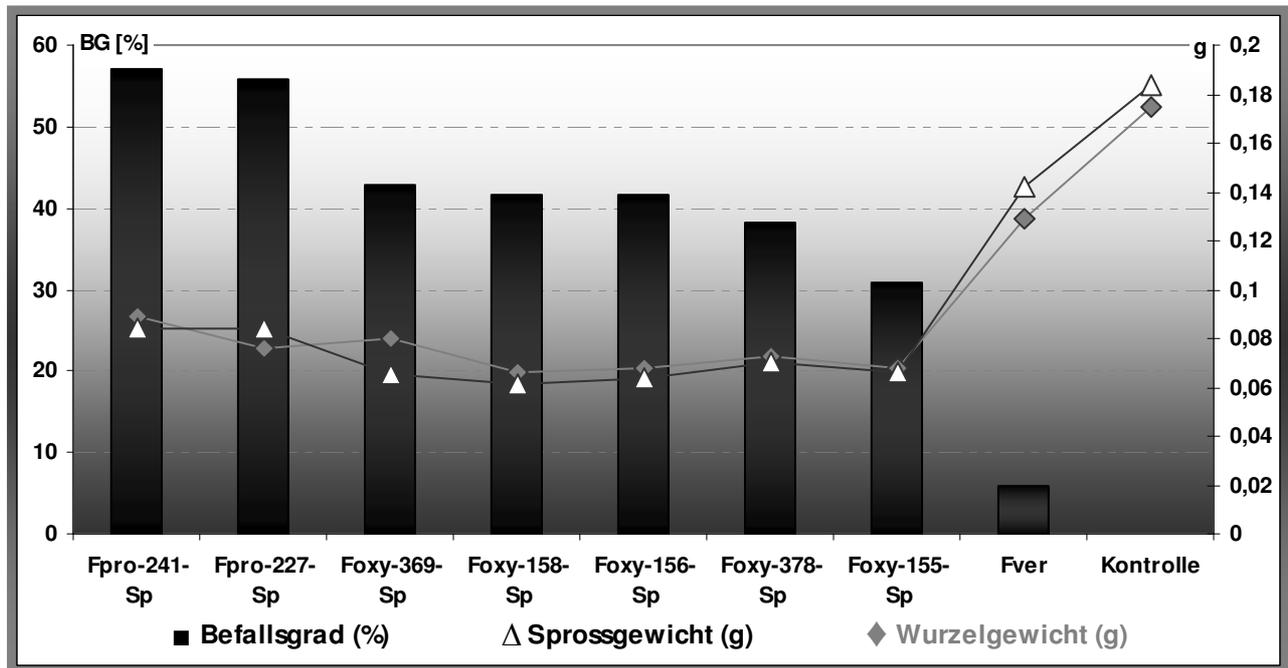


Abb. 1: Befallsgrade (BG) sowie Mittelwerte von Spross- und Wurzelgewicht (g), der mit den verschiedenen *F. oxysporum*-, *F. proliferatum*- und *F. verticillioides*-Pilzstämmen infizierten Spargelpflanzen 14 dpi

Die Wurzeln und Sprosse der Spargeljungpflanzen, die mit dem *F. verticillioides*-Stamm sowie den *F. proliferatum*- und *F. oxysporum*- Stämmen infiziert waren, wiesen Reduzierungen der Biomasse auf und unterschieden sich diesbezüglich signifikant von der unbehandelten Kontrollvariante. *F. proliferatum*- und *F. oxysporum*-infizierte Pflanzen unterschieden sich dabei untereinander nicht (Tukey-Test,  $p \leq 0,05$ ). Bei den *F. proliferatum* und *F. oxysporum*- Varianten mit einem hohen Befallsgrad ist die sichtbare Schädigung auch mit einer Reduzierung der Spross- bzw. Wurzelgewichte verbunden, während bei der Varianten mit dem niedrigen Befallsgrad (*F. verticillioides*) bzw. der nicht geschädigten, unbehandelten Kontrolle, die Frischmassen von Wurzel und Spross deutlich höher liegen (Abb.1).

## Diskussion

Die *F. proliferatum*- und *F. oxysporum*-Stämme waren in der Lage, sich in den Spargeljungpflanzen zu etablieren und Schädigungen hervorzurufen. *F. verticillioides* als Maispathogen (DESJARDINS & PLATTNER 2000) besiedelte nur die äußere Epidermis und drang innerhalb dieser zwei Wochen nicht bis zu den Leitgefäßen der Spargelpflanzen vor. Ob *F. verticillioides* dies beim Spargel überhaupt gelingt und eine potenzielle Gefahr dieser Art als Pathogen an Spargel ausgeht, müsste noch überprüft werden. Bislang sind an Spargel hauptsächlich *F. oxysporum*, *F. proliferatum* und *F. solani* (GOBMAN et al. 2005, WEBER et al.

2006) als Pathogene nachgewiesen. Der *F. proliferatum*-Stamm erwies sich am aggressivsten, während die ausgelöste Tracheomykose durch *F. oxysporum* sich weniger im Befallsgrad, als mit einem größeren Verlust an Frischmasse bei Wurzel und Spross bemerkbar machte.

Pathogenitätstests mit einer Versuchsdauer von mehr als 80 Tagen im Gewächshaus kamen zu ähnlichen Ergebnissen (MARTINEZ-LOPEZ 2007, STEPHENS & ELMER 1988). Zudem stellten STEPHENS & ELMER (1988) keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gewächshausstudie und der *in vitro*-Methode fest, so dass der vorgestellte *in vitro*-Pathogenitätstest als Schnellmethode innerhalb von vier Wochen mit Hilfe der Parameter Befallsgrad, Leitgefäßbonitur und Frischmasse von Wurzel und Spross pathogene von apathogenen Stämmen differenzieren kann. Darüber hinaus können durch diesen Test auch Aggressivitätsunterschiede von Stämmen an Spargel ermittelt werden.

### **Literatur**

Goßmann M, Kleta S, Humpf H-S, Büttner C (2005) Untersuchungen zum endophytischen Befall von *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nierenberg in geernteten Stangen von Spargel (*Asparagus officinalis* L.) Gesunde Pflanzen **57**, 53-58

Marasas WFO, Nelson PE, Toussoun TA (1984) Toxigenic *Fusarium* species. Identity and mycotoxicology. The Pennsylvania State University Press, University Park, PA, USA

Martinez-Lopez O (2007) Pathogenität und Toxizität von *Fusarium* spp. an *Asparagus officinalis* L. und Differenzierung zweier initialer Gene des Fumonisin-Biosyntheseweges. Diplom-Arbeit im Studiengang: - Gartenbauwissenschaften - Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Institut für Gartenbauwissenschaften der Humboldt-Universität zu Berlin

Papst C, Zellner J, Venkataratnam S, Eder J (2007) *Fusarium*-Problematik bei Körnermais (*Zea Mays* L.). Gesunde Pflanzen **59**, 7-16

Schultz B, Ellner FM, Goßmann M, Büttner C (2007) Untersuchungen zur Pathogenität und Mykotoxinbildung von *Fusarium sambucinum*, dem Erreger der Trockenfäule von Kartoffeln. Mycotoxin Research **23**, 78-84

Stephens CT & Elmer WH (1988) An In Vitro Assay to Evaluate Sources of Resistance in *Asparagus* spp. to *Fusarium* Crow and Root Rot. Plant Disease **72**, 334-337

Weber Z, KostECKI M, von BARGEN S, Goßmann M, Waskiewicz A, Bocianowski J, Knaflewski M, Büttner C, Golinski P (2006) *Fusarium* Species Colonizing Spears and Forming Mycotoxins in Field Samples of *Asparagus* from Germany and Poland. Journal of Phytopathology **154**, 209-216

### **Autoren:**

Alexandra SCHOLZ, Dr. Susanne VON BARGEN, Dr. Monika GOßMANN, Prof. Dr. Carmen BÜTTNER, Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55-57, 14195 Berlin; Dr. F. HENNIG, Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e. V., Kühnhäuser Str. 101, 99189 Kühnhausen.

## **Studie über das weltweite Vorkommen von Mykotoxinen in DDGS Proben**

### *Survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in DDGS samples*

KARIN GRIESSLER & URSULA HOFSTETTER

#### **Summary**

Due to rising prices for feedstuffs and feeds, the inclusion of DDGS – dried distillers grains with solubles, a by-product from the bioethanol production – as an economical source of energy and proteins in animal diets has increased over the last few years. However, it should be considered that the fermentation process during bioethanol production cannot destroy mycotoxins. Therefore these toxins concentrate in DDGS and the quality of DDGS depends highly on the raw materials used. BIOMIN GmbH initiated and sponsored a survey about the occurrence of mycotoxins in DDGS. 293 samples from all over the world were analyzed for the most important mycotoxins in animal husbandry. 97% of DDGS samples tested positive for at least one mycotoxin. 91% of these samples showed simultaneous contamination with two or more mycotoxins.

**Keywords:** Mycotoxins, DDGS, contamination

#### **Zusammenfassung**

Aufgrund wachsender Rohstoff- und Futtermittelpreise stieg die Verwendung von Trockenschlempe (DDGS – dried distillers grains with solubles, ein Nebenprodukt der Bioethanolerzeugung) als preiswerter Energie- und Proteinlieferant in den letzten Jahren an. Jedoch sollte bedacht werden, dass der zur Herstellung von Trockenschlempe durchgeführte Fermentationsprozess Mykotoxine nicht zerstören kann. Deshalb ist die Qualität dieses Nebenproduktes sehr stark vom verwendeten Rohmaterial abhängig. BIOMIN GmbH veranlasste und finanzierte eine Studie über das Vorkommen von Mykotoxinen in Trockenschlempe. 293 Proben wurden auf die aus der Sicht der Viehwirtschaft wichtigsten Mykotoxine analysiert. 97% aller Trockenschlempe-Proben wurden auf mindestens ein Mykotoxin positiv getestet. 91% dieser Proben waren mit zwei oder mehreren unterschiedlichen Mykotoxinen kontaminiert.

**Schlüsselwörter:** Mykotoxine, Trockenschlempe, Kontamination

#### **Einleitung**

Wachsende Rohstoff- und Futtermittelpreise haben die Nachfrage an preisgünstigen, energie- und proteinreichen Alternativen für Futtermittel verstärkt. Trockenschlempe (DDGS – dried distillers

grains with solubles) ist ein Nebenerzeugnis der Bioethanolproduktion und wird aufgrund des hohen Proteingehalts als Alternative zu Mais oder Sojabohnenmehl gehandelt. Allerdings hängt die Qualität dieses Nebenerzeugnisses sehr stark vom verwendeten Rohmaterial ab. Mykotoxine sind giftige Sekundärmetaboliten, die hauptsächlich von *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.* und *Aspergillus sp.* gebildet werden. Die Kontamination von Getreide mit Mykotoxinen stellt ein ernstzunehmendes Problem in der Landwirtschaft dar. Da Mykotoxine sehr stabil sind, werden sie auch während des Fermentationsprozesses der Bioethanolproduktion nicht zerstört und konzentrieren sich in der Trockenschlempe, wobei der Gehalt im Endprodukt um bis zu 3 Mal höher sein kann als im ursprünglichen Getreide.

Um die Mykotoxinproblematik in Trockenschlempe aufzuzeigen, veranlasste BIOMIN GmbH eine Studie über das weltweite Vorkommen von Mykotoxinen in DDGS-Proben sowie die Höhe der Kontaminationen.

### **Material und Methoden**

Die Studie wurde mit 293 DDGS Proben aus Amerika (180), Asien (103), Europa und Afrika (10) durchgeführt. Diese wurden auf die aus der Sicht der Agrarwirtschaft wichtigsten Mykotoxine getestet: Aflatoxin B<sub>1</sub> (AfB<sub>1</sub>), Zearalenon (ZON), Deoxynivalenol (DON), T-2 Toxin (T-2) und Fumonisine (FUM). AfB<sub>1</sub>, ZON und FUM wurden mittels HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) und DON und T-2 mittels TLC (Dünnschichtchromatographie) analysiert. Für die Mykotoxinanalysen galten folgende Nachweisgrenzen: AfB<sub>1</sub> <0,5 µg/kg; ZON <10 µg/kg; DON <150 µg/kg; T-2 toxin <30 µg/kg und FUM <25 µg/kg.

### **Ergebnis**

Ein Gesamtüberblick über die Ergebnisse der Mykotoxinanalysen ist in Tabelle 1 dargestellt. Der prozentuale Anteil mit bestimmten Mykotoxinen kontaminierter DDGS-Proben stellte sich folgendermaßen dar: AfB<sub>1</sub> (20%), ZON (83%), DON (70%), FUM (90%) und T-2 (10%). Die durchschnittliche AfB<sub>1</sub>-Kontamination war mit 1 µg/kg eher gering. Im Gegensatz dazu war die Belastung mit Fusarientoxinen wie ZON, DON und FUM sehr hoch. Es wurde eine mittlere Kontamination von 163 µg/kg (ZON), 1239 µg/kg (DON) und 1053 µg/kg (FUM) analysiert. Darüber hinaus waren 91 % aller getesteten DDGS-Proben mit 2 oder mehreren Mykotoxinen kontaminiert. Das Vorkommen von verschiedenen Mykotoxinen in einer Probe ist von großer Wichtigkeit, da sich die toxischen Effekte der einzelnen Mykotoxinen gegenseitig verstärken können (Synergistischer Effekt). 17% aller Proben waren sogar mit mehr als 4 unterschiedlichen Mykotoxinen belastet (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 1: Ergebnisse der Mykotoxinanalytik**

	<b>AfB<sub>1</sub></b>	<b>ZON</b>	<b>DON</b>	<b>FUM</b>	<b>T-2</b>
<b>Gesamtzahl der Proben</b>	293	293	293	293	293
<b>Nr. positive Proben</b>	57	244	205	264	28
<b>% Positiv</b>	20	83	70	90	10
<b>Mittelwert [µg/kg]</b>	1	163	1239	1053	8
<b>Maximum [µg/kg]</b>	89	8107	13920	9042	226

**Tabelle 2: Vorkommen von mehreren unterschiedlichen Mykotoxine in einer Probe**

<b>Unterschiedliche Mykotoxine in einer Probe</b>	<b>Prozent [%]</b>
<b>Keine Kontamination</b>	3
<b>1</b>	6
<b>2</b>	26
<b>3</b>	48
<b>≥ 4</b>	17

### **Diskussion**

97% aller analysierten DDGS-Proben waren mit mindestens einem Mykotoxin kontaminiert und 91% enthielten zwei oder mehrere unterschiedliche Mykotoxine. Die am häufigsten vorkommenden Toxine waren die Fusarientoxine mit 83% ZON (Mittelwert 163 µg/kg), 70% DON (Mittelwert 1239 µg/kg) und 90% FUM (Mittelwert 1053 µg/kg). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen deutlich, dass die Kontamination von Trockenschlempe mit Mykotoxinen ein Problem darstellt. Deshalb ist die Mykotoxinkontrolle in Trockenschlempe-Proben vor dem Zusatz als Tierfutter sehr wichtig, um negative Auswirkungen auf das Tier zu vermeiden.

### **Autoren:**

Karin GRIESSLER, Ursula HOFSTETTER, BIOMIN Holding GmbH, Industriestrasse 21,  
A-3130 Herzogenburg

## Vorkommen von unterschiedlichen Mykotoxinen in Europa

### *Occurrence of various mycotoxins in Europe*

KARIN GRIESSLER & URSULA HOFSTETTER

#### **Summary**

Mycotoxins are secondary metabolites produced by molds under different conditions before or after harvest. These toxins cause a variety of clinical symptoms in animals depending on several factors (health status, nature of the toxin...). A survey about the occurrence of mycotoxin was initiated by BIOMIN GmbH and provides an overview about the occurrence of mycotoxins in Europe in the year 2007 as well as the highest detected levels. From all analyzed samples 69%, 43%, 24%, 29%, 15% and 92% tested positive for contamination with deoxynivalenol, zearalenone, T-2 toxin, ochratoxin A, aflatoxins and fumonisins, respectively. The average contamination of the analyzed samples from Europa was 734.90 µg/kg (deoxynivalenol), 83.50 µg/kg (zearalenone), 58.80 µg/kg (T-2 Toxin), 3.40 µg/kg (ochratoxin A), 15 µg/kg (aflatoxins) and 1192 µg/kg (fumonisins).

#### **Keywords**

Mycotoxins, Europe, occurrence

#### **Zusammenfassung**

Mykotoxine sind giftige Sekundärmetaboliten, die von Schimmelpilzen unter verschiedenen Bedingungen vor oder nach der Ernte gebildet werden. Abhängig von unterschiedlichen Faktoren (Gesundheitszustand, Art des Mykotoxins...) verursachen Mykotoxine negative Auswirkungen auf das Tier. Eine Studie über das Vorkommen von Mykotoxinen in Europa im Jahr 2007 wurde von BIOMIN GmbH durchgeführt, um einen Überblick über die Verbreitung von Mykotoxinen sowie die vorkommenden Höchstkonzentrationen der unterschiedlichen Toxine aufzuzeigen. Von allen analysierten Proben wurden 69%, 43%, 24%, 29%, 15% bzw. 92% positiv auf Deoxynivalenol, Zearalenon, T-2 Toxin, Ochratoxin A, Aflatoxine bzw. Fumonisine getestet. Die durchschnittlichen Kontaminationen betragen 734,90 µg/kg (Deoxynivalenol), 83,50 µg/kg (Zearalenon), 58,80 µg/kg (T-2 Toxin), 3,40 µg/kg (Ochratoxin A), 15,00 µg/kg (Aflatoxine) und 1192 µg/kg (Fumonisine).

#### **Schlüsselwörter**

Mykotoxine, Europa, Vorkommen

## Einleitung

Mykotoxine sind giftige Sekundärmetaboliten die von Schimmelpilzen unter verschiedenen Bedingungen gebildet werden. Abhängig von Art und Menge des Mykotoxins, Tierart, Geschlecht, Alter, Dauer der Belastung sowie Ernährungs- und Gesundheitszustand des Tieres rufen diese unterschiedliche klinische Symptome hervor. Mykotoxine verursachen großen ökonomischen Schaden auf allen Ebenen der Lebens- und Futtermittelproduktion. Trotz „guter landwirtschaftlicher Praxis“ (GAP = good agricultural practice) können Kontaminationen mit Mykotoxinen im Futter nicht vermieden werden.

Die folgende Studie wurde von BIOMIN GmbH durchgeführt und stellt einen Überblick über das Vorkommen von Mykotoxinen in unterschiedlichen landwirtschaftlichen Erzeugnissen in Europa im Jahr 2007 dar.

## Material und Methoden

Insgesamt wurden 572 Getreide- oder Fertigfutterproben, hauptsächlich aus Österreich, Deutschland, Italien, Griechenland und Spanien auf Mykotoxine analysiert. Die Analysen wurden mittels HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) oder ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) durchgeführt. Alle Proben wurden von QUANTAS Analytik GmbH analysiert.

Für die Mykotoxinanalysen galten folgende Nachweisgrenzen: Deoxynivalenol 50 µg/kg (HPLC) bzw. 250 µg/kg (ELISA), Zearalenone 10 µg/kg (HPLC) bzw. 40 µg/kg (ELISA), T-2 Toxin 30 µg/kg (HPLC) bzw. 75 µg/kg (ELISA), Ochratoxin A 1 µg/kg (HPLC) bzw. 2 µg/kg (ELISA), Aflatoxine 1 µg/kg und Fumonisine 25 µg/kg (HPLC) bzw. 250 µg/kg (ELISA).

## Ergebnisse

Die Ergebnisse der Mykotoxinanalysen sind in Tabelle 1 dargestellt. 69%, 43%, 24%, 29%, 15% bzw. 92% der analysierten Proben waren kontaminiert mit DON, ZON, T-2, OTA, Afla bzw. FUM. Die durchschnittliche Kontamination von OTA und Afla war mit 3,40 µg/kg bzw. 15 µg/kg gering. DON wird von *Fusarium* sp. hauptsächlich am Feld gebildet und verursacht Verdauungsstörungen sowie Leistungsdepressionen im Tier. In einer Probe wurde ein Höchstwert von 16133 µg/kg analysiert. Der Mittelwert über alle analysierten Proben berechnet betrug 735 µg/kg. Im Fall von FUM waren die Proben mit durchschnittlich 1192 µg/kg Toxin kontaminiert, die analysierte Maximalkontamination betrug 7244 µg/kg. Fumonisine verursachen eine Störung des Sphingolipidmetabolismus aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Sphinganin und Sphingosin. Zearalenone greift in verschiedene reproduktive Prozesse ein, indem es die Wirkung des

weiblichen Geschlechtshormons imitiert. 334 Proben wurden auf ZON getestet: Mittelwert der Kontamination betrug 84 µg/kg und der Höchstwert 1428 µg/kg.

**Tabelle 1: Ergebnisse der Mykotoxinanalysen**

	<b>DON</b>	<b>ZON</b>	<b>T-2</b>	<b>OTA</b>	<b>Afla</b>	<b>FUM</b>
<b>Gesamtanzahl der Proben</b>	514	334	37	17	79	37
<b>Nr. positive Proben</b>	353	142	9	5	12	34
<b>% Positive</b>	69	43	24	29	15	92
<b>Maximum [µg/kg]</b>	16133	1428	137	7	61	7244
<b>Mittelwert [µg/kg]</b>	734,90	83,50	58,80	3,40	15	1192
<b>Median [µg/kg]</b>	361	42	40	2,50	8,30	584

### **Diskussion**

Trotz Präventionsmaßnahmen ist es nicht möglich, die Kontamination von Getreide mit Mykotoxinen vollständig zu verhindern. Wie die Ergebnisse der durchgeführten Studie über das Vorkommen von Mykotoxinen zeigten, ist das Risiko einer Kontamination mit Mykotoxinen allgegenwärtig. In den getesteten Proben wurde die Verbreitung der Mykotoxinen folgendermaßen festgestellt: 69% DON, 43% ZON, 24% T-2, 29% OTA, 15% Afla und 92% FUM. Die Kontamination der getesteten Proben variierten von einem Mykotoingehalt unter dem Detektionslimit bis hin zu einem maximalen Wert von 16133 µg/kg im Falle von DON. Die durchschnittlichen Kontaminationen betragen von 3,40 µg/kg (OTA) bis zu 1192 µg/kg (FUM). Obwohl die durchschnittlichen Mykotoxinwerte oft nicht so hoch waren, sind die analysierten maximalen Kontaminationswerte in einigen Proben sehr beunruhigend. Man sollte immer die möglichen Auswirkungen im Tier bedenken, die eine so hohe Mykotoxinkontamination zur Folge haben kann.

### **Autoren:**

Karin GRIESSLER, Ursula HOFSTETTER, BIOMIN Holding GmbH, Industriestrasse 21,  
A-3130 Herzogenburg

# Entwicklung von semi-quantitativen immunodiagnostischen Schnelltests für den Nachweis von Mykotoxinen in Weizen und Mais

*Development of semi-quantitative immunodiagnostic strip tests for the determination of mycotoxins in wheat and maize*

ALEXANDRA MOLINELLI, BARBARA CVAK & RUDOLF KRŠKA

## Zusammenfassung

Immunodiagnostische Schnelltests, so genannte Lateral Flow Devices (LFDs), wurden für den semi-quantitativen Nachweis von Mykotoxinen in Weizen und Mais entwickelt. Monoklonale Anti-Mykotoxin-Antikörper wurden an kolloidale Goldpartikel (40 nm im Durchmesser) gekoppelt und im kompetitiven Testsystem eingesetzt. Die zu analysierenden Getreideproben wurden für drei Minuten extrahiert und der Extrakt direkt ohne weitere Aufarbeitung verwendet. Die Intensitäten der sich aus dem Test ergebenden farbigen Testlinien wurden anschließend mittels reflexionsphotometrischer Messung ausgewertet. Die ersten Ergebnisse zeigten stabile und sensitive Testsysteme für FB-Fumonisine (FUMs) in Mais und Zearalenon (ZON) in Weizen.

**Schlüsselwörter:** Mykotoxine, FB-Fumonisine, Zearalenon, Weizen, Mais, Schnelltests, Streifentests, LFDs, Immunodiagnostik, Screening

## Summary

Semi-quantitative lateral flow devices (LFDs) were developed for rapid on-site screening of cereal commodities such as wheat and maize for the determination of the presence of mycotoxins. Monoclonal anti-mycotoxin antibodies coupled to colloidal gold (40 nm I.D.) were used as selective color reagent in a competitive assay format. Since no clean-up steps were necessary, the strip tests allowed a fast determination of selected mycotoxins with the raw extract being directly used after extraction, shaking for 3 min. By using a reflectance photometric reader the intensity of the resultant test line of the LFDs could be measured. First results showed robust and sensitive test systems for FB-Fumoninsins (FUMs) in maize and zearalenone (ZON) in wheat.

**Key words:** Mycotoxins, FB-Fumoninsins, Zearalenone, Wheat, Maize, Strip tests, LFDs, Immunodiagnosics, Screening

## Einleitung

Mykotoxine zählen zu den wichtigsten natürlichen Kontaminanten von Getreide. Die Belastung durch diese Pilz-Sekundärmetaboliten kann je nach gegebenen Bedingungen wie z.B. Witterung, Insektenbefall und Anfälligkeit stark schwanken.

In den letzten Jahren wurden in vielen Ländern der Welt Richtlinien und Verordnungen mit Grenzwerten für Mykotoxine in Getreide erlassen. Damit sind die höchstzulässigen Mengen von Mykotoxinen in Rohprodukten, Lebens- und Futtermitteln geregelt und müssen kontrolliert und überprüft werden. Aufgrund dieser Entwicklung besteht mehr denn je die Notwendigkeit funktionierender Schnelltests, da eine Vielzahl an Proben untersucht werden müssen und bestehende analytische Methoden im Labor oft langwierig und kostenintensiv sind. Neben chromatographischen und massenspektrometrischen Multimethoden zur Quantifizierung, Identifizierung und Charakterisierung von Mykotoxinen werden vermehrt Immunoassays für den Nachweis eingesetzt. Eine weitere Entwicklung auf immunologischer Basis stellen schnelle, leicht handhabbare Streifentests dar, so genannte Lateral Flow Devices (LFDs).

Diese Streifentests können direkt vor Ort eingesetzt werden und sind durch die Möglichkeit der semi-quantitativen Bestimmung eine gute Alternative, um Kontaminationen von Getreide festzustellen.

Da im Rahmen dieser Arbeit Schnelltests für FB-Fumonisine und Zearalenon in Weizen und Mais entwickelt wurden, werden diese beiden Toxine noch im Näheren beschrieben:

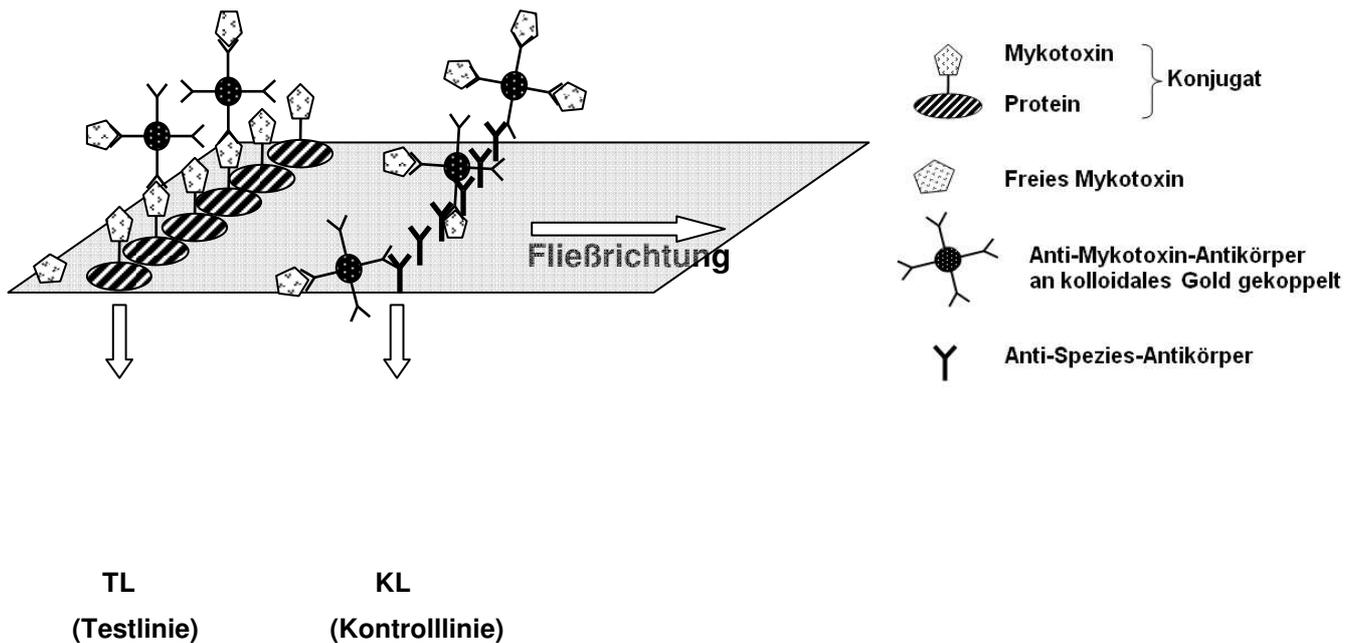
Fumonisine, mit dem am häufigsten vorkommenden Vertreter Fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), werden als sekundäre Stoffwechselprodukte von verschiedenen *Fusarium*-Arten - vor allem *Fusarium verticillioides* und *F. proliferatum* - gebildet. Diese Toxine, welche in erster Linie in Mais und Maisprodukten vorkommen, stellen ein gravierendes Risiko für die menschliche und vor allem tierische Gesundheit dar. Fumonisine bewirken eine Hemmung des Sphingolipidstoffwechsels [2] wodurch es zu einer Schädigung der Nervenzellen und Myelinscheiden kommt. Weiters verfügen diese über eine immunsuppressive Wirkung und vor allem die FB<sub>1</sub> Fumonisine besitzen oft hepatotoxische wie auch nephrotoxische Wirkung. Pferde zeigen zudem starke zentralnervöse Störungen und können an der tödlichen Leukoencephalomalazie erkranken.

Zearalenon ist ein nicht steroides Mykotoxin, welches ebenfalls von Fusarien gebildet werden kann. Im Vergleich zu anderen Mykotoxinen ist es nicht akut toxisch, hat jedoch eine östrogene Wirkung, wodurch es bei Frauen und weiblichen Tieren, insbesondere Schweinen, Einfluss auf die Fruchtbarkeit haben kann. Infolge der von diesen Pilzen hervorgerufenen Krankheiten von wichtigen Kulturpflanzen, wie z.B. Ährenfusariose von Weizen und Kolbenfäule von Mais, kann es zur Kontamination von Lebensmitteln und Futtermitteln mit gesundheitsrelevanten Mengen des Mykotoxins kommen. [3]

## Testprinzip

Monoklonale anti-Mykotoxin Antikörper (mAk) werden an kolloidale Goldpartikel (AuC) mit 40 nm Durchmesser gekoppelt (Goldkolloid-Antikörper Konjugat) und in Form eines kompetitiven Testsystems eingesetzt (siehe Abb. 1).

Für die Teststreifen werden auf eine Nitrozellulose-Membran (Whatman, 2,5 cm x 30 cm) als Testlinie ein Protein-Mykotoxin Konjugat und als Kontroll-Linie ein anti-Spezies Antikörper, jeweils mit 0,5 µL/cm, aufgetragen. Nach dem Aufsprühen der Reagenzien wird die Membran mit dem Protein BSA (Bovines Serum Albumin) geblockt, um eventuelle, während der Testdurchführung auftretende, unspezifische Bindungen an diese zu verhindern.



## Durchführung

Zur Durchführung der Tests werden 10 g Probe mit Methanol:Wasser (70:30, v/v) im Verhältnis 1:4 bzw. 1:5 durch drei minütiges Schütteln extrahiert. Der Extrakt wird mit 0,05 M PBS Puffer weiter verdünnt und direkt für den Test verwendet, wobei 50 µL Probenextrakt mit 50 µL Goldmix (Goldkolloid-Antikörper Konjugat + Puffer) vermischt werden. Das Probenfeld des Teststreifens wird anschließend für drei Minuten in diese Lösung getaucht. Freie, d.h. nicht mit Toxin aus der Probe beladene, Goldkolloid-Antikörper Konjugate binden spezifisch an die immobilisierten Protein-Mykotoxin Konjugate (Testlinie). Das Goldkonjugat wird auch unspezifisch durch die immobilisierten anti-Spezies Antikörper (Kontrolllinie) gebunden. Die Kontrolllinie eines LFDs muss nach der Durchführung des Tests immer sichtbar sein, da sonst die Richtigkeit des Tests nicht gewährleistet werden kann. Der Teststreifen wird danach für eine Minute unter Heißluft getrocknet (XDryer, Romer Labs) und anschließend die Intensität der Färbung der Testlinie mit einem Reflexionsphotometer (XReader, Romer Labs) semi-quantitativ ausgewertet.

## Ergebnisse und Diskussion

### Fumonisine

Der entwickelte Streifentest für FB-Fumonisine ( $FB_1+FB_2+FB_3$ ) zeigt keine Kreuzreaktivität zu ZON, T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Deoxynivalenol (DON), 15-ac-DON, 3-ac-DON und Nivalenol (NIV).

Mais-Referenzmaterial für Fumonisine (Biopure) und natürlich kontaminierte Mais Proben wurden zur Erstellung von Kalibrationen und Methodvalidierung verwendet, wobei LC-MS-MS als Referenzmethode herangezogen wurde [4].

Lineare als auch nicht-lineare Kalibrationskurven konnten für die (semi-)quantitative Auswertung erstellt werden (siehe Abb. 2 und Abb. 3).

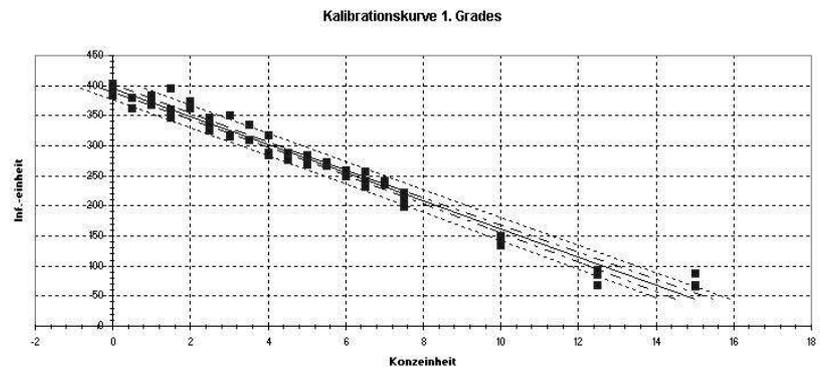


Abb. 2: Lineare Kalibration für FB-Fumonisine in Maisextrakt

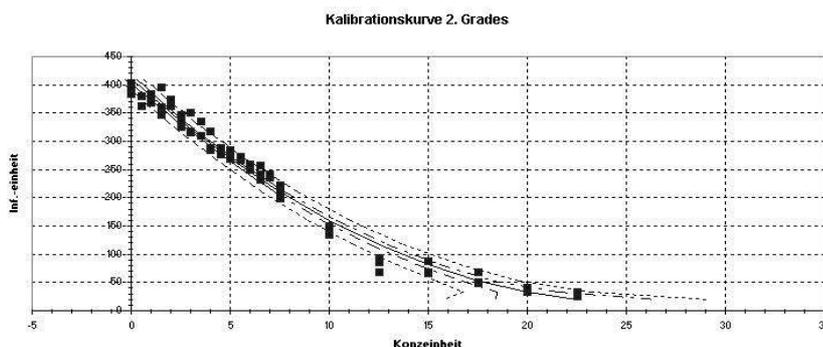


Abb. 3: Nicht-Lineare Kalibration für FB-Fumonisine in Maisextrakt

Mit dem entwickelten Streifentest kann durch Verwendung einer z. B. linearen Kalibrationskurve ein Messbereich von 400-1200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Gesamt-Fumonisine abgedeckt werden. Dieser kann durch weitere Verdünnungsschritte des Probenextraktes auf 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Gesamt-Fumonisine erweitert werden.

### Zearalenon

Nach der Extraktion von mit ZON unbelastetem Weizen wurde die Blindprobe mit einem Zearalenon-Standard bekannter Konzentration versetzt und in geeigneten Schritten verdünnt, um ZON-Standardlösungen im Konzentrationsbereich 0-800  $\mu\text{g}$  ZON/L zu erhalten. (Testlinie, TL; Kontrolllinie, KL)

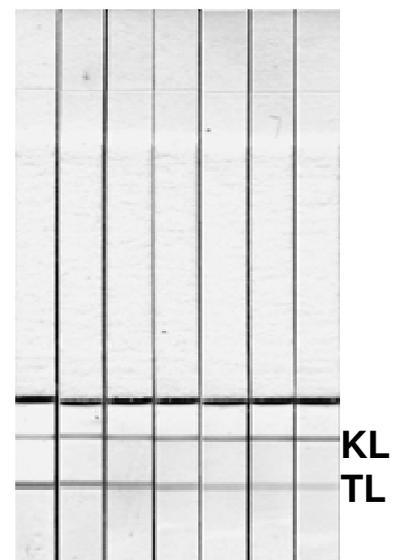
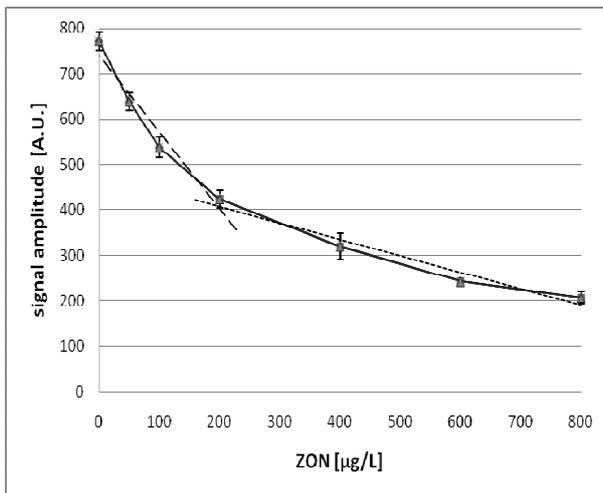


Abb. 4: ZON-Standardreihe



Die Intensität der Testlinie ist aufgrund des kompetitiven Testsystems indirekt proportional zur Toxin-Konzentration in der Probe, was sich in Abbildung 4 gut erkennen lässt.

Die sich daraus ergebende Kalibrationskurve ist in Abb. 5 dargestellt. Für die semi-quantitative Bestimmung von ZON in Weizen wurde als linearer Arbeitsbereich 0-200 µg ZON/L Extraktionslösung festgelegt.

**Abb. 5: ZON-Kalibration**

### Danksagung

Die Autoren bedanken sich beim Land Niederösterreich, der Christian Doppler Gesellschaft und Romer Labs Diagnostics für die finanzielle Unterstützung.

### Literatur

- [1] Krska R., Welzig E., Berthiller F., Molinelli A., Mizaikoff B. (2005) Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance. *Food Addit Contam*, 22(4), 345-353.
- [2] Riley, R.T., Voss, K.A., Norred, W.P., Sharma, R.P., Wang, E., Merrill Jr., A.H. (1998) Fumonisin: mechanisms of mycotoxicity. *Revue Méd. Vét.* 149, 617-626.
- [3] Werner, U., Adam, G., Hauser, M.-T. (2003) Molecular analysis of the mycotoxin Zearalenone effects on the model plant *Arabidopsis thaliana*, Joint Annual Meeting of the ÖGBM, ÖGGGT, ÖGBT and ANGT, 21-24.9.2003, Graz, 41, Graz .
- [4] Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R., Schuhmacher, R. (2006) Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 2649-2659.

### Autoren:

Dr. Alexandra MOLINELLI, DI Barbara CVAK, Univ. Prof. Dr. Rudolf KRŠKA, Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung, Analytikzentrum, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie, IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Straße 20, 3430 Tulln

## Detektion maskierter *Fusarium* Mykotoxine in getreidebasierten Lebensmitteln

O. VENDL, F. BERTHILLER, C. CREWS, R. SCHUHMACHER, G. ADAM & R. KRŠKA

### Summary:

The mycotoxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) are produced by several species of the fungal grain-pathogen *Fusarium*. Strategies for their analytical detection are well known and documented, however, these two compounds have been found to be chemically altered (i.e. masked) as a part of the host plant's (but also the pathogen's) metabolism, thus forming derivatives that would escape analysis targeted at DON and ZON. The toxicity of these derivatives is yet assumed to be similar as that of their precursors DON and ZON. This report presents a project aimed at developing a procedure for the extraction, cleanup and LC-MS determination of 8 masked *Fusarium* mycotoxins alongside with DON and ZON, in cereal-based food. This project is funded by the UK Food Standard Agency (FSA) and will be accomplished in a collaboration between IFA-Tulln (Tulln, Austria) and Central Science Laboratory (CSL, York, UK).

**Keywords:** masked mycotoxins, *Fusarium*, deoxynivalenol, zearalenone

### Zusammenfassung:

Die Mykotoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) werden von Vertretern der getreidepathogenen Pilzgattung *Fusarium* produziert. Chemisch-analytische Strategien zur Analyse dieser zwei Substanzen sind hinlänglich bekannt. Diese beiden Verbindungen können von der Wirtspflanze (aber zum Teil auch vom Pilz selbst) metabolisiert werden, wodurch chemisch veränderte Verbindungen entstehen, die im Rahmen der Routineanalytik zur Detektion von DON oder ZON nicht erfasst werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Toxizität dieser Derivate derer der Vorläufersubstanzen DON bzw. ZON entspricht. Dieser Artikel präsentiert ein von der britischen Food Standard Agency (FSA) finanziertes Gemeinschaftsprojekt von IFA-Tulln (Tulln, Oesterreich) und Central Science Laboratory (CSL York, GB), mit dem Ziel der Methodenentwicklung zur Extraktion, Aufreinigung und LC-MS Detektion von 8 maskierten *Fusarium* Toxinen, sowie von DON und ZON, in getreidebasierten Lebensmitteln.

**Schlüsselwörter:** Maskierte Mykotoxine, *Fusarium*, Deoxynivalenol, Zearalenon

### Einleitung:

*Fusarien*, z.B. *Fusarium graminearum*, sind getreidebefallende Pilze aus der taxonomischen Abteilung der Ascomycota und produzieren im Rahmen ihres Sekundärstoffwechsels eine Reihe von humantoxischen Substanzen (Mykotoxinen). Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) sind hinlänglich bekannte Mykotoxine, die nach *Fusarium*-Befall im geernteten Getreide verbleiben

und nach der Weiterverarbeitung zu Lebensmitteln ein Gesundheitsrisiko für Menschen darstellen. Methoden zur Bestimmung dieser Verbindungen sind bereits in routineanalytischen Verfahren etabliert und Grenzwerte für DON und ZON Gehalte in Lebens- und Futtermitteln sind in Richtlinien der Europäischen Kommission festgelegt (European Commission Regulation 1126/2007). Befallene Wirtspflanzen metabolisieren jedoch zum Teil sowohl DON als auch ZON, insbesondere durch Anbindung polarer Gruppen. Dies stellt einen Entgiftungsmechanismus dar, denn durch die Metabolisierung werden diese Verbindungen polarer und können leichter im wässrigen Milieu abtransportiert bzw. in der Zell-vakuole eingelagert und so vom Primärstoffwechsel ferngehalten werden (Engelhardt et al., 1999; Poppenberger et al., 2003). Andere Metabolite wiederum, wie etwa ZON-4-Sulfat (Z4S) werden von *Fusarium* selbst gebildet (Plasencia und Mirocha, 1991). Die derart entstehenden Derivate werden in routineanalytischen Messungen zur Detektion von DON und ZON nicht erfasst. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass sie im Falle der Nahrungsaufnahme im menschlichen Verdauungstrakt gespalten werden (z.B. durch Glykosylasen), wodurch das ursprüngliche Toxin wieder freigesetzt wird (Ioannides, 2002). Im speziellen Fall von ZON-4-Glukosid (Z4G) ist dieser Effekt im Rahmen eines Fütterungsversuchs bei Schweinen belegt (Gareis et al., 1990).

Um ein höheres Maß an Zuverlässigkeit in der Überprüfung der Mykotoxinbelastung in Getreide und daraus hergestellten Lebensmitteln zu gewährleisten, wird ein Verfahren entwickelt, das eine sichere Bestimmung von DON und ZON, als auch von 8 verbreiteten Metaboliten innerhalb einer LC-MS Untersuchung ermöglicht. Bei den hier untersuchten Metaboliten handelt es sich um DON-3- $\beta$ -D-Glukopyranosid (D3G), 3-Acetyl-DON (ac-DON), ZON-4- $\beta$ -D-Glukopyranosid (Z4G),  $\alpha$ -Zearalenol ( $\alpha$ -ZOL),  $\beta$ -Zearalenol ( $\beta$ -ZOL),  $\alpha$ -ZOL-4- $\beta$ -D-Glukopyranosid ( $\alpha$ -ZG),  $\beta$ -ZOL-4- $\beta$ -D-Glukosid ( $\beta$ -ZG), sowie ZON-4-Sulfat (Z4S), die von unserer Arbeitsgruppe isoliert worden waren (Berthiller et al., 2005; Krenn et al., 2007) und als Standards zur Etablierung und Optimierung geeigneter LC-MS/MS Methoden zur Verfügung stehen.

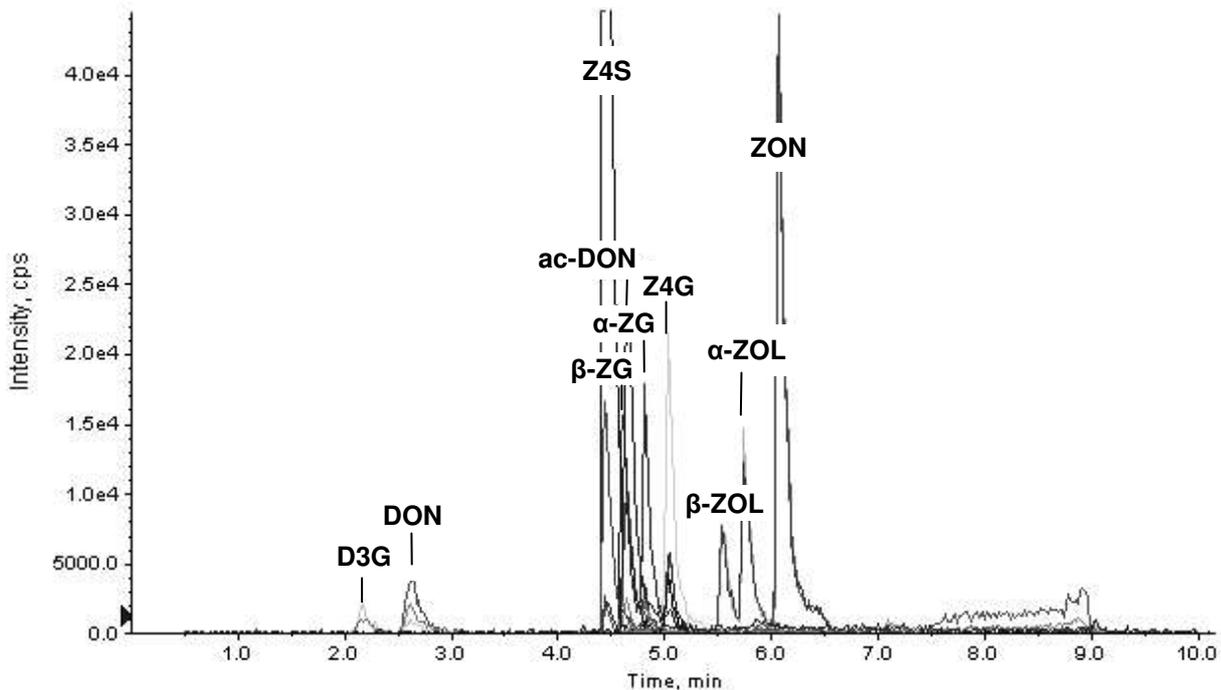
### **LC-MS/MS Bedingungen:**

Die HPLC Trennung der untersuchten Verbindungen erfolgte mit einer C18-Säule (Phenomenex Synergi 150 x 3 mm; 4  $\mu$ m), unter Verwendung eines linearen Laufmittelgradienten von 10 % Acetonitril auf 96 % Acetonitril (Flussrate: 1 ml/min; Laufmittel enthielten 5 mM Ammonacetat). Das Injektionsvolumen der Messlösung betrug 5  $\mu$ l, die Säulentemperatur wurde mit 35 °C festgesetzt. Die Detektion der Analyten erfolgte in einem Tripel-Quadrupol Massenspektrometer (4000 QTrap, Applied Biosystems) mit Elektrospray Ionenquelle (negative Polarität) im SRM (selected reaction monitoring) Modus. Nach entsprechender Optimierung der Parameter wurden zwei Massenübergänge pro Analyt bestimmt (siehe Tabelle 1). Abbildung 1 zeigt ein Chromatogramm mit MRM Spektren aller zehn Analyten.

Tabelle 1. MRM Massenübergänge von DON und ZON Metaboliten.

\* Kollisionsenergie

Abbildung 1. MRM Spektren von DON und ZON Metaboliten.



### Ausblick

#### Extraktion

Im weiteren Verlauf des Projekts wird zunächst die Extraktion der Ziel-Analyten aus Matrixproben optimiert.

Analyt	Precursor Ion	Quantifier [m/z]	Qualifier [m/z]
Deoxynivalenol (DON)	355.1 [M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup>	265.0 (22 eV)*	59.1 (38 eV)
Acetyl-DON (acDON)	397.1 [M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup>	59.0 (32 eV)	336.9 (12 eV)
DON-3-Glukosid (D3G)	517.2 [M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup>	457.2 (20 eV)	427.0 (28 eV)
Zearalenon (ZON)	317.1 [M-H] <sup>-</sup>	131.0 (42 eV)	175.0 (34 eV)
ZON-4-Glukosid (Z4G)	479.2 [M-H] <sup>-</sup>	317.0 (24 eV)	174.9 (52 eV)
ZON-4-Sulfat (Z4S)	397.1 [M-H] <sup>-</sup>	317.1 (34 eV)	131.1 (56 eV)
α-Zearalenol (α-ZOL)	319.2 [M-H] <sup>-</sup>	159.9 (42 eV)	129.9 (46 eV)
β-Zearalenol (β-ZOL)	319.2 [M-H] <sup>-</sup>	159.9 (42 eV)	129.9 (46 eV)
α-ZOL-Glukosid	481.2 [M-H] <sup>-</sup>	319.1 (20 eV)	130.0 (70 eV)
β-ZOL-Glukosid	481.2 [M-H] <sup>-</sup>	319.1 (20 eV)	130.0 (70 eV)

Um die Wiederfindung in Matrix bzw. die Extraktionseffizienz jeder einzelnen Verbindung zu untersuchen, werden verschiedene nicht kontaminierte Lebensmittel auf Getreidebasis (Brot, Mehl, Bier) mit definierten Konzentrationen an Mykotoxinstandards versetzt (=spiking) und aus der Probenmatrix extrahiert. Die Extrakte werden schließlich mit dem bereits entwickelten SRM Verfahren auf die Wiederfindungsrate der Analyten untersucht.

Besonderes Augenmerk wird in dieser Phase des Projekts nicht nur auf die optimale Zusammensetzung des Extraktionsmittels gelegt werden, sondern auch auf eine mögliche Verbesserung der Ausbeute durch Vorbehandlung der Matrixproben mit Enzymen. Der Hintergrund zu diesem Ansatz ist der bei *Fusarium* infiziertem Getreide bereits dokumentierte teilweise Einbau von Mykotoxinmetaboliten in zelluläre Strukturen und Makromoleküle (Zellulose, Proteine), aus denen sie durch enzymatische Spaltung freisetzbar sein sollten. Diese Versuche werden mit natürlich mykotoxinkontaminierten Getreideproben durchgeführt werden.

### **Aufreinigung**

Im Falle von niedriger Wiederfindung bzw. schlechter Quantifizierbarkeit mancher Analyten aus bestimmten Matrices bedingt durch Matrixsuppression oder durch hohes Rauschen des LC-MS Signals im Peakbereich werden einige Möglichkeiten zur Aufreinigung der Proben getestet. Dies beinhaltet die Verwendung von konventionellen C<sub>18</sub>-Festphasenextraktionssäulen (SPE), primären und sekundären Aminensäulen (PSA), sowie speziell für Mykotoxine entwickelte Aufreinigungssäulen (Mycosep®). Darüber hinaus wird bewertet werden, inwieweit sich speziell auf DON und ZON abgestimmte Immunoaffinitätssäulen auch für die entsprechenden Metaboliten eignen. Schließlich wird auch die Verwendung der am Analytikzentrum des IFA-Tulln entwickelten <sup>13</sup>C-Isotopenmarkierten Toxine <sup>13</sup>C-DON und <sup>13</sup>C-ZON als interne Standards für diese spezielle Anwendung getestet (Häubl et al., 2006, 2007).

### **CSL-IFA Kooperation**

Nach erfolgter Etablierung und Validierung eines Protokolls zur Probenaufarbeitung und Mykotoxinbestimmung in Lebensmittelproben wird die Methode an das Central Science Laboratory (CSL) in York, Großbritannien, transferiert, wo nach derzeitiger Planung etwa 100 Lebensmittelproben auf Getreidebasis aus verschiedenen Produktreihen (Brot, Müesli, Teigwaren, Bier etc.) auf mögliche Kontamination mit maskierten Mykotoxinen untersucht werden. Dieses Vorhaben wird von der Food Standard Agency (FSA) finanziert, mit dem Ziel, Konsumenten einen Überblick über die Mykotoxinbelastung von kommerziell erhältlichen Lebensmitteln zu vermitteln. Der Fokus richtet sich hierbei speziell auf in Großbritannien erhältliche Produkte, zu etwa einem Drittel werden aber auch in österreichischen Märkten angebotene Lebensmittel in die Studie einfließen.

### **Danksagung:**

Die Autoren bedanken sich bei der Food Standard Agency (FSA), beim FWF, bei der Christian Doppler Forschungsgesellschaft und beim Land Niederösterreich für die finanzielle Unterstützung.

## Literatur:

Berthiller F, Dall'Asta C, Schuhmacher R, Lemmens M, Adam G, Krska R, 2005. Masked Mycotoxins: Determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 3421-3425.

Engelhardt G., Ruhland M., Wallnöfer PR. (1999). Metabolism of mycotoxins in plants. *Adv. Food Sci.* **21**(3/4), 71-78.

European Commission Regulation 1126/2007 of September 28, 2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels of certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. *Off. J. Europ. Union* **L255**, 14-17.

Gareis M, Bauer J, Thiem J, Plank G, Grabley S, Gedek B, 1990. Cleavage of zearalenone-glycoside, a „masked“ mycotoxin, during digestion in swine. *J. Vet. Med.* **37**, 236-240.

Häubl G, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R, 2006. Suitability of a fully <sup>13</sup>C isotope labeled internal standard for the determination of the mycotoxin deoxynivalenol by LC-MS/MS without clean up. *Anal. Bioanal. Chem.* **384**, 692-696.

Häubl G, Berthiller F, Hametner C, Rechthaler J, Jaunecker G, Freudenschuss M, Krska R, Schuhmacher R, 2007. Characterization of (13C24) T-2 toxin and its use as an internal standard for the quantification of T-2 toxin in cereals with HPLC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 931-940.

Ioannides C, 2002. In: *Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, 1-32.

Krenn P, Berthiller F, Schweiger W, Hametner C, Ludwig R, Adam G, Krska R, Schuhmacher R, 2007. Production zearalenone-4-glucoside, alpha-zearalenol-4-glucoside, beta-zearalenol-4-glucoside. *Mycotoxin Research* **23**, 180-184.

Plasencia J, Mirocha CJ, 1991. Isolation and characterization of zearalenone sulfate. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(1), 146-150.

Poppenberger B, Berthiller F, Lucyshyn D, Sieberer T, Schuhmacher R, Krska R, Kuchler K, Glössl J, Luschnig C, Adam G, 2003. Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **278**, 47905-47914.

## Autoren:

Dr. Oliver VENDL, Dr. Franz BERTHILLER, Ass. Prof. Dr. Rainer SCHUHMACHER, Univ. Prof. Dr. Rudolf KRKA, Analytikzentrum, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad-Lorenz-Straße 20, 3430 Tulln.

Ao. Prof. Dr. Gerhard ADAM, Zentrum für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Universität für Bodenkultur Wien, Muthgasse 18, 1190 Wien.

Colin CREWS, Food Science Group, Central Science Laboratory, York YO41 1LZ, United Kingdom

## GC-Analytik von B-Trichothecenen in Bier

W. BRODACZ & A. DELLA ROSA

### Zusammenfassung

In Anlehnung an die akkreditierte und robuste Routinemethode für B-Trichothecene in Zerealien wurde eine Adaptierung für die Flüssigmatrix Bier vorgenommen. Die Extraktion wurde mit dem Clean up-Verfahren kombiniert, während bewährte und optimierte Module wie die Derivatisierung und die GC-Bestimmung mit zwei Säulen unterschiedlicher Polarität unverändert übernommen wurden. Verglichen mit bisher publizierten GC-Methoden kann die Bestimmungsgrenze als zufrieden stellend bezeichnet werden und die Vorgaben der EU-Verordnung 401/2006 werden erfüllt.

**Schlüsselwörter:** B-Trichothecene, GC-Analytik, Bier, Deoxynivalenol

Die Verwendung von Zerealien bei der Bierherstellung legt die Untersuchung auf Fusarientoxine nahe. Die laufend feststellbaren Belastungen von Gerste und Weizen mit B-Trichothecenen und der Pro-Kopf-Verbrauch von rund 100 l/Jahr machen eine Kontrolle des beliebten Getränks notwendig. Bei Gerste waren meist Deoxynivalenol und Nivalenol, seltener 15-Acetyl-DON nachweisbar. Darüber hinaus muss davon ausgegangen werden, dass beim Mälzen und Maischen weiterhin Toxine produziert werden können. Ziel der Methodenentwicklung war der robuste Nachweis von DON, NIV, 3-Acetyl-DON, 15-Acetyl-DON und Fusarenon X mit Bestimmungsgrenzen unter 10 µg/kg Bier.

### Methodenentwicklung

Im Gegensatz zu Methoden, die auf einer Extraktion durch Flüssig/Flüssig-Verteilung beruhen, wurde in Anlehnung an die bestehende akkreditierte Routinemethode für Zerealien eine direkte Festphasenextraktion (SPE) gewählt. Unter Nutzung des Wasseranteils im Bier wurde daher durch Zugabe von Acetonitril genau jenes Verhältnis (84% CH<sub>3</sub>CN / 16% H<sub>2</sub>O) eingestellt, das für die SPE mit „MycoSep-227 Trich+“ optimal ist (Abb.1).

Dabei findet schon zum Großteil die Entgasung des Bieres statt. Das anschließende Rühren unterstützt die Eliminierung von CO<sub>2</sub> und die Extraktion eventuell an Schwebeteilchen gebundener Zielanalyten bei trüben Produkten wie Zwickel und Weizenbieren. Innerhalb der üblichen Schwankungsbreiten von Wasser und Alkoholgehalt in den diversen Biersorten bleibt die dadurch verursachte Abweichung unter 1%.

Bei der Festphasenextraktion mit den Einweg-Reinigungskartuschen der Fa. Romer Labs (Mischung von Aktivkohle, Silica, Ionenaustauscherharz etc.) eluieren alle Trichothecene, während

der Großteil der Zerealien-Bestandteile zurück gehalten wird. Nach der für B-Trichothecene notwendigen Derivatisierung mit „Tri-Sil TBT“ erfolgt die Messung der silylierten Zielanalyten in bewährter Weise auf zwei GCs mit unterschiedlichen Phasenpolaritäten (Abb.1).

Die B-Trichothecene zeigen aufgrund ihrer charakteristischen Carbonyl-Gruppe in Stellung C-8 im Gegensatz zu anderen organischen (halogenfreien) Verbindungen einen sehr starken Response im Elektron Capture-Detektor (ECD).

Trotz dieses Selektivitätsvorteils muss für eine gute Nachweisempfindlichkeit der Methode entsprechend stark angereichert werden. Insbesondere bei Bieren mit hohen Stammwürzegehalten kommt es dadurch zu Störungen in den Chromatogrammen (Abb.3). Wie bei der Zerealien-Routinemethode muss daher grundsätzlich auf 2 Säulen unterschiedlicher Polarität abgesichert werden. Die Kombination der Polysiloxan-Phasentypen mit 35% bzw. 5% Phenylanteil sind das Ergebnis umfangreicher computergestützter Trennungsoptimierungen. Abbildung 3 zeigt das Beispiel von ECD-Chromatogrammen einer problematischen dunklen „Doppelmalz“-Bierprobe mit einem künstlichen Belastungslevel von ca. je 30 µg/kg.

## **Ergebnisse**

Die wichtigsten Kenndaten der entwickelten GC-Methode sind in Tab. 1 zusammengefasst. Sie stammen aus 16 Rückgewinnungstests und wurden mit den Biertypen Pils, Vollbier glutenfrei, Hefeweizen und Doppelmalz durchgeführt. Der Konzentrationsbereich der Dotierung je Analyse liegt zwischen 28 und 56 µg/kg (aufgrund der erhöhten DON-Grundbelastung aller verfügbaren Weizenbiere mussten diese mit 147 µg/kg deutlich höher gespiked werden).

Wie die Chromatogramme in Abb. 3 zeigen, ist besonders bei extraktreichen Proben die Absicherung auf zwei Säulen notwendig.

Die angeführte Rückgewinnungen und Bestimmungsgrenzen können als zufrieden stellend bezeichnet werden, die Reproduzierbarkeit ist etwas geringer als bei der ursprünglichen Zerealien-Methode.

Alle Kenndaten erfüllen die EU-Verordnung 401/2006 für die amtliche Kontrolle von Mykotoxinen in Lebensmitteln (Gegenüberstellung in Tab. 1).

## **Ausblick**

Zur Absicherung der Ergebnisse mit GC/MS ist eine Methodenentwicklung mit 3 so genannten Identifizierungspunkten und der Verwendung von voll <sup>13</sup>C-markiertem DON als interner Standard in Ausarbeitung. Anschließend ist die Erweiterung des Analytenspektrums um die besonders toxischen A-Trichothecene T-2 Toxin und HT-2 Toxin vorgesehen. Dafür wird eine laborintern bereits etablierte Methode adaptiert, die auf der Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie beruht.

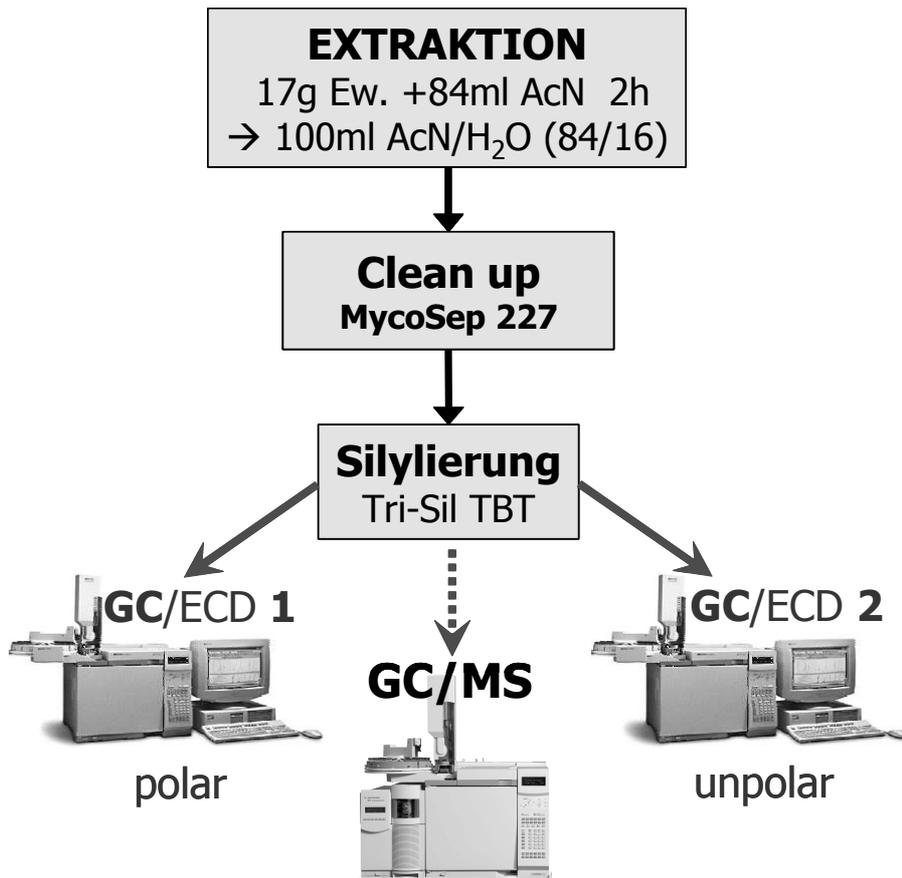


Abb. 1: Methodenschema

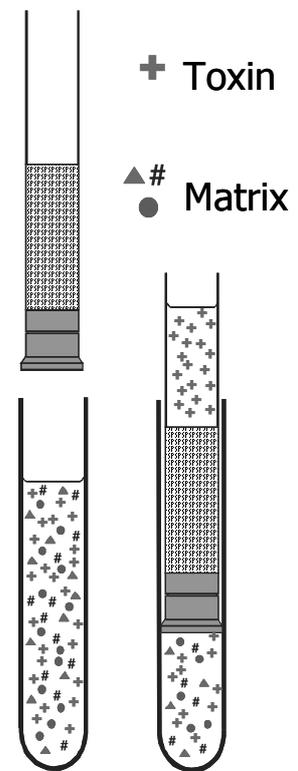


Abb. 2: SPE-Clean up mit MycoSep-227

Tab. 1: Methodenkenndaten AGES vs. EU-Vorgaben (n=16 mit 4 Biertypen)

Zielanalyt	Abk.	Rück- gewinnung	Rec. (EU)	Variations- Koeff. (RSDr)	RSDr (EU)	BG µg/kg	NWG µg/kg
Deoxynivalenol	DON	100%	60 - 120%	12,7%	<= 20 %	7	3,5
Nivalenol	NIV	113%		14,6%		10	5
3-Acetyldeoxynivalenol	3AcDON	92%		11,8%		7	3,5
15-Acetyldeoxynivalenol	15AcDON	100%		12,9%		7	3,5
Fusarenon X	Fus X	99%		17,0%		7	3,5

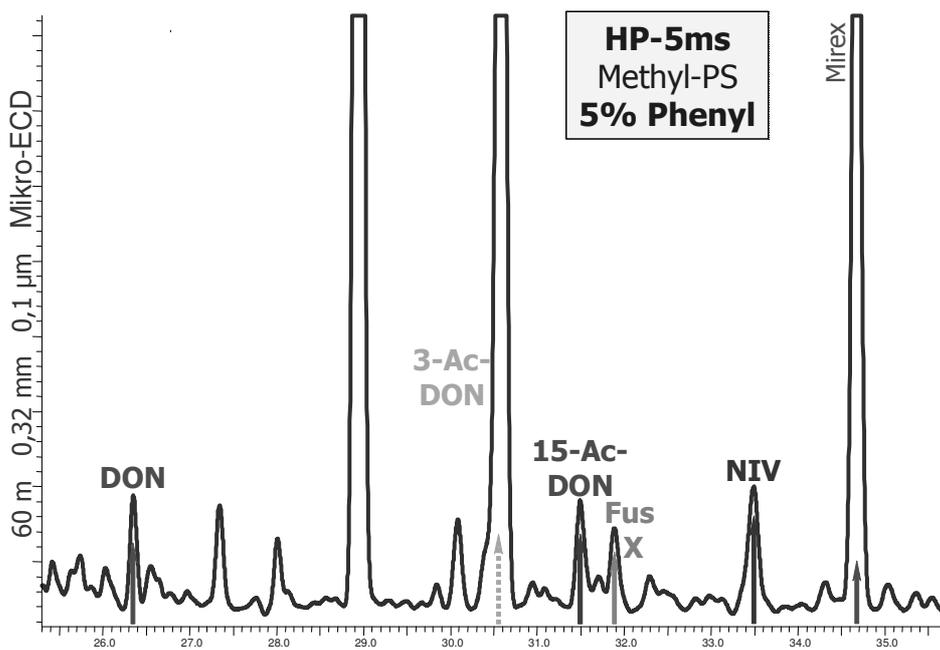
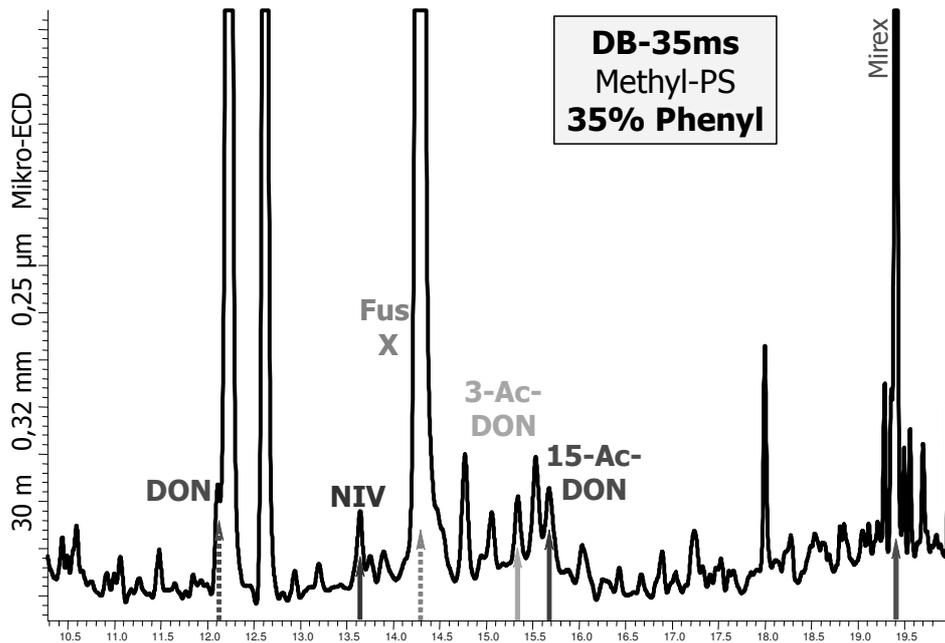


Abb. 3: ECD-Chromatogramme (dunkles Doppelmalz-Bier; je 28 µg/kg)

**Autor:**

Dipl.-HTL-Ing. Wolfgang BRODACZ, AGES Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Kompetenzzentrum "Cluster Chemie Linz", 4020 Linz

# Entwicklung und Validierung einer Methode zur exakten Bestimmung von gesetzlich geregelten Mykotoxinen mittels Isotopenverdünnung-Massenspektrometrie

## - Erste Ergebnisse -

R. KÖPPEN, M. SULYOK, M. KOCH, R. KRŠKA & R. SCHUHMACHER

### Summary:

Mycotoxins can cause significant economic and health problems worldwide. In general, mycotoxins are stable compounds which are not destroyed during most food processing operations and therefore pose a permanent risk for human and animal health. In the field of mycotoxin analysis many different methods have been developed but in most cases only for the determination of individual toxins. Here, a rapid LC-MS/MS method based on stable  $^{13}\text{C}$  labelled internal standards for accurate quantification of 11 of the most important regulated mycotoxins is presented. Some aspects of this proposed new analytical procedure are discussed in detail and first validation results are shown, including linearity, intra- and inter-day repeatability. Based on the results of method validation experiments, we have started to estimate measurement uncertainty using the bottom-up approach, starting with the identification of uncertainty sources using a cause-and-effect diagram.

**Keywords:** mycotoxins, measurement uncertainty, ID-HPLC-MS/MS, foods, validation

### Zusammenfassung:

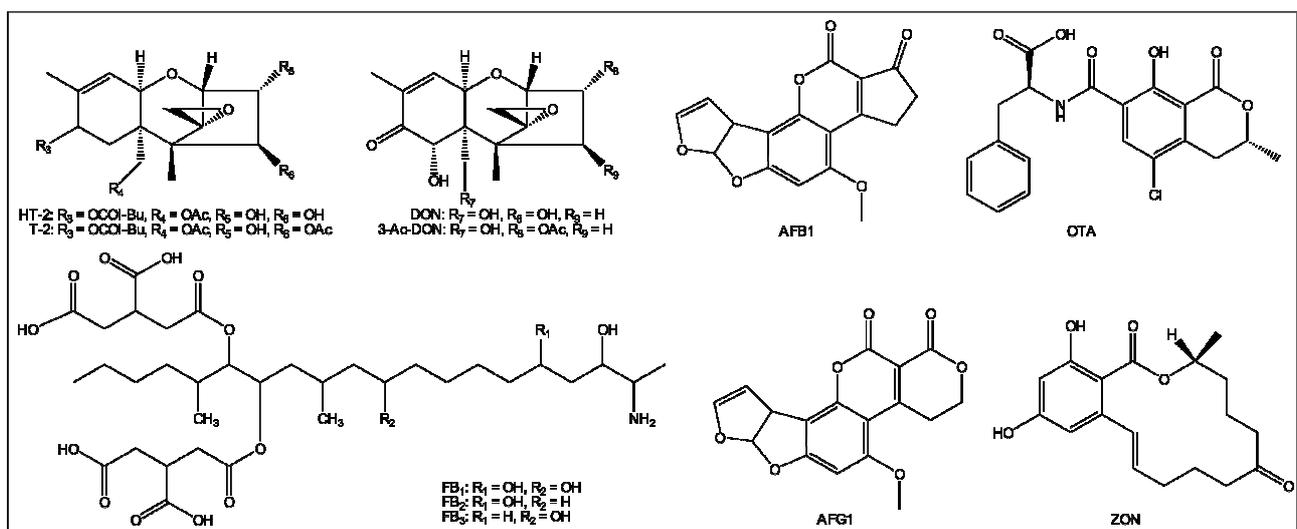
Mykotoxine verursachen weltweit erhebliche ökonomische und gesundheitliche Probleme. Aufgrund ihrer Stabilität überstehen Mykotoxine die meisten Prozesse im Verlauf der Lebensmittelverarbeitung und stellen somit ein permanentes Risiko für Mensch und Tier dar. Im Bereich der Mykotoxinanalytik wurden bis heute eine Vielzahl von Analyseverfahren entwickelt, jedoch handelt es sich hierbei in den meisten Fällen um den Nachweis einzelner Mykotoxine oder Mykotoxingruppen. In dieser Arbeit wird ein schnelles auf LC-MS/MS basierendes Verfahren zur genauen Quantifizierung von 11 wichtigen Mykotoxinen, (größtenteils gesetzliche definierte Grenzwerte) vorgestellt. Einige Aspekte dieses vorgeschlagenen neuen Analyseverfahrens werden im Detail diskutiert und erste Ergebnisse der Validierung, wie die Linearitätsbereiche und die Wiederholstandardabweichungen in und zwischen Serien angegeben. Aufbauend auf der Methodvalidierung wurde damit begonnen, die Gesamtmessunsicherheit des Analyseverfahrens unter Zuhilfenahme des "Bottom-up-Approaches" zu ermitteln, beginnend mit der Identifizierung der Einzelmessunsicherheitsquellen mittels eines Ursache-Wirkungs-Diagrammes.

**Schlüsselwörter:** Mykotoxine, Messunsicherheit, ID-HPLC-MS/MS, Lebensmittel, Validierung

## Einführung:

Mykotoxine sind eine Gruppe strukturell sehr verschiedener, natürlich vorkommender Toxine, die unter für Schimmelpilze günstigen Umweltbedingungen von verschiedenen Pilzgattungen wie z.B. *Aspergillus*, *Penicillium* und *Fusarium* als sekundäre Metaboliten produziert werden. Sie können in einer großen Anzahl von Lebens- und Futtermitteln wie Getreide, Gewürzen, Kaffee und Hülsenfrüchten usw. vorkommen. Der Befall von Agrarprodukten durch die verschiedenen Schimmelpilzspezies kann dabei entweder direkt auf dem Feld sowie während der Verarbeitung, des Transportes und der Lagerung stattfinden.

Bislang sind mehrere hundert Mykotoxine identifiziert worden. Aufgrund ihrer strukturellen Vielfalt weisen sie eine große Bandbreite chemischer und physikochemischer Eigenschaften auf (s. Abb. 1). Neben akut toxischen Eigenschaften sind vor allem zyto-, nephro- und neurotoxische, karzinogene, mutagene, teratogene, immunosuppressive und hormonelle Wirkungen auf Mensch und Tier bekannt<sup>1</sup>. Vergiftungserscheinungen (Mykotoxikosen) können sowohl durch den direkten Verzehr von befallenen Lebens- und Futtermitteln als auch durch den Verzehr von in die Nahrungskette eingetragenen Mykotoxinen („carry over“ Effekt; z.B. Milch, Eier) auftreten. Aufgrund ihrer weiten Verbreitung, der Häufigkeit ihres Auftretens sowie ihrer toxischen Wirkungen stehen insbesondere die grenzwertrelevanten Aflatoxine, Ochratoxine, Fumonisine, Trichothecene und Zearalenon im Fokus der Forschung.



**Abbildung 1:** Chemische Strukturen der untersuchten Mykotoxine

In den letzten Jahren haben sich in der EU die regulatorischen und wissenschaftlichen Aktivitäten deutlich intensiviert und es wurden Netzwerke wie die EFSA (European Food Safety Authority) oder das „Rapid Alert System for Food and Feed“ aufgebaut. Diese Entwicklung führt auch immer stärker zur Harmonisierung von Grenzwerten innerhalb der EU. Bislang existieren für etwa 50 Mykotoxin/Matrix-Kombinationen, darunter insbesondere für die o.g. Substanzgruppen EU-Grenzwerte<sup>2,3</sup>.

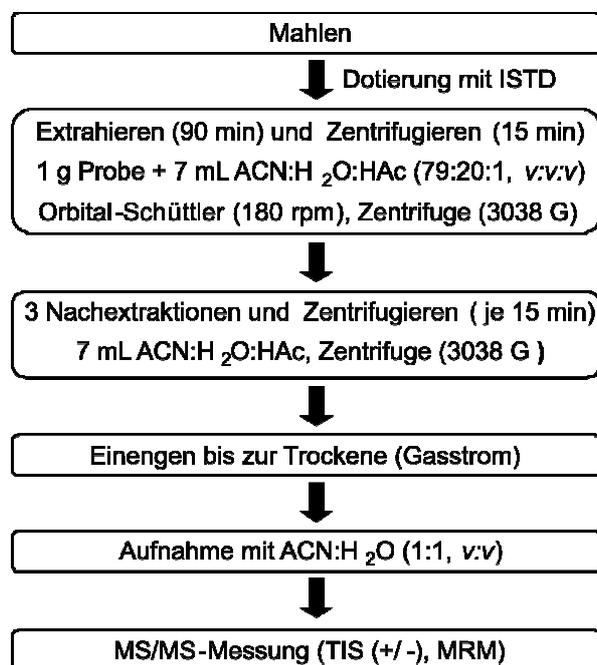
Die Multimykotoxin-Analytik weist gegenüber der etablierten Einzeltoxin-Analytik den wesentlichen Vorteil einer parallelen Quantifizierung für eine Vielzahl von Mykotoxin-Analyten bei gleichzeitiger Verfahrensvereinfachung auf. Durch diese Einsparung an Zeit- und Personalressourcen ist eine enorme Steigerung des Probendurchsatzes möglich.

Die Herausforderungen für die Multimykotoxin-Analytik bestehen in unterschiedlichen Grenzwerten der verschiedenen Mykotoxine (z.B.  $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$  (OTA) und  $4000 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Summe FB1 und FB2))<sup>2,3</sup>, in den matrixbedingten Quantifizierungsproblemen und in der Probeninhomogenität. Aufgrund der sich aus diesen Problemen ergebenden Anforderungen und dem stetig wachsenden Bedarf an validierten Analyseverfahren für eine möglichst große Bandbreite an Matrices wurde, unter besonderer Berücksichtigung von Präzision und Richtigkeit der Analyseergebnisse, mit der Entwicklung und Validierung eines auf vollständig <sup>13</sup>C-markierten Mykotoxin-Standards basierenden Multimykotoxin-Analyseverfahrens begonnen.

## Material und Methoden

Das im Folgenden vorgestellte Analyseverfahren beschreibt den simultanen und quantitativen Nachweis von Deoxynivalenol (DON), 3-Acetyl DON (3-Ac DON), Aflatoxin G1 (AFG 1), Aflatoxin B1 (AFB 1), den Fumonisin B1, B2, B3 (FB1, FB2, FB3), T-2 Toxin (T-2), HT-2 Toxin (HT-2), Zearalenon (ZON) und Ochratoxin A (OTA) in Lebensmitteln unter Verwendung von vollständig <sup>13</sup>C-markierten Isotopenstandards (Biopure Referenzsubstanzen GmbH, Tulln, A).

In Abbildung 2 ist der Verfahrensablauf schematisch dargestellt. Für den Nachweis der ausgewählten Mykotoxine wurde ein HPLC-Tandem-MS-System bestehend aus einer HPLC-Anlage (Agilent 1100er Serie, Agilent Technologies, Waldbronn, D) und einem mit einer Electrospray (Turbo-V)-Ionenquelle (ESI) ausgestatteten QTrap<sup>®</sup> Tandem Massenspektrometer (QTrap 4000, Applied Biosystems, Darmstadt, D), verwendet. Die chromatographische Trennung der Analyten erfolgte bei 25 °C unter Verwendung einer Gemini<sup>®</sup> C<sub>18</sub> Säule (150×4,6 mm ID, 5 µm Partikelgröße) mit Vorsäule (Gemini<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, 4×3 mm ID, 5 µm Partikelgröße), beide von der Firma Phenomenex (Torrance, CA, USA). Die Laufmittel (Fluss:  $1 \text{ mL min}^{-1}$ ) bestanden aus Me-



**Abbildung 2:** Verfahrensablauf für das entwickelte Analyseverfahren zum Nachweis von Mykotoxinen in Lebensmitteln

thanol / Wasser / Essigsäure-Mischungen im Verhältnis 10 : 89 : 1 (v:v:v; Eluent A) bzw. 97 : 2 : 1 (v:v:v; Eluent B), jeweils mit 5 mM Ammoniumacetat. Das Injektionsvolumen der Messlösung betrug 5 µL und erfolgte in einen Fluss aus 100 % des Eluenten A, der für 2 min gehalten, anschließend über 12 min linear auf 100 % Eluent B reduziert und für 3 min auf diesem Niveau gehalten wurde. Zur Reequilibration der Säule wurde zum Ende des HPLC-Laufes für 4 min bei 100 % A gespült. Die ESI-MS/MS-Messungen erfolgten innerhalb eines chromatographischen Laufes in den Perioden 1 und 4 im negativen (DON, 3-Ac DON, ZON, OTA) sowie in den Perioden 2 und 3 im positiven SRM-Modus (AFG1, AFB1, FB1-3, HT-2, T-2). Pro Analyt wurden gemäß der EU-Direktive 96/23/EC<sup>4</sup> zwei SRM-Übergänge (Quantifier/Qualifier) aufgezeichnet, um die Sicherheit der Identifizierung der jeweiligen Verbindung zu erhöhen. Für die zugehörigen, vollständig <sup>13</sup>C-markierten internen Standards wurde jeweils ein weiterer Übergang gescannt. Die allgemeinen MS-Parameter wurden wie folgt gewählt: Quelltemperatur 550 °C, Desolvatationsgas 10 psi, Zerstäubergas 50 psi, Trocknungsgas 50 psi, Ionisationspotenzial -4 kV bzw. +4 kV, Kollisionsgas (Stickstoff) hoch. Die verwendeten analytspezifischen MS/MS-Parameter wurden im Rahmen der Methodenentwicklung mittels Spritzenpumpe (Harvard Apparatus, Holliston, MA, US) optimiert.

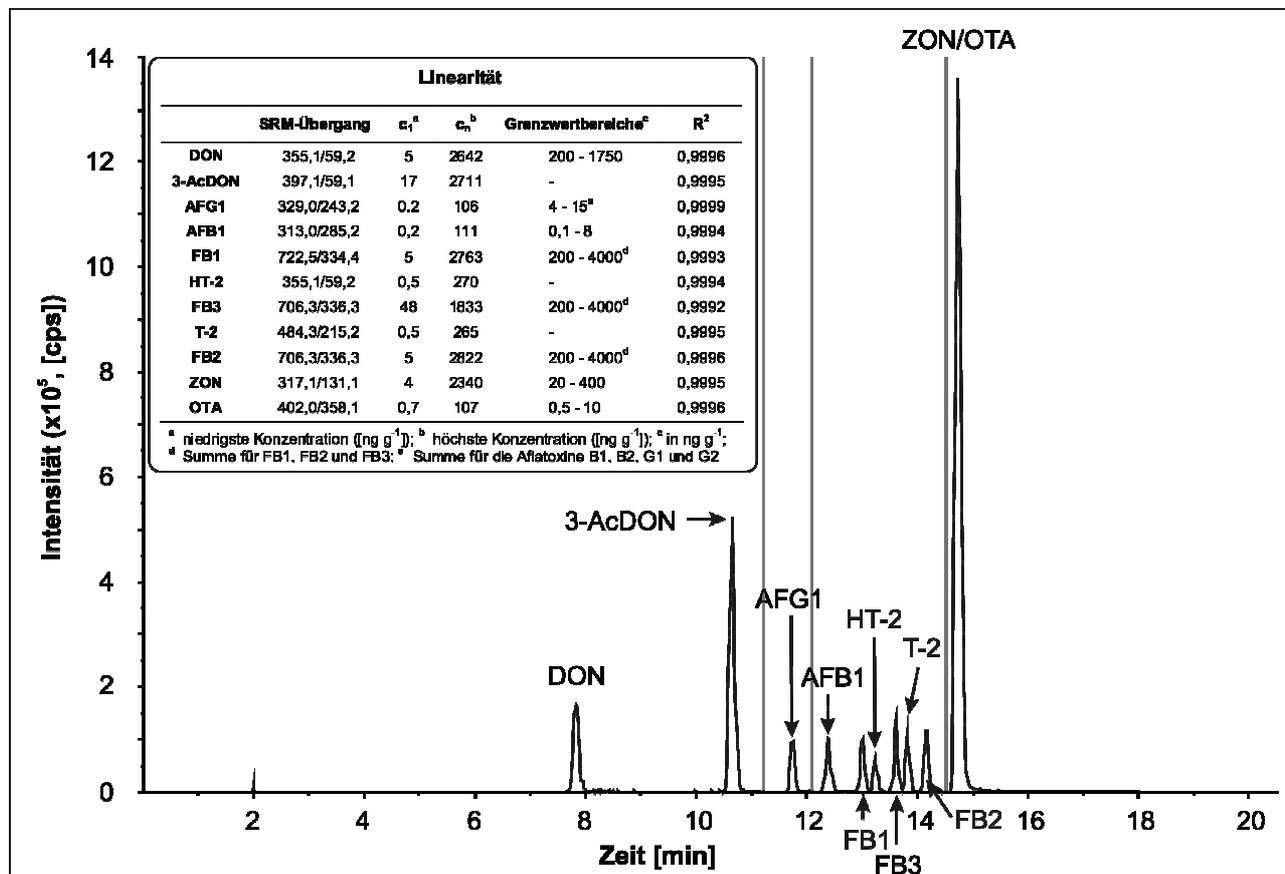
### **Ergebnisse und Diskussion:**

Aufbauend auf die von Sulyok et al.<sup>5</sup> publizierte Multimykotoxinmethode wurden die Probenvorbereitung und die LC-MS/MS-Methode angepasst, um eine Erhöhung von Richtigkeit und Präzision sowie eine kürzere Analysenzeit zu erreichen.

Neben der Implementierung der <sup>13</sup>C-markierten Mykotoxinstandards zur Korrektur von Matrixeffekten und Analytverlusten in die LC-MS/MS-Methode wurde die gesamte Probenvorbereitung zur Vermeidung von Volumenfehlern auf gravimetrisch kontrolliertes Arbeiten umgestellt. Wesentliche Voraussetzung für diese Umstellung ist die Kenntnis der Dichten der verschiedenen Lösungsmittel (Acetonitril (ACN), ACN : H<sub>2</sub>O (1 : 1, v:v)) in denen die kommerziell erhältlichen Mykotoxinstandards vorliegen, um so die Analytgehalte der Stammlösungen als Massenanteile (µg kg<sup>-1</sup>) angeben zu können.

Um temperaturbedingte Fehler bei der Herstellung der Stammlösungen sowie der Berechnung ihrer Analytgehalte zu vermeiden, wurden im Vorfeld der Arbeiten mit Hilfe eines Dichtemessgerätes (DMA 5000, Anton Paar GmbH, Graz, A) die Dichten für Acetonitril und dessen 1:1-Mischung mit Wasser innerhalb eines Temperaturbereiches von 18 bis 29/30 °C bestimmt (n = 12/13, m = 5). Aus den erhaltenen Temperatur-Dichte-Korrelationen konnten die mittleren relativen Standardabweichungen berechnet werden, welche in beiden Fällen unterhalb von 7 · 10<sup>-4</sup> % lagen und relative Messunsicherheiten von 0,07 % (ACN) bzw. 0,17 % (ACN : Wasser (1 : 1, v:v)) über den gesamten Temperaturbereich aufweisen. In Kombination mit der Genauigkeit der Analysenwaagen lassen sich auf diese Weise geringere Unsicherheiten für die hergestellten Stammlösungen und deren Verdünnungen erreichen als im Vergleich zum volumetrischen Arbeiten.

Die chromatographische Trennung der untersuchten Mykotoxine (s. Abb. 3) gelingt, mit Ausnahme von ZON und OTA, sehr gut. Die Coelution von ZON und OTA beeinträchtigt jedoch nicht ihre Auswertungen, da die Messungen der Analyten im SRM-Modus durchgeführt werden und eine Ionensuppression durch die eingesetzten  $^{13}\text{C}$ -Standards korrigiert wird. Die linearen Messbereiche



**Abbildung 3:** LC-MS/MS Totalionen-Chromatogramm (TIC) einer Standardlösung und Linearitätsdaten für alle 11 ausgewählten Mykotoxine (Linien markieren die Periodengrenzen)

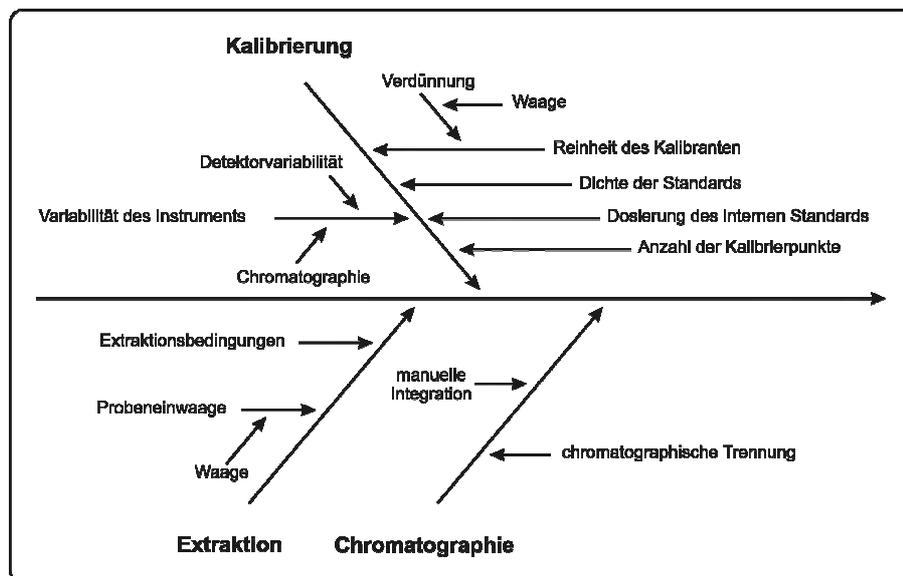
erstrecken sich mykotoxinspezifisch über weite Konzentrationsbereiche (s. Abb. 3), wodurch sich die LC-MS/MS-Methode sehr gut für den Einsatz im Rahmen der Lebensmittelüberwachung eignet. Die relativen Wiederholstandardabweichungen der LC-MS/MS Endbestimmung (Intra- / Interday) betragen nach Korrektur mit dem internen Standard für alle Mykotoxine zwischen 0,4 und 0,9 % (Konzentrationsniveaus 14 und 69  $\text{ng g}^{-1}$ ). Ein weiterer Vorteil besteht in der Messung aller 11 Analyten in einem HPLC-Lauf mittels 4 Messperioden im positiven bzw. negativen MRM-Modus, wodurch sich eine Halbierung des Zeitaufwandes für die LC-MS/MS-Messungen ergibt.

In Abbildung 4 ist ein Ursache-Wirkungsdiagramm dargestellt, welches die Einzelunsicherheitskomponenten erfasst und somit die Bestimmung der erweiterten Gesamtmessunsicherheit (U) nach folgender Gleichung ermöglicht:

$$U = k \cdot \sqrt{\left(\frac{u(\text{chrom})}{\text{chrom}}\right)^2 + \left(\frac{u(x_s)}{x_s}\right)^2 + \left(\frac{u(c_{\text{Standard}})}{c_{\text{Standard}}}\right)^2 + \left(\frac{u(m)}{m}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{extr})}{\text{extr}}\right)^2 + \left(\frac{u(\rho)}{\rho}\right)^2} \quad (1)$$

U setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:  $u(chrom)$ : Variabilität des LC-Systems,  $u(x_a)$ : Kalibrierung,  $u(C_{Standard})$ : Substanzkonzentrationen der Standardlösungen,  $u(m)$ : Wägung,  $u(extr)$ : Extraktion/Probeninhomogenität,  $u(\rho)$ : Dichtebestimmung und dem Erweiterungsfaktor  $k$ .

Ein kritischer Aspekt dieses Verfahrens, wie auch der gesamten Lebensmittelanalytik, ist die begrenzte Homogenität des zu untersuchenden Probenmaterials. Bei Matrices wie Weizen und Mais lässt sich diese noch mit vergleichsweise geringem Aufwand realisieren, hingegen stellen z.B. stark zuckerhaltige Lebensmittel wie Feigen und Datteln gerade beim Mahlprozess eine große Herausforderung dar. Bedingt durch ihren hohen Zuckeranteil neigen diese Matrices dazu, selbst bei der Kryomahlung zu agglomerieren bzw. eine breiartige Konsistenz anzunehmen, welche die Siebeinsätze zusetzt und somit eine Feinmahlung nicht zulässt. Die sich daraus ergebenden Probleme sind Gegenstand weiterer Untersuchungen, da nur bei ausreichender Homogenität der Proben Einwaagen von 1 g realisierbar sind. Größere Probeneinwaagen sind prinzipiell möglich, sie würden jedoch die Zugabe der begrenzt verfügbaren und sehr teuren  $^{13}\text{C}$ -markierten internen Standards unmöglich machen.



**Abbildung 4:** Ursache-Wirkungsdiagramm für die Mykotoxinanalyse in Lebensmitteln mit den Einzelkomponenten für das Unsicherheitsbudget

### Ausblick:

Der Fokus weiterer Untersuchungen ist gerichtet auf die Bestimmung der Wiederfindungsraten sowie der Nachweisgrenzen in verschiedenen Lebensmittel-Matrices (z.B. Mais, Futtermittel (DDGS)). Aufbauend auf Validierungskenndaten soll anschließend für jedes der genannten Mykotoxine ein Messunsicherheitsbudget erstellt werden. Die Richtigkeit des Analysenverfahrens wird anhand der Analysen von Analysen (zertifizierten) Referenzmaterialien überprüft.

### Danksagung:

Der besondere Dank der Autoren gilt der Firma Biopure für die Bereitstellung der nativen und  $^{13}\text{C}$ -markierten Mykotoxin-Standards.

## Literatur:

- <sup>1</sup> Steyn P.S., 1995. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicol. Lett.* **82/83**, S. 843-851.
- <sup>2</sup> Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln. *Amtsblatt der Europäischen Union* **L364**, 20.12.2006, S. 5-24.
- <sup>3</sup> Verordnung (EG) Nr. 1126/2007 der Kommission vom 28.9.2007 zur Änderung der VO (EG) Nr. 1881/2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln hinsichtlich Fusarientoxinen in Mais und Maiserzeugnissen. *Amtsblatt der Europäischen Union* **L255**, 29.9.2006, S. 14-17.
- <sup>4</sup> Richtlinie 96/23/EG des Rates vom 29. April 1996 über Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Richtlinien 85/358/EWG und 86/469/EWG und der Entscheidungen 89/187/EWG und 91/664/EWG. *Amtsblatt der Europäischen Union* **L125**, 23.5.1996. S. 10-32.
- <sup>5</sup> Sulyok M., Krska R. und Schuhmacher R., 2007. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **389(5)**, S. 1505-1523.

## Autoren:

Dr. Robert KÖPPEN und Dr. Matthias KOCH, BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Abteilung I „Analytische Chemie; Referenzmaterialien“, Richard-Willstätter-Str. 11, D-12489 Berlin, Deutschland

Dr. Micheal SULYOK, Prof. Dr. Rudolf KRŠKA und Dr. Rainer SCHUHMACHER, Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln, Österreich

# Systeme zur Bewertung der Anfälligkeit von Getreidesorten gegenüber *Fusarium* in europäischen Ländern

*Systems for the evaluation of the susceptibility of cereal varieties to Fusarium in European countries*

M. OBERFORSTER

## Summary

The resistance against *Fusarium* head blight (FHB) is a main criterion in the registration process of wheat varieties. The article shows methods for the evaluation of the FHB resistance in ten European countries. In Slovakia, Poland and Estonia natural FHB infection occurring in trials is used. In Austria, Germany, France, and the Czech Republic the classification is based partially or completely on results of infection by maize stubbles. Spray inoculation with a conidial suspension is applied in Switzerland, France, the Netherlands, the Czech Republic, and Hungary. In the case of triticale knowledge is of a more fragmentary nature. Only the registration authorities from Switzerland, France, Poland and Hungary classify varieties in respect of their FHB resistance.

## Zusammenfassung

Die Widerstandskraft gegen Ährenfusarium ist ein Hauptkriterium im Registrierungsverfahren von Weizensorten. Der Beitrag stellt die Methoden zur Ermittlung der Fusariumresistenz in zehn europäischen Ländern vor. In der Slowakei, Polen und Estland wird der in den Prüfungen natürlich auftretende Fusariumbefall genutzt. In Österreich, Deutschland, Frankreich und Tschechien basiert die Einstufung teilweise oder gänzlich auf Ergebnissen von Maisstoppelregistern. Die Sprühinokulation mit einer Konidien suspension wird in der Schweiz, in Frankreich, den Niederlanden, Tschechien und Ungarn angewandt. Bei Triticale sind die Kenntnisse fragmentarischer. Lediglich die Zulassungsbehörden der Schweiz, Frankreichs, Polens und Ungarns stufen die Sorten in ihrer Widerstandskraft gegenüber *Fusarium* ein.

**Schlüsselwörter / Keywords:** Ährenfusarium / *fusarium* head blight, Sortenwertprüfung / VCU-testing, Boniturschema / scale 1 to 9, Maisstoppelmethode / maize stubble method

## Einleitung

Fusariumpilze (*Fusarium graminearum*, *F. culmorum* und andere) können bei einigen Getreidearten sowie Mais große Schäden verursachen. Neben Qualitäts- und Ertragseinbußen stellt das Risiko einer Anreicherung mit Mykotoxinen ein besonderes Problem dar. Die Kommission der Europäischen Gemeinschaften erwähnt im Anhang III der Richtlinie 2003/90/EG die Resistenz gegen Schadorganismen als Teil der Prüfung des landeskulturellen Wertes, macht jedoch keine näheren Angaben dazu. Bei der amtlichen Sortenprüfung werden unterschiedliche Methoden zur Charakterisierung der Anfälligkeit gegenüber *Fusarium* eingesetzt.

## Material und Methoden

Im Folgenden werden die Systeme zur Bewertung der Fusariumresistenz von Winterweizen und Wintertriticale in mehreren Ländern aufgezeigt. Den Übersichten liegen großteils persönliche Mitteilungen (2007, 2008) von Experten der betreffenden Sortenämter zugrunde.

## Ergebnisse und Diskussion

Methodische Ansätze: Es sind zahlreiche Möglichkeiten beschrieben, die Widerstandsfähigkeit von Getreidesorten gegenüber *Fusarium* zu quantifizieren. Einige sind in der Praxis unbedeutend, andere werden hauptsächlich in der Forschung genutzt.

Feldinfektionen können auf natürlichem, semi-natürlichem oder künstlichem Wege erfolgen. Es ist bekannt, dass mit zunehmendem Befallsdruck die Genotypen besser differenzieren. Deshalb werden Maisstoppeln, gehäckseltes Maisstroh oder mit *Fusarium* kolonisierte Maiskörner auf Parzellen aufgebracht (semi-natürliche Methode). Alternativ dazu wird zur Blütezeit des Getreides eine Konidiensuspension in die Ähren appliziert (künstliche Methode). Eine Sprühnebelbefeuchtung vermag das Infektionsniveau weiter zu steigern (Lemmens et al. 1995).

Die Krankheitssymptome werden mittels Bonitur (Skala 1 bis 9, 1 bis 3 bzw. 9 bis 1) oder als Prozent befallener Ährchen erfasst. Ein einfaches Maß der Fusariumresistenz wäre die Gewichts Differenz von 10 bis 15 zufällig ausgewählten Ähren einer inokulierten mit einer nicht inokulierten Variante. Auch relative Unterschiede der Varianten beim Tausendkorn- und Hektolitergewicht bzw. der Prozentsatz infizierter Körner bieten aussagekräftige Informationen. *In-vitro* Methoden sind insgesamt weniger bedeutsam. Als selektives Agens für keimende Samen kommen Extrakte von Fusariumkulturen oder gereinigte Toxine infrage. Molekulare Marker sind für die Analyse der Fusariumresistenz wertvoll und werden bereits in der praktischen Zuchtarbeit eingesetzt (Bürstmayr et al. 1999). Ein aussichtsreicher Ansatz liegt in der Detektion der Fusarium-DNA mittels PCR (Brunner und Mach 2008). In mehreren Ländern werden Überlegungen zur routinemäßigen Analyse des Toxingehalts mittels HPLC, ELISA oder NIRS angestellt. Über Vor- und Nachteile einzelner Methoden berichten Ruckenbauer et al. (2001) und Rudd et al. (2001).

Ährenfusarium bei Weizen (Österreich): In den Ertragsprüfungen resultieren Häufigkeit und Stärke des Fusariumbefalls in eine Note (1 = kein Befall, ... 9 = sehr starker Befall). Seit 2005/06 werden an zwei Standorten im Alpenvorland (Grabenegg bei Wieselburg, Bad Wimsbach-Neydharting bei Wels) die Weizensorten in Maisstoppelregistern geprüft (Oberforster 2008). Ergänzend zu den Maisstängeln gelangen mit *Fusarium* infizierte Maiskörner auf die Parzellen. Bei dieser Methode kann die Pflanzenmorphologie ihren Beitrag zur Resistenzausprägung leisten. Allerdings ist der Infektionserfolg im Vergleich zur Sprühinokulation witterungsabhängiger. Toxinanalysen sind derzeit nicht Bestandteil der Sortenzulassung.

Ährenfusarium bei Weizen (andere Länder): Nach Vorarbeiten von Wosnitza et al. (2000) hat das deutsche Bundessortenamt die Fusarium-Resistenzprüfung von der Ähreninokulation auf die

Maisstoppelmethode umgestellt. In der Schweiz, den Niederlanden und Ungarn kommt die Sprühinokulation zur Anwendung. Seit 2008 basiert in Ungarn die Bewertung anhand des Ernteguts. In Frankreich werden die Ergebnisse der Maisstoppelmethode mit jenen der Sprühinokulation kombiniert. Daten von natürlicher, semi-natürlicher und künstlicher Infektion sowie auch Toxinanalysen (ELISA) werden in Tschechien erhoben (Chrpová et al., 2009). In der Slowakei, Polen und Estland erfolgt die Einstufung anhand des natürlichen Befalls.

Tabelle 1: Weichweizen – Methoden und Skalen zur Feststellung der Fusariumresistenz bei der Sortenwertprüfung in europäischen Ländern

	Natürlicher Befall	Maisstoppel-methode	Sprüh-inokulation	Toxin-analyse	Bewertung / Einstufung
<b>Österreich</b>	1-9 (Ähre)	1-9 (Ähre)			Ja
<b>Deutschland</b>		% (Ähre)			Ja
<b>Schweiz</b>			1-9 (Ähre)		Ja
<b>Frankreich</b>		% (Ähre)	% (Ähre)		Ja
<b>Niederlande</b>			1-9 (Ähre)		Ja
<b>Tschechien</b>	9-1 (Ähre)	9-1 (Ähre)	9-1 (Ähre)	Ja	Ja
<b>Slowakei</b>	9-1 (Ähre)				Ja
<b>Polen</b>	1-9 (Ähre)				Ja
<b>Ungarn</b>			% (Körner)		Ja
<b>Estland</b>	1-3 (Ähre)				Ja

Ährenfusarium bei Wintertriticale: Triticale ist gegenüber Ährenfusarium anfälliger als Weichweizen (Tischner und Eiblmeier, 2005). In Österreich, Tschechien, Slowakei, Polen und Estland werden die Symptome in den Ertragsversuchen erhoben. Ein Hindernis stellt das an den Ähren oft unscheinbare Schadbild dar. In Deutschland, der Schweiz, Frankreich und Ungarn wird eine Konidiensuspension in die Ähren gesprüht. Nur die Behörden der Schweiz, Frankreichs, Polens und Ungarns stufen das Triticalesortiment ein.

Tabelle 2: Wintertriticale – Methoden und Skalen zur Feststellung der Fusariumresistenz bei der Sortenwertprüfung in europäischen Ländern

	Natürlicher Befall	Maisstoppel-methode	Sprüh-inokulation	Toxin-analyse	Bewertung / Einstufung
<b>Österreich</b>	1-9 (Ähre)				Nein
<b>Deutschland</b>			% (Ähre)		Nein
<b>Schweiz</b>			1-9 (Ähre)		Ja
<b>Frankreich</b>			% (Ähre)		Ja
<b>Niederlande</b>					Nein
<b>Tschechien</b>	9-1 (Ähre)				Nein
<b>Slowakei</b>	9-1 (Ähre)				Nein
<b>Polen</b>	1-9 (Ähre)				Ja
<b>Ungarn</b>			% (Körner)		Ja
<b>Estland</b>	1-3 (Ähre)				Nein

Ermittlung der Ausprägungsstufe (APS) für Ährenfusarium in Österreich: Ein Fusariumbefall kann wesentlich von Genotyp x Umwelt – Interaktionen geprägt sein (Bürstmayr et al. 1999, Miedaner et al. 2001). Oftmals sind diese auf heterogene Witterungsbedingungen sowie unterschiedliche Blühzeitpunkte im Sortiment rückführbar. Die sichere Bewertung von Genotypen erfordert Ergebnisse aus mehreren Umwelten (Jahre, Standorte). Für die Vergabe der Ausprägungsstufen (Skala von 1 bis 9, 1 = resistent, ... 9 = sehr stark anfällig) werden orthogonale Datensätze, Differenzen zu langjährig geprüften Vergleichssorten oder adjustierte Mittelwerte berechnet. Die Vorgangsweise sei anhand der am 19. Dezember 2008 zur Registrierung vorgelegten acht Winterweizen aufgezeigt: Für jene Referenzsorten, welche im Prüfzeitraum (Jahr 2005 bis 2008) der Kandidaten in den Versuchen standen, wird eine Regressionslinie von Ausprägungsstufe gemäß Beschreibender Sortenliste (Agentur 2009) und tatsächlichem Befall (adjustierte Mittelwerte) gebildet. Vom Befallswert der Kandidaten und der Regressionsgeraden (Vergleichssorten) werden die Ausprägungsstufen für Ährenfusarium abgeleitet.

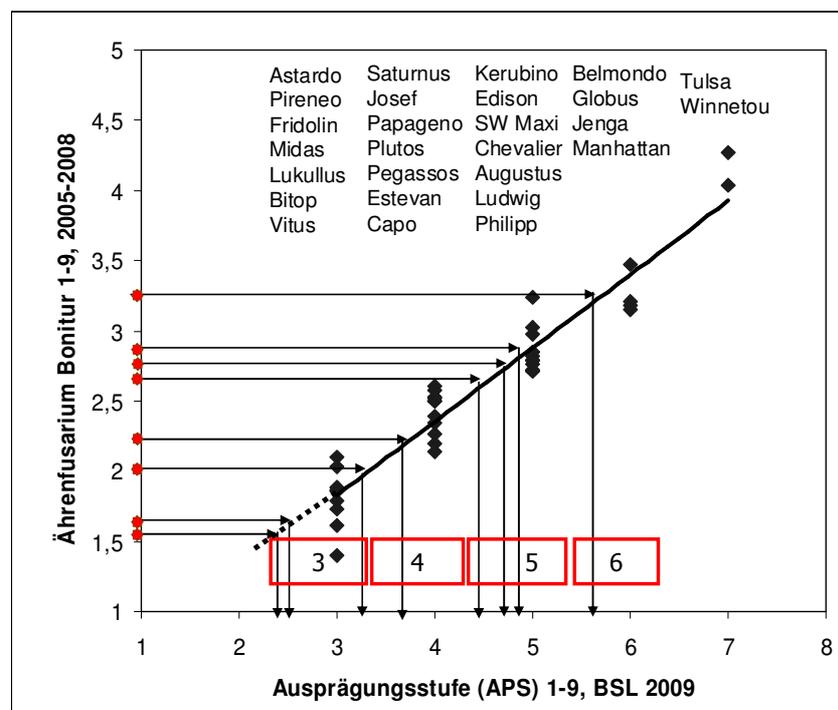


Abbildung 1: Kandidatensorten von Winterweizen – Feststellung der Ausprägungsstufe für Ährenfusarium mittels der Regression von Ausprägungsstufe und durchschnittlicher Fusariumbonitur der Referenzsorten

#### Literatur

Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH (Hrsg.), 2009: Österreichische Beschreibende Sortenliste 2009 (Auszug). Schriftenreihe 10/2009.

Brunner K. und R.L. Mach, 2008: Molekulare Möglichkeiten zur Detektion von Trichothece produzierenden *Fusarium* Arten. ALVA-Mitteilungen 6, 57-60.

- Bürstmayr H., M. Lemmens, M.L. Doldi, M. Stierschneider, B. Steiner, K. Werner, L. Hartl und P. Ruckenbauer, 1999: Reistenzüchtung bei Weizen gegenüber Ährenfusariosen. Ber. über die 50. Arbeitstag. 1999 der Vereinigung österreichischer Pflanzzüchter, 63-68.
- Chrpová J., M. Váňová und V. Šíp, 2009: Die Bewertung der Ährenfusariosenresistenz bei in der Tschechischen Republik registrierten Winterweizensorten unter verschiedenen Prüfungsmethoden. Ber. über die 59. Tagung der Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 2008, 19-22.
- Lemmens M., H. Bürstmayr, E. Wimmer, H. Grausgruber und P. Ruckenbauer, 1995: Ährenfusariose bei Weizen: Vergleich mehrerer künstlicher Inokulationstechniken. Ber. über die 46. Arbeitstag. 1995 der Vereinigung österreichischer Pflanzzüchter, 235-237.
- Miedaner T., C. Reinbrecht, U. Lauber, M. Schollenberger and H.H. Geiger, 2001: Effects of genotype and genotype x environment interaction on deoxynivalenol accumulation and resistance to *Fusarium* head blight in rye, triticale, and wheat. *Plant Breeding* 120, 97-105.
- Oberforster M., 2008: Methodik zur Ermittlung von Fusariumbefall und Sortenresistenz bei Getreide. *ALVA-Mitteilungen* 6, 45-49.
- Persönliche Mitteilungen, 2007 und 2008: Ardel P. (Estland), Donner D. (Niederlande), Gašparová L. (Slowakei), Hertelendy P. (Ungarn), Horakova V. (Tschechien), Mascher F. (Schweiz), Mistou M.-N. (Frankreich), Rentel D. (Deutschland), Rutkowska-Los A. (Polen).
- Ruckenbauer P., H. Buerstmayr and M. Lemmens, 2001: Present strategies in resistance breeding against scab (*Fusarium* spp.). *Euphytica* 119, 121-127.
- Rudd J.C., R.D. Horsley, A.L. McKendry and E.M. Elias, 2001: Host plant resistance genes for *Fusarium* head blight: Sources, mechanisms, and utility in conventional breeding systems. *Crop Science* 41, 620-627.
- Tischner H. und P. Eiblmeier, 2005: Toxinbildung durch Ährenfusarien bei Triticale. *Getreidemagazin* 2, 120-122.
- Wosnitza A., G. Zimmermann, J. Habermeyer und V. Zinkernagel, 2000: Methoden zur Bestimmung sortenunterschiedlicher Anfälligkeiten des Weizens gegen *Fusarium* spp. 52. Deutsche Pflanzenschutztagung, *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtsch.* 376, 67-68.

**Autor:** Dipl.-Ing. Michael OBERFORSTER, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Institut für Sortenwesen, Spargelfeldstraße 191, A-1220 Wien

## ***Fusarium*-Arten und DON-Gehalt in Weizen aus Österreich, Erntemonitoring 2005 - 2007**

*Fusarium-species and DON content in wheat samples from Austria, harvest 2005 - 2007*

A. ADLER, P. KIROJE, F. GLÖSMANN & SANDRA BRUNNER

### **Summary**

The results underline the significance of *Fusarium graminearum* as a dangerous cereal ear parasite and the most prolific producer of toxins in wheat in Austria. Depending on the year, an intensified *Fusarium* infestation on cereal may appear in Austria. In association with this, samples showing high levels of *Fusarium* toxins also occur occasionally. The potential for epidemics as a result of ear fusarioses is present, however the risk of infestation should be considerably influenced by changing cultivation practice. A strategy against the toxin contamination of cereal associated with *Fusarium* infestation presupposes a combination of measures in crop cultivation and crop protection, during which crop rotation, soil cultivation, variety selection and cultivation intensity must be directed purposefully towards risk minimization.

Under these prevailing conditions, advanced monitoring of *Fusarium* infection and toxin contamination in Austrian cereal appears to be an urgently necessary pre-requisite for qualification of the risk potential and thereby, in the interest of all consumers, indispensable for successful risk management with reference to mycotoxins.

**Key words:** *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, deoxynivalenol, wheat

### **Zusammenfassung**

Die Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von *F. graminearum* als gefährlicher Ährenparasit und wichtigster Toxinbildner bei Weizen in Österreich. Jahresabhängig kann auch in Österreich ein verstärkter *Fusarium*-Befall von Getreide auftreten, damit verbunden kommen fallweise auch Erntechargen mit hohen Gehalten an Fusarientoxinen vor. Das Potential für Epidemien durch Ährenfusarien ist vorhanden, das Befallsrisiko kann aber durch eine bedachte Anbaupraxis maßgeblich verringert werden. Eine Strategie gegen die mit *Fusarium*-Befall verbundene Toxinbelastung des Getreides setzt eine Kombination von Maßnahmen des Pflanzenbaus und des Pflanzenschutzes voraus, wobei Fruchtfolge, Bodenbearbeitung, Sortenwahl und Anbauintensität gezielt auf eine Risikominimierung auszurichten sind.

Unter diesen Vorgaben erscheint ein fortgesetztes Monitoring von Fusarienbefall und Toxinkontamination in österreichischem Getreide als dringend notwendige Voraussetzung für eine Quantifizierung des Gefahrenpotentials und somit im Interesse aller Konsumenten als unverzichtbar für ein erfolgreiches Risikomanagement bezüglich Mykotoxine.

**Schlüsselworte:** *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, Deoxynivalenol, Weizen

## **Einleitung**

Ährenfusariosen an Weizen werden durch einen Komplex unterschiedlicher *Fusarium*-Arten verursacht. Dabei führen Fusarien nicht nur zu erheblichen Ertragsverlusten sondern mindern vor allem auch die Weizenqualität, da sie artspezifisch Mykotoxine von unterschiedlicher toxikologischer Relevanz produzieren. Da Versuche zur Entfernung von Mykotoxinen aus Lebensmittel- und Futterrohstoffen bislang wenig erfolgreich waren, kommt der Reduzierung des Befalls auf dem Feld eine große Bedeutung zu. Um die Zusammenhänge zwischen Mykotoxinbildung und einzelnen produktionstechnischen Parametern im Getreidebau zu erkennen, wird seit den 1980er Jahren Fusarienbefall und Toxinkontamination von Weizen in Österreich durch repräsentative Studien und seit 2005 im Zuge eines österreichweiten Getreidemonitorings erhoben [1, 2].

Dieses ständige Monitoring gilt der Abschätzung des potentiellen Ernährungs- und Fütterungsrisikos, wobei auch die jeweils aktuellen Veränderungen der Häufigkeitsverteilung und im Spektrum der auftretenden *Fusarium*-Arten dokumentiert werden.

## **Material und Methoden**

Zur Erfassung der *Fusarium*-Belastung von Weizen aus österreichischer Erzeugung wird auf Proben aus einem mehrjährigen, flächendeckenden Erntemonitoring zugegriffen. Die Auswahl der Standorte, die in das Monitoring eingehen, erfolgt sehr gezielt und mehrstufig, sodass näherungsweise eine Produktionsmengen-bezogene Verteilung nach allen relevanten Anbauregionen unter praxis- und ortsüblicher Bewirtschaftung vorgenommen werden kann.

Für das Berichtsjahr 2005 wurden 53, für das Folgejahr 85 und für das Erntejahr 2007 wurden 87 ausgewählte Weizenproben analysiert. Die Bestimmung des Fusarienbefalls erfolgte durch Auslegen oberflächendesinfizierter Körner auf Pepton-PCNB-Selektivnährmedium, modif. nach Burgess et al. [3]. Anschließend wurden alle Isolate, die morphologisch Vertretern der Gattung *Fusarium* entsprachen, zur Ermittlung des auftretenden Artenspektrums auf PDA bzw. SNA subkultiviert und nach morphologischen Kriterien identifiziert [3, 4].

In den Getreideproben wurden Trichothecene der A- und B-Gruppe mittels Kapillargaschromatographie mit ECD nach Mycosep-Säulen-Clean-up und Halogenierung bzw. Silylierung bestimmt, die Analytik wurde im CC Cluster Chemie der AGES in Linz durchgeführt.

## **Ergebnisse und Diskussion**

Die Witterung im Verlauf der relevanten Vegetationsphase von Weizen verlief in den drei untersuchten Erntejahrgängen sehr unterschiedlich. 2005 waren Spätfrühling und Sommermonate normal bis leicht unternormal temperiert bei weitgehend normalen Niederschlagssummen. Das Jahr 2006 wies im Verlauf von Weizenblüte und -reife zumeist niederschlagsarme und ungewöhnlich warme Bedingungen auf. 2007 brachte schließlich nach dem mildesten Winter und dem wärmsten Frühjahr seit Aufzeichnungsbeginn auch einen Sommer der Temperaturrekorde. Erst Mitte August setzten Phasen ausgiebiger Niederschläge der langen Wärmeperiode ein Ende.

Insgesamt wurden 225 Weizenproben auf *Fusarium*-Befall untersucht. Dabei wiesen 7,6% aller Körner der Ernte 2005 Befall mit *F. graminearum* auf (vergl. Tabelle 1). Im Folgejahr lag die Befallstärke bei 6,4% und im Jahr 2007 bei 4,3% der Körner. Im Vergleich zum Erntegut der Jahre 2000 bis 2002 war die Befallsrate der Proben insbesondere mit *F. graminearum* deutlich höher. Die Artenzusammensetzung der Fusarienflora von Weizen wurde in den Beobachtungsjahren, gleich wie in den vorangegangenen Vergleichsperioden, neben *F. graminearum* in erster Linie von *F. poae*, *F. avenaceum* und *F. tricinctum* geprägt, zusätzlich kommt bei Weizen – im Gegensatz zu Maiskolben – auch *F. culmorum* noch gewisse Bedeutung zu (vergl. Tabelle 1).

**Tabelle 1:** *Fusarium*-Befall an Weizenkörnern, Ernte 2000 bis 2007 in Österreich (durchschnittl. Prozentanteil infizierter Körner). Daten der Jahre 2000 bis 2002 nach Brunner [2], Daten der Jahre 2003/2004 aus eigenen, bisher noch unveröffentlichten Untersuchungen.

<b>Fusarium-Arten</b>	<b>2000-02</b>	<b>2003-04</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>
<i>F. graminearum</i>	0,3	8,6	7,6	6,4	4,3
<i>F. avenaceum</i>	1,2	3,3	2,0	3,6	2,1
<i>F. tricinctum</i>	0,6	2,9	1,0	1,2	0,6
<i>F. culmorum</i>	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2
<i>F. poae</i>	4,6	3,4	3,7	8,3	9,2
<i>F. sporotrichioides</i>	0,1	0,1	0,2	0,1	<0,1
<i>F. proliferatum</i>	<0,1	0,1	0,2	0,1	0,1
Sonstige <i>Fusarium</i> sp.*	0,4	0,3	0,2	0,3	0,2

\* einschl.: *F. acuminatum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. langsethiae*, *F. merismoides*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. semitectum*, *F. sporotrichioides*, *F. verticillioides*

*F. poae*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum* und *F. sporotrichioides* sind in mitteleuropäischen Ländern häufig nachzuweisende Fusarienarten und wurden auch in den Berichtsjahren in erheblichen Zahlen von den Weizenkörnern isoliert. Diese Pilze werden als schwache Pathogene mit geringer Aggressivität charakterisiert, bzw. auch als Begleitparasiten bezeichnet [7]. Im Zusammenhang mit diesen Arten steht aber nicht das Krankheitsgeschehen an Weizen im Vordergrund, sondern primär kommt ihrer Fähigkeit zur Produktion von Mykotoxinen (z.B. Nivalenol, Fusarin C, Moniliformin bzw. T-2 Toxin und HT-2 Toxin) größte Relevanz im Hinblick auf Qualitätsverluste der Ernteprodukte und ein mögliches Ernährungsrisiko zu.

*F. proliferatum* wurde in Österreich an Weizen erstmals in Erntegut des Jahres 2004 nachgewiesen. Der durchschnittliche Befallsgrad der Proben erscheint dabei mit Werten von 0,1% bis 0,2% infizierter Körner gering. In allen Versuchsjahren können aber einzelne Proben mit deutlich erhöhten Befallsraten von bis zu 3,5% *F. proliferatum*-positiver Körner festgestellt werden, wobei jedoch bislang selbst in diesen stärker befallenen Proben keine Fumonisin-Kontamination nachgewiesen werden konnte. Stark befallene Weizenproben kamen im Zuge des Monitorings vorwiegend aus trockenen Lagen im Alpenvorland und vor allem im Nordöstlichen Flach- und Hügelland und weisen als einzige weitere Gemeinsamkeit zumeist Körnermais als Vorfrucht auf.

*F. proliferatum* ist als ein wichtiger Produzent von Fumonisin bekannt und es erscheint dabei wahrscheinlich, dass nicht zuletzt dieser Pilz auch als Verursacher für eine Kontamination von Weizen mit Fumonisin verantwortlich in Frage kommt [6]. Der Befall von Weizen mit *F. proliferatum* bedarf daher im Hinblick auf ein mögliches Ernährungsrisiko durch Fumonisin-Kontamination auch in Österreich weiterhin einer intensiven Beobachtung.

*F. langsethiae*, eine erst jüngst beschriebenen *Fusarium*-Art und von großer Bedeutung als möglicher Produzent der als stark toxisch einzustufenden Substanzen T-2 Toxin und HT-2 Toxin [7], wurde in allen Versuchsjahren mit mäßiger Häufigkeit nachgewiesen, die Befallsintensität blieb dabei aber mit jährlichen Durchschnittswerten von jeweils unter 0,1% befallenen Körnern gering.

Für die Infektion von Weizen mit *F. graminearum* und eine damit verbundene Toxinbelastung des Ernteguts mit Deoxynivalenol (DON) wurden, wie in einem bayerischen *Fusarium*-Monitoring [8], auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit deutliche Unterschiede in der Befallstärke der einzelnen Untersuchungsjahre festgestellt. Weizenproben von verschiedenen Standorten in Österreich aus den Jahren 1994, 2000 und 2001 sowie aus dem Untersuchungsjahr 2007 waren dabei durch vergleichsweise geringen Befall mit *F. graminearum* und niedrige DON-Werte gekennzeichnet (vergl. Tabelle 2). Die Erntejahrgänge 2004, 2005 und 2006 erscheinen unter diesem Aspekt bei den untersuchten Weizenproben als Befallsjahre. Starker Fusarienbefall und hohe DON-Werte wurden auch in Proben (1991 und 1992) von Durumweizen, der als besonders anfällig gegenüber Ährenfusariose gilt, festgestellt.

**Tabelle 2:** *F. graminearum*, *F. culmorum* und DON-Gehalte in Weizenproben

Wirt	Erntejahr	Proben (n)	DON* (µg/kg)	Prozentanteil befallener Körner	
				<i>F. graminearum</i>	<i>F. culmorum</i>
Weizen	2007	87	220	4,3	0,2
Weizen	2006	85	490	6,4	0,1
Weizen	2005	53	450	7,6	0,2
Weizen	2004	48	510	11,4	0,4
Weizen	2000-2002	58	< 100	0,3	0,3
Weizen	1994	32	< 100	0,5	0,3
Durum	1991-1992	48	640	26,8	1,9

\* Nachweisgrenze 0,05 mg/kg

*F. culmorum*, früher häufig als gefährlicher Ährenparasit genannte Fusarienart und gleichermaßen Toxinbildner wie *F. graminearum*, profitierte in den Befallsjahren 2004 bis 2006, wie die Untersuchung zeigt, jedoch kaum von infektionsfördernden Einflussfaktoren (vergl. Tabelle 2). Die im Vergleich zu den für die Jahre 2000 bis 2002 ermittelten Werten erhöhten DON-Gehalte in Weizenproben der Erntejahre 2004 bis 2006 waren primär auf stärkeren Befall mit *F. graminearum* zurückzuführen. Diese Beobachtung gilt auch für die Durum-Proben und unterstreicht die Bedeutung von *F. graminearum* als Befallserreger und wesentlicher Toxinbildner in Österreich.

Erhöhter Befallsdruck mit *F. graminearum* besteht vor allem in Jahren mit feuchten Witterungsbedingungen zur Zeit der Getreideblüte und/oder in Verbindung mit pflugloser Bodenbearbeitung. Zusätzlich ist Winterweizen insbesondere nach der Vorfrucht Körnermais für erhöhten Fusariumbefall und DON-Kontamination des Enteguts gefährdet. [8, 9].

**Tabelle 3:** *F. graminearum* und DON-Gehalte (Mittelwerte) in Weizenproben nach Vorfrucht Körnermais im Vergleich zu anderen Vorfrüchten, Ernte 2007

Erntejahr	Proben (n)	Anbauregion	Vorfrucht	befallene Körner (%) <i>F. graminearum</i>	DON (µg/kg)
2007	12	Alpenvorland	Körnermais	17,2	476
2007	8	davon: mit Pflug		7,6	131
2007	4	davon: pfluglos		48,5	1166
2007	11	Alpenvorland	andere	5,3	207
2007	5	davon: mit Pflug		1,2	36
2007	6	davon: pfluglos		12,8	362
2007	9	NÖ` Flach- und Hügelland	Körnermais	3,9	123
2007	22	NÖ` Flach- und Hügelland	andere	0,6	22
2007	8	SÖ` Flach- und Hügelland	Körnermais	12,1	336
2007	8	SÖ` Flach- und Hügelland	andere	5,3	117

In der gegenständlichen Untersuchung lagen in den Proben aus allen Anbaugebieten die Mittelwerte für *Fusarium*- und DON-Gehalte nach Vorfrucht Körnermais jeweils um ein Mehrfaches über den Werten von Weizenproben nach anderen Vorfrüchten (vergl. Tab. 3). Fusarienbefall und Mykotoxinbelastung wurden dabei durch pfluglose Bodenbearbeitung ganz eklatant gefördert.

**Tabelle 4:** *F. graminearum* und durchschnittliche DON-Gehalte (Mittelwerte) in Weizenproben aus dem Alpenvorland im Vergleich zum NÖ` Flach- und Hügelland

Erntejahr	Proben (n)	Anbauregion	befallene Körner (%) <i>F. graminearum</i>	DON (µg/kg)
2007	36	Alpenvorland	7,6	362
2007	33	NÖ` Flach- und Hügelland	1,7	93
2006	40	Alpenvorland	9,2	707
2006	45	NÖ` Flach- und Hügelland	3,8	328
2005	18	Alpenvorland	14,3	975
2005	26	NÖ` Flach- und Hügelland	3,7	175

Das bei nichtwendender Bodenbearbeitung auf der Ackeroberfläche verbleibende Maisstroh bildet für *F. graminearum* (Hauptfruchtform *Gibberella zeae*) ideale Bedingungen für die Überwinterung und die nachfolgende Fruchtkörperbildung, in denen sich Ascosporen entwickeln. Diese werden bei günstiger Witterung, nachdem sie aus den Fruchtkörpern ausgeschleudert worden sind, leicht durch den Wind verbreitet und können so direkt in die Weizenblüte gelangen und sie befallen.

In Tabelle 4 werden Mittelwerte für *Fusarium*-Befall und DON-Gehalt der Weizenernte anhand von Monitoringproben aus zwei klimatisch unterschiedlichen Anbauregionen verglichen. Proben aus dem Alpenvorland weisen dabei deutlich stärkeren *Fusarium*-Befall und wesentlich höhere DON-Gehalte auf als Proben aus dem vergleichsweise trockeneren NÖ` Flach- und Hügelland. Die ermittelten Daten bestätigen die Erfahrung, dass *F. graminearum*-Befall und eine damit verbundene Toxinbelastung des Ernteguts mit DON in Österreich primär ein Problem in den relativ feuchteren Vegetationsperioden und in den niederschlagsreicheren Anbauregionen darstellen.

### Danksagung

Die Autoren bedanken sich beim Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt- und Wasserwirtschaft für die finanzielle Unterstützung (BMLFUW-Forschungsprojekt Nr. 100012).

### Literatur

- (1) Adler, A., H. Lew und W. Edinger (1990): Incidence and toxigenicity of *Fusarium* species in cereals from Austria. *Die Bodenkultur* 41, 145 - 152.
- (2) Brunner, S. (2004): Erhebung der aktuellen *Fusarium*-Befallssituation in Bezug zum Agrarökosystem und Untersuchung der genetischen Variabilität bei wichtigen *Fusarium*-Arten mittels RAPD isoliert von Getreide und Mais aus Österreich. Dissertation, Univ. Salzburg, 175 pp.
- (3) Burgess, L.W., Liddell, C.M. and Summerell, B. (1988): Laboratory manual for *Fusarium* research. Department of Plant Pathology and Agricultural Entomology, Univ. Sidney, 156 pp.
- (4) Nirenberg, H.I. and O'Donnel, K. (1998): New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella Fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90, 434-458.
- (5) Müller, C. und Bröther, H. (2002): Untersuchungen zum Artenspektrum von *Fusarium*-Pilzen im Erntegut von Getreide im Land Brandenburg. *Gesunde Pflanzen* 54, 33-37.
- (6) Moretti, A., Logrieco, A., Visconti, A. and Bottalico, A. (2004): An overview of mycotoxins and toxigenic fungi in Italy. In: Logrieco, A. and Visconti, A. (eds.): An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 141-160.
- (7) Thrane, U., Adler, A., Clasen, P.-E., Galvano, F., Langseth, W., Lew, H., Logrieco, A., Nielsen, K.F. and Ritieni, A. (2004): Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides*. *Int. J. Food Microbiol.* 95, 257-266.
- (8) Beck, R. und Lepschy, J. (2000): Ergebnisse aus dem *Fusarium*-Monitoring 1989–1999 – Einfluss der produktionstechnischen Faktoren Fruchtfolge und Bodenbearbeitung. In: Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum* – Ergebnisse eines LBP-Forschungsverbunds. *Bodenkultur und Pflanzenbau. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau*, 4. Jahrgang, Heft 3, 39-47.
- (9) Krauthausen, H.-J., J. Weinert, W. Baumann und G. Wolf (2003): Mehrjährige Erhebungen zum Vorkommen von Ährenfusarien und dem Mykotoxin Deoxynivalenol in Getreide aus Rheinland-Pfalz. *Gesunde Pflanzen* 55 (5), 136-143.

### Autoren:

Dr. Andreas ADLER, Ing. Peter KIROJE, Franz GLÖSMANN und Dr. Sandra BRUNNER;  
Österr. Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Wieningerstraße 8, 4020 Linz

## ***Fusarium*-Arten und Mykotoxine bei Mais in Österreich, Erntemonitoring 2004 - 2007**

*Fusarium-species and mycotoxins in maize samples from Austria, harvest 2004 - 2007*

A. ADLER & P. KIROJE

### **Zusammenfassung**

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass jahresabhängig in Österreich ein verstärkter *Fusarium*-Befall bei Körnermais auftreten kann, damit verbunden fallen auch Erntechargen mit erheblichen Toxingehalten an. Besondere Bedeutung kommt dabei *Fusarium graminearum* als gefährlichem Erreger von Kolbenfusariosen und als wichtigstem Produzent von DON in Österreich zu. An Standorten im Trockengebiet sind *F. subglutinans* und *F. proliferatum* als häufigste Arten zu isolieren, wobei in den korrespondierenden Maisproben auch entsprechende Fumonisin-Gehalte nachgewiesen werden können. Unter diesen Vorgaben erscheint ein fortgesetztes Monitoring von Fusarienbefall und Toxinkontamination in österreichischem Körnermais als dringend notwendige Voraussetzung für eine Quantifizierung des Gefahrenpotentials und somit im Interesse aller Konsumenten als unverzichtbar für ein erfolgreiches Risikomanagement bezüglich Mykotoxine.

**Schlüsselworte:** *Fusarium graminearum*, *F. proliferatum*, Deoxynivalenol, Fumonisin, Körnermais

### **Summary**

Depending on the year, an intensified *Fusarium* infestation on maize may appear in Austria. In association with this, samples showing high levels of *Fusarium* toxins also occur occasionally. The results underline the significance of *Fusarium graminearum* as a dangerous maize ear parasite and an effective producer of DON in maize in Austria. *F. subglutinans* and *F. proliferatum* were isolated most frequently under dry conditions. Additionally fumonisin-contaminations in the corresponding maize samples could be documented. Under these prevailing conditions, advanced monitoring of *Fusarium* infection and toxin contamination in Austrian cereal appears to be an urgently necessary pre-requisite for qualification of the risk potential and thereby, in the interest of all consumers, indispensable for successful risk management with reference to mycotoxins.

**Key words:** *Fusarium graminearum*, *F. proliferatum*, deoxynivalenol, fumonisin, maize

### **Einleitung**

Die Bedeutung der Kolbenfusariose bei Mais liegt neben damit verbundenen Ertragsverlusten vor allem in der Qualitätsbeeinträchtigung der Ernte durch Mykotoxine. Eine Reihe von *Fusarium*-Arten produzieren dabei artspezifisch Mykotoxine von unterschiedlicher toxikologischer Relevanz, im Vordergrund steht hierbei Deoxynivalenol (DON). Die Verwendung toxin-kontaminierter Nahrungs- und Futtermittel kann dabei zu Gesundheitsproblemen bei Menschen und Tieren führen. Zur Abschätzung des potentiellen Ernährungs- und Fütterungsrisikos wird seit den 1980er Jahren Fusarienbefall und Toxinkontamination von Mais in Österreich durch repräsentative Studien und seit 2004 im Zuge eines österreichweiten Erntemonitorings erhoben, wobei auch die Veränderungen im Spektrum der auftretenden *Fusarium*-Arten dokumentiert werden [1, 2, 3].

## Material und Methoden

Grundlage der Untersuchungen stellten Kolbenmuster von Maissorten verschiedener Reifegruppen dar, die als Standard- bzw. Vergleichssorten im Rahmen der amtlichen Sortenwertprüfungen in den wichtigsten Produktionsgebieten als Bezugsgrößen für den Ernteertrag dienen. Die Auswahl der in das Monitoring eingehenden Standorte erfolgte sehr gezielt und mehrstufig, sodass näherungsweise eine produktionsmengenbezogene Verteilung nach allen relevanten Pilzen und Toxinen vorgenommen werden kann.

Aus der Kombination von Versuchsstellen und Sorten ergaben sich für das Berichtsjahr 2004 in Summe 18 Proben, für das Jahr 2006 wurden 24 und für das Jahr 2007 wurden 32 Proben analysiert. Zur mykologischen Untersuchung gelangten dabei jeweils alle erntefrischen Kolben der geprüften Sorten aus den beiden Randreihen der Parzellen einer Versuchsanlage. Für die Toxinanalysen wurden Mischproben von getrockneten Körnern (Druschproben aus den beiden Mittelreihen der Parzellen) der zu untersuchenden Sorten vom jeweiligen Standort herangezogen. Zur Artendiagnostik erfolgt die Isolierung der Pilze von Maiskolben mit sichtbarem Fusarienbefall (mehr als ein Prozent befallene Kolbenoberfläche) direkt auf PDA (Potato Dextrose Agar, Oxoid CM 139). Anschließend wurden alle Isolate, die morphologisch Vertretern der Gattung *Fusarium* entsprachen, auf PDA bzw. SNA (Small Nutrient Agar nach Nirenberg) subkultiviert und nach morphologischen Kriterien identifiziert [4, 5]. Zur Ermittlung des Befallsgrades wurde mit einer visuellen Bonitur die flächenmäßige Ausbreitung des Pilzbefalls in Relation zur Kolbenoberfläche erfasst.

Die Toxinanalysen wurden im CC Cluster Chemie der AGES in Linz durchgeführt: Trichothecene der A- und B-Gruppe wurden mittels Kapillargaschromatographie mit ECD nach Mycosep-Säulen-Clean-up und Halogenierung bzw. Silylierung bestimmt, die Analytik der Fumonisine erfolgte mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion nach Immunaффinitätssäulen-Clean-up.

## Ergebnisse und Diskussion

Die drei untersuchten Erntejahrgänge unterschieden sich deutlich hinsichtlich des Witterungsverlaufes. 2004 waren die Sommermonate normal oder bis zu 1,5°C übernormal temperiert, dabei verbreitet auch normale, nur im Südosten geringfügig unternormale Niederschlagssummen. 2006 wies der Juli trockene und extrem heiße Bedingungen auf. Die folgenden Monate waren gekennzeichnet von einer kühlen und sehr regenreichen Witterung mit bis zu dreifacher Niederschlagsmenge gegenüber den langjährigen Erwartungswerten in den Hauptanbaugebieten, unterbrochen nur von kurzen Abschnitten spätsommerlichen Schönwetters Anfang September. 2007 brachte schließlich nach dem mildesten Winter und dem wärmsten Frühjahr seit Aufzeichnungsbeginn auch einen Sommer der Temperaturrekorde. Ab Mitte August setzten Phasen ausgiebiger Niederschläge der langen Wärmeperiode ein Ende, September und Oktober erwiesen sich dabei auch als deutlich zu kühl gegenüber früheren Vergleichsmonaten.

Die unterschiedlichen klimatischen Bedingungen im Verlauf der Erntejahre spiegelten sich auch in der Artenzusammensetzung der Fusarienpilze, deren Befallstärke sowie den daraus resultierenden Toxingehalten der Maisproben wider: Im Erntejahr 2004 wiesen 13,6% der entlieschten Maiskolben sichtbaren Fusarienbefall auf, im darauf folgenden Jahr 18,0% und 2007 schließlich 6,3%. Die Verpilzung der Maiskolben ist in Österreich zu einem wesentlichen Anteil auf Fusarien der Sektionen *Discolor* und *Liseola* zurückzuführen, wobei *F. subglutinans* (Sektion *Liseola*) und *F. graminearum* (Sektion *Discolor*) am häufigsten nachgewiesen wurden (vergl. Tabelle 1).

**Tabelle 1:** *Fusarium*-Befall, infizierte Maiskolben (%)

<b><i>Fusarium</i>-Arten</b>	<b>2004</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>
<i>F. subglutinans</i>	5,2	4,9	0,9
<i>F. proliferatum</i>	2,1	5,1	1,0
<i>F. verticillioides</i>	0,2	0,3	< 0,1
<i>F. graminearum</i>	4,2	5,3	4,8
<i>F. avenaceum</i>	0,7	1,4	0,2
<i>F. poae</i>	0,7	0,6	0,9
Sonstige <i>Fusarium</i> sp.*	0,8	1,3	0,4

\* einschl.: *F. acuminatum*, *F. cerealis*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*,  
*F. sambucinum*, *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum*

*F. graminearum* ist der bei weitem wichtigste DON-Produzent in Österreich. Diese Pilzart befällt die Maiskolben massiver als andere Fusarienarten und dominierte in den Untersuchungsjahren vor allem an Standorten im feuchteren Alpenvorland und in den südlichen Anbauregionen. Im Trockengebiet konnten hingegen *F. subglutinans* und *F. proliferatum* als häufigste Kontaminanten isoliert werden. In allen Beobachtungsjahren wurden in relevantem Ausmaß auch Infektionen der Kolben mit *F. avenaceum* und *F. poae* registriert. *F. poae* ist der wichtigste Nivalenolproduzent auf Getreide in Europa [6], und in etwa jeder zehnten Maisprobe der Ernte 2004 und 2006 konnte Nivalenol auch mit Gehalten von maximal 0,24 mg/kg nachgewiesen werden. Ein etwas höherer Anteil von 32,2% Nivalenol-positiven Proben (maximaler Gehalt 0,33 mg/kg) war für die Ernte 2007 festzustellen.

Die Häufigkeit aller weiteren von den Kolben isolierten Fusarienarten, die in Einzelfällen sehr wohl aber auch erhebliche Befallssymptome verursachten, überstieg allerdings kaum einen Wert von 0,5% der Kolben und die daraus resultierende Verpilzung blieb insgesamt gering. Auch *F. culmorum*, vor etwa zwei Jahrzehnten noch ein gefährliches Pathogen und ein bedeutender Toxinbildner an Maiskolben, war nur in wenigen Einzelfällen von befallenen Kolben zu isolieren.

Bei *F. proliferatum* hat sich die bereits im Verlauf der 90er Jahre festgestellte signifikante Zunahme der Infektionen an Maiskolben in den Erntejahren 2004 und 2006 bestätigt und noch weiter verstärkt [2, 3]. So wurde im Durchschnitt dieser beiden Erntejahre bereits ein Anteil von 3,6% *F. proliferatum*-infizierten Maiskolben an der Gesamtzahl aller untersuchten Kolben festgestellt.

Zusätzlich wurde auch ein entsprechender Anstieg Fumonisin-kontaminierter Maisproben nachgewiesen (vergl. Tabelle 2). *F. proliferatum*-infizierte Maiskolben haben sich dabei in erster Linie als ein Problem von Anbauflächen im Alpenvorland und vor allem im Trockengebiet erwiesen.

**Tabelle 2:** *F. proliferatum* an Maiskolben und Fumonisingehalte in Körnermaisproben

Erntejahr:	1996-98	2000-01	2002-03	2004 u. 06	2007
<b>Kolben mit sichtbarem Befall (%)</b>					
<i>F. proliferatum</i>	0,4	0,5	2,1	3,6	1,0
<b>Fumonisin (FB<sub>1</sub>):</b>					
Anteil positiver Proben (%)*	6	28	34	32	26
Bereich der Toxingehalte (mg/kg)	0,09-1,75	0,15-1,09	0,11-1,64	0,08-2,20	0,07-1,34

\* Nachweisgrenze 0,05 mg/kg

Im Beobachtungsjahr 2007 schienen die Entwicklungsbedingungen für *F. proliferatum* zunächst besonders günstig. Im Zusammenhang mit einem vorangegangenen außerordentlich milden Winter und einer von überdurchschnittlich warmen Temperaturen gekennzeichneten, jedoch äußerst trockenen Vegetationsperiode waren neue Rekordwerte hinsichtlich des Auftretens dieses Schadpilzes zu erwarten. Entgegen dieser Annahme trat jedoch eine markante Zäsur in der Entwicklung ein, insgesamt wurde ein Anteil von gerade etwa 1,0% *F. proliferatum*-infizierter Maiskolben in den Versuchsflächen festgestellt. Besonders drastisch fiel dabei der Rückgang bei Proben von Standorten aus dem Trockengebiet aus, wo die Zahl an Infektionen von immerhin 6,2% im Jahr 2006 auf einen Wert von nur mehr 0,6% befallenen Kolben abfiel.

Im Gegensatz zu der bei *F. proliferatum* über eine Reihe von Jahren hinweg beobachteten weitgehend kontinuierlichen Zunahme der Befallshäufigkeit können hinsichtlich einer Infektion der Maiskolben mit *F. graminearum* im gleichen Zeitraum in Österreich ausgesprochene Befallsjahre (wie etwa 1996, 2002 oder 2004) und Erntejahre mit vergleichsweise geringer Infektionsrate (wie etwa 1997, 2000 oder 2001) unterschieden werden (vergl. Tabelle 3).

**Tabelle 3:** *F. graminearum* an Maiskolben und DON-Gehalte in Körnermaisproben

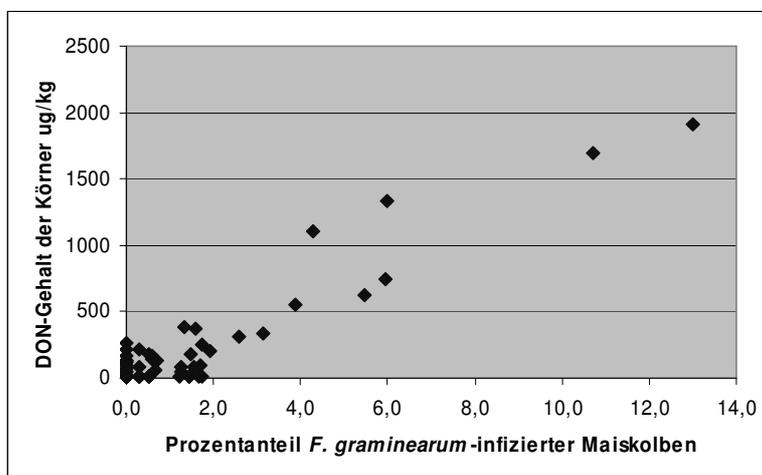
Erntejahr:	1996	1997-98	2000-01	2002 u. 04	2006-07
<b>Kolben mit sichtbarem Befall (%)</b>					
<i>F. graminearum</i>	3,7	1,4	1,2	3,9	5,0
<b>Desoxynivalenol (DON):</b>					
Anteil positiver Proben (%)*	87	69	61	86	92
Bereich der Toxingehalte (mg/kg)	0,08- <b>2,89</b>	0,05-0,74	0,05-0,86	0,05- <b>6,03</b>	0,09- <b>3,31</b>

\* Nachweisgrenze 0,05 mg/kg

Starke *Fusarium*-Befallsjahre weisen dabei zusätzlich auch erhöhte DON-Gehalte in den entsprechenden Körnermaisproben auf. Unter diesem Aspekt waren die Jahre 2006 und 2007 als

starke Befallsjahre einzustufen, wobei 2006 einem durchschnittlich festgestellten Anteil von 5,3% *F. graminearum* infizierten Maiskolben ein mittlerer Gehalt von 0,6 mg DON je kg in den korrespondierenden Körnermaisproben entsprach. Im Jahr 2007 standen einem durchschnittlichen Befall von 4,8% der Kolben etwa 0,5 mg DON je kg in den Körnermaisproben gegenüber. Im Vergleich zu den Werten der starken Befallsjahre 2006 und 2007 zeigt sich der Zusammenhang in den Jahren 2000 und 2001 mit deutlich niedrigeren Gehalten: bei einem Anteil von jeweils 1,2 % *F. graminearum* infizierten Maiskolben wurde eine DON-Belastung von 0,13 bzw. 0,16 mg je kg festgestellt.

Erwartungsgemäß zeigen die Daten aus der gegenständlichen Untersuchung auch bezogen auf Einzelproben, dass zumindest für Erntemuster von Versuchsanlagen im Trockengebiet über Jahre hinweg ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Prozentanteil *F. graminearum*-infizierter Maiskolben und dem DON-Gehalt der Körner besteht (vergl. Abb. 1).



**Abbildung 1:** Prozentanteil *F. graminearum*-infizierter Maiskolben und DON-Gehalt der Körnermaisproben von Versuchsanlagen im Trockengebiet, Ernte 1996 bis 2007

Für die Proben von Versuchsanlagen im Alpenvorland oder im illyrisch/südalpinen Klimabereich ist dieser Zusammenhang ebenfalls tendenziell gegeben aber nicht signifikant, zu sehr dürften standort- und jahrgangsbedingte Einflussfaktoren die Auswertungen beeinflusst haben. Zudem könnten so, wie in der Studie von Papst et al. [7] beschrieben, auch äußerlich intakte und gesund erscheinende Körner mit *F. graminearum* infiziert gewesen sein und so auch relativ hohe DON-Werte aufgewiesen haben. Andererseits könnten auch stärker befallene Körner nur oberflächlich befallen gewesen sein, sodass der Pilz noch keine hohen Toxinkonzentrationen im Inneren bilden konnte.

### Danksagung

Die Autoren bedanken sich beim Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt- und Wasserwirtschaft für die finanzielle Unterstützung (BMLFUW-Forschungsprojekt Nr. 100012).

## Literatur

- (1) Lew, H., A. Adler and W. Edinger (1991): Moniliformin and the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). Mycotoxin Research 7A, 71 – 76.
- (2) Lew, H., A. Adler, W. Edinger, W. Brodacz, E. Kiendler und J. Hinterholzer (2001): Fusarien und Fusarientoxine bei Mais in Österreich. Die Bodenkultur 52, 199-207.
- (3) Brunner, S. (2004): Erhebung der aktuellen *Fusarium*-Befallssituation in Bezug zum Agrarökosystem und Untersuchung der genetischen Variabilität bei wichtigen *Fusarium*-Arten mittels RAPD isoliert von Getreide und Mais aus Österreich. Dissertation, Univ. Salzburg, 175 pp.
- (4) Burgess, L.W., Liddell, C.M. and Summerell, B. (1988): Laboratory manual for *Fusarium* research. Department of Plant Pathology and Agricultural Entomology, Univ. Sidney, 156 pp.
- (5) Nirenberg, H.I. and O'Donnel, K. (1998): New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella Fujikuroi* species complex. Mycologia 90, 434-458.
- (6) Pettersson, H. (1991): Nivalenol production by *Fusarium poae*. Mycotoxin Research 7A, 26-30
- (7) Papst, C., Zellner, J., Venkatratnam, S. und Eder, J. (2007): *Fusarium*-Problematik bei Körnermais (*Zea Mays* L.). Gesunde Pflanzen 59, 7-16.

## Autoren:

Andreas ADLER und Peter KIROJE; Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Wieningerstraße 8, 4020 Linz

## AUTORENVERZEICHNIS

Adler, A.	97, 103
Adam, G.	76
Berthiller, F.	35, 76
Böhm,, J.	14, 47
Brodacz, W.	81
Brunner, S.	97
Büchter, M.	23
Bürstmayr, H.	35
Buschhaus, H.	31
Büttner; C.	31, 61
Crews, C.	76
Cvak, B.	71
Della Rosa, A.	81
Ellner, F.M.	27
Glösmann, F.	97
Goßmann, M.	31, 61
Griessler, K.	65, 68
Grossgut, R.	57
Hennig, F.	61
Hirschfeld, T.	31
Hofstetter, U.	65, 68
Hollmann, M.	47
K. Brunner,	35
Kaul, H.-P.	23
Kemmlin, S.	50
Kiroje, P.	97, 103
Klauffke, H.	50
Koch, M.	85
Köppen, R.	85
Kovalsky, M. P.	35
Krska, R.	35, 41, 71, 76, 85
Lemmens, M.	23, 35
Mach, R. L.	35
Molinelli, A.	71
Oberforster, M.	92
Paolino, G.	35
Preiß-Weigert, A.	50
Rauscher-Gabernig, E.	10, 57
Razzazi-Fazeli, E.	14, 47
Reichhart, U.	54
Reiter, E.,	14, 47
Schatzmayr, D.	18
Schatzmayr, G.	18
Scholz, A.	61
Schuhmacher, R.	35, 41, 76, 85
Schuster, R.	27
Sulyok, M.	41, 85
Vendl, O.	76

Vishwanath, V.	41
Vojir, F.	6
von Bergen, S.	61
Vouk, F.	14, 27
Wichmann, S.	23
Zeitlhofer, C.	23