

**Bundesinstitut
für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin**



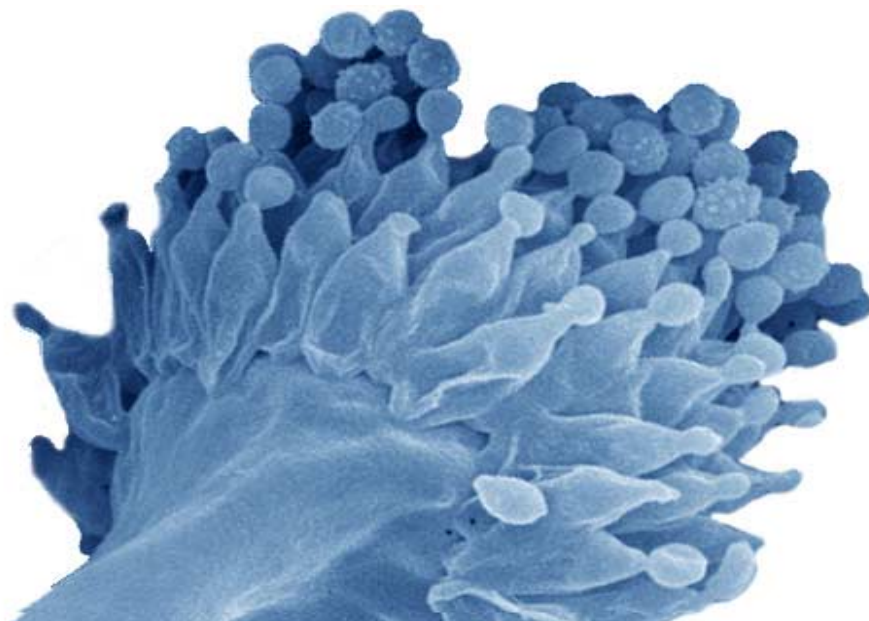
und

Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V.

24. Mykotoxin-Workshop

**Berlin – Marienfelde
03. bis 05. Juni 2002**

**Programm
Abstracts der Vorträge und Poster
Teilnehmerverzeichnis**



Herrn Prof. Dr. Manfred Gareis danken wir für die Bereitstellung des Titelbildes

Veranstalter

Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V.

Vorsitzender: Prof. Dr. E. Usleber
Milchwissenschaften
Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
Justus-Liebig-Universität
Ludwigstrasse 21, 35390 Giessen

Organisation

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin Thielallee 88-92, 14195 Berlin

Christel Zimmermann
Dr. Katrin Kapp

Dr. Rudolf Weber
Dr. Gunther Matthiaschek
Alina Michalsen

Programm

Montag, den 03.06.2002

08:00 – 09:00 **Registrierung**

09:00 – 09:30 **Begrüßung**
Prof. Dr. Arnold, Leiter BgVV
Prof. Dr. Usleber, Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V.

Mykotoxine in Lebensmitteln und Gesundheitsschutz

09:30 – 10:30

Vorträge

Rosner H. **Gesetzliche Regelungen für Mykotoxine in Lebensmitteln**

Thielert G. **Aflatoxin in Erdnüssen – Inspektionsreise nach Ägypten**

Degen G. H. **Ochratoxin A Analysen im Blut von Wertstoffsortierern und Deponiearbeitern:
Zwischenauswertung (Vortrag o. Poster)**

10:30 – 11:00

Kaffeepause

11:00 – 12:00

Vorträge

Ostrý V. **Raisins, ochratoxin A and human health**
Ruprich J.
Skarkova J.

Gareis M. **Ochratoxin A in Bierhefe**

Bosch H. **Screening von OTA und DON in deutschen Bieren von 1995 – 2000**
Winkelmann L.

12:00 – 13:30

Mittagessen

13:30 – 14:50

Vorträge

Weiss R. **Toward the analysis of mykotoxins in beverages – molecularly imprinted polymers for deoxynivalenol and zearalenone**

Zoller O. **Zearalenongehalt in Lebensmittelproben des Detailhandels**

Humpf H. U. **Bildung von Fumonisinartefakten in thermisch behandelten Lebensmitteln**

14:30 – 16:30 *Kaffeepause, Posterpräsentation und Firmenausstellung*

16:30 – 17:30 *Vorträge*

Ellner F. **Mykotoxine in Kartoffelknollen mit *Fusarium* – Trockenfäule**

Krska R. **Einsatz und Entwicklung von zertifizierten Referenzmaterialien für die Mykotoxinanalytik**

Stroka J.
v. Holst Ch.
Anklam E. **The Impact of Correction of Analytical Results for Recovery in Mycotoxin Determination**

Pallaroni L.
v. Holst Ch.
Anklam E.
Bjoerklund E. **Alternative Extraction Methods for Zearalenone: Microwave Assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction**

Ab ca. 18:00 *Gemeinsames Abendessen im BgVV, Marienfelde*

Dienstag, den 04.06.2002

Fusarientoxine in Getreide und Futtermitteln

09:30 – 10:30 *Vorträge*

Griesshaber D. **Simultane Bestimmung von strukturell unterschiedlichen Mykotoxinen in Getreide mit HPLC-MS – Probenaufarbeitung und Methodenoptimierung**

Kos G. **Klassifikation von verpilztem Mais mittels Infrarotspektroskopie und chemometrischer Auswertung**

10:30 – 11:00 *Kaffeepause*

11:00 – 12:00 *Vorträge*

Reutter M. **Mykotoxingehalte in Getreide und Futtermitteln Schleswig – Holsteins – Erhebung aus 2001**

Richter W. **Mykotoxine in Futtergetreideproben aus landwirtschaftlichen Betrieben**

Steinkellner S.
Shala-Mayerhofer V.
Langer I. **Zum Einfluss der Bodenbearbeitung auf den Fusarienbefall in unterschiedlichen Fruchtfolgesystemen**

12:00 – 13:30 *Mittagspause*

Mykotoxine in der Tierernährung

13:30 – 15:10 *Vorträge*

Schatzmayer G. **Nachweis der Ochratoxin A – Detoxifikationsaktivität von Rumenfluid, Darminhalten und Bodenproben sowie Isolierung der relevanten Mikroorganismen aus diesen Habitaten**

Dänicke S.
Weberschär K.-H. **Einfluss von *Fusarium*-toxin kontaminiertem Weizen in der Wiederkäuerernährung**

Geideken D.
Meyer V.

Döll S.
Dänicke S.
Schnurrbusch U.
Flachowsky G.

Einfluss von *Fusarium*-toxin – kontaminiertem Mais auf die Leistung und Tiergesundheit weiblicher Absetzferkel

Razzazi E.
J. Böhm,
B. Kettner,
W. Hochsteiner,
H. Kahlbacher

**Metabolisierung von DON beim Schwein:
Bestimmung von DON und DOM – 1 im Urin vom Schwein mittels HPLC/APCI/MS**

15:10 – 16:30

Kaffeepause, Posterpräsentation und Firmenausstellung

16:30 – 17:45

Mitgliederversammlung der Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V.

18:00

Abfahrt der Busse zum gemeinsamen Ausflug und Abendessen, eingeschlossen der Verleihung des „Brigitte Gedek – Wissenschaftspreis für Mykotoxinforschung“

23:00

Ende der Schifffahrt

Mittwoch, den 05.06.2002

Mikrobiologie und Toxikologie der Mykotoxine

09:30 – 10:30

Vorträge

Fink–Gremmels J.

The role of oxidative stress in the toxicity of ochratoxin A

Geisen R.
Färber P.

Genetic Relationships of Ochratoxin producing *Penicillia*

Köhler H.
Heller M.
Rosner H.
Gräfe U.
Müller G.

Wirkung von Ochratoxin A und Ochratoxin C auf die Monozyten- und Lymphozytenfunktion

10:30 – 11:00

Kaffeepause

11:00 – 12:00

Vorträge

Lebrun S.

Haben Enzym polymorphismen fremdstoffmetabolisierender Enzyme Einfluss auf die Genotoxizität von Ochratoxin A?

Schwerdt G.

Programmierter Zelltod durch Interaktion von Ochratoxin A mit anderen Nephrotoxinen

Senkpiel K.
Schulz T.

Vergleich von Zytotoxizitätsverfahren zur Beurteilung einer Schimmelpilz – Sporenexposition

12:00 – 12:30

Abschlussdiskussion und Verabschiedung

Pro Vortrag + Diskussion sind 20 Min. vorgesehen.

Vorträge

Gesetzliche Regelungen für Mykotoxine in Lebensmitteln

H. Rosner

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin

Vorbeugender Verbraucherschutz

Im Allgemeinen steht bei Mykotoxinen in Lebensmitteln nicht die akute Vergiftungsgefahr als Gefährdungspotential im Mittelpunkt der Betrachtung, sondern vielmehr die tägliche Aufnahme geringer Dosen über einen langen Zeitraum. Die regulatorischen Maßnahmen sind deshalb auf eine Minimierung des Restrisikos durch Senkung der Mykotoxinkontamination in den relevanten Lebensmitteln auf das niedrigste, technisch erreichbare Niveau gerichtet. Da die wissenschaftliche Bewertung von toxikologischen Daten und von analytischen Ergebnissen Unsicherheiten unterliegt, muss deshalb nach dem Vorsorgeprinzip die Festsetzung von Höchstmengen auch dann erwogen werden, wenn noch nicht alle wissenschaftlichen Erkenntnisse zur Verfügung stehen.

Festsetzung von Höchstmengen

Neben den wissenschaftlichen Grundlagen zur Abschätzung eines möglichen gesundheitlichen Risikos für den Verbraucher sowie Probenahmeverfahren und Analysemethoden müssen wirtschaftliche Aspekte und politische Überlegungen wie Harmonisierungsbestrebungen oder Vermeidung von Handelsbarrieren bei der Festsetzung von Höchstmengen berücksichtigt werden.

Die Festsetzung der Höchstmengen für Mykotoxine in Lebensmitteln erfolgt in Deutschland durch die Bundesregierung auf Vorschlag des zuständigen Bundesministeriums und in der Europäischen Gemeinschaft durch die Europäische Kommission auf Vorschlag der zuständigen Generaldirektion. Den Entscheidungsträgern stehen dabei wissenschaftliche und politische Gremien beratend zur Verfügung.

Geltende und geplante Höchstmengenregelungen

Ab April 2001 gilt in der Europäischen Gemeinschaft die neue Kontaminanten-Verordnung (EG) Nr. 466/2001, die im Februar 2002 durch die Verordnung (EG) Nr. 257/2002 (Aflatoxine in Lebensmitteln) und im März 2002 durch die Verordnung (EG) Nr. 472/2002 (Aflatoxine in Gewürzen und Ochratoxin A in Lebensmitteln) ergänzt wurde.

In Deutschland ist darüber hinaus eine Änderung der bestehenden Mykotoxin-Verordnung geplant, die zusätzlich Höchstgehalte für Ochratoxin A (in löslichem Kaffee, in Röstkaffee und in Trockenobst, ausgenommen aus Weintrauben), für Deoxynivalenol und Zearalenon (in Getreide/Getreideerzeugnissen, Teigwaren, Brot und Backwaren), Fumonisin B1 + B2 (Mais/Maiserzeugnisse und Cornflakes) und für Patulin (in Apfelsaft, Apfelmus und Apfelkompott) vorsehen soll.

Im Rahmen einer Änderung der Diätverordnung wurden Höchstgehalte für Ochratoxin A (in diätetischen Lebensmitteln für Säuglinge und Kleinkinder und in Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung), für Deoxynivalenol und Zearalenon (in Getreideerzeugnissen zur Herstellung von diätetischen Lebensmitteln für Säuglinge oder Kleinkinder) sowie für Fumonisin B1+B2 (in Mais und Maiserzeugnissen zur Herstellung von diätetischen Lebensmitteln für Säuglinge oder Kleinkinder) vorgeschlagen.

Aflatoxine in Erdnüssen – Inspektionsreise nach Ägypten

Gerhard Thielert

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

Erdnüsse aus Ägypten wurden seit den Jahren 1998 und 1999 in Europa von der Lebensmittelüberwachung in großem Umfang untersucht: Sie waren auffällig oft und hoch mit Aflatoxinen belastet. Die vielen Meldungen im Schnellwarnsystem der Europäischen Union (Rapid Alert System) veranlassten die EU-Kommission gegenüber Erdnüssen aus Ägypten einen Importstopp zu verhängen. Als weitere Maßnahme wurde eine Inspektionsreise des Lebensmittel- und Veterinärarnamtes der EU (Food and Veterinary Office, FVO) durchgeführt. Das Lebensmittel- und Veterinärarnamt wird als Instrument der Lebensmittelüberwachung innerhalb und außerhalb der Gemeinschaft eingesetzt.

Die Beobachtungen und Feststellungen des Lebensmittel- und Veterinärarnamtes führten 1999 zur Aufhebung des Importstopps. Allerdings waren weitere Bedingungen an den Export von Erdnüssen nach Europa geknüpft.

Gegenüber den ägyptischen Behörden wurden Empfehlungen für Verbesserungen im Land ausgesprochen, damit zukünftig gewährleistet werden kann, dass eine Aflatoxin-Kontamination von Erdnüssen vermieden wird.

Außerdem mussten alle zum Export freigegebenen Partien von den ägyptischen Behörden beprobt und untersucht werden. Ein Zertifikat über die Höhe der Aflatoxin-Belastung musste den Exportpapieren beigelegt werden.

Weiterhin wurden die Zolleingangsstellen der Europäischen Gemeinschaft angewiesen, jede zu importierende Partie Erdnüsse aus Ägypten nach Richtlinie 98/53/EG zu beproben und auf Aflatoxine untersuchen zu lassen. Die Genehmigung zu Einfuhr erhielten nur Partien, die unter den gültigen EU-Höchstmengen lagen.

Nach 2 Jahren, im Jahre 2001, war zu prüfen, ob die Empfehlungen der EU-Kommission in Ägypten erfolgreich umgesetzt worden waren und damit die beschriebenen Maßnahmen zur Einführung von Erdnüssen aus Ägypten noch aufrecht erhalten werden mussten. Deshalb war eine weitere Inspektionsreise notwendig.

Als nationaler Experte wurde ich von der EU angefordert und hatte die Gelegenheit die Inspektoren des FVO auf ihrer Inspektionsreise zu begleiten. Der Reisebericht zeigt einmal mehr, wie wichtig und wie vielfältig die Arbeit in der Lebensmittelüberwachung sein kann.

Für weitere Informationen:

Das Lebensmittel- und Veterinärarnamt (FVO) der Europäischen Kommission veröffentlicht die Kontrollberichte im Internet unter http://europa.eu.int/comm/food/fs/inspections/index_de.html auch zu erreichen über die Internetseiten der Kommission über Lebensmittelsicherheit <http://europa.eu.int/comm/food>.

Ochratoxin A Analysen im Blut von Wertstoffsortierern und Deponie-Beschäftigten: Zwischenauswertung

G. H. Degen¹, Y. Lektarau¹, M. Blaskewicz¹, C. Grüner²

¹ Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund, Ardeystr. 67, D-44139 Dortmund

² Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg, Wiederholdstr. 15, D-70174 Stuttgart

Ochratoxin A (OTA) ist eine häufig vorkommende Kontamination in Nahrungsmitteln, über die es oral aufgenommen wird. Daraus resultiert eine gewisse Hintergrundbelastung der Bevölkerung. Darüberhinaus besteht z.B. durch OTA-haltige Stäube die Möglichkeit einer inhalativen Mykotoxin-Aufnahme. Ob und inwieweit dies an bestimmten Arbeitsplätzen zu erhöhten OTA Belastungen führt, ist bislang aber erst ansatzweise untersucht.

Im Rahmen einer arbeitsmedizinischen Studie des Landesgesundheitsamts Baden-Württemberg an Beschäftigten in der Abfallwirtschaft (Wertstoffsortierer, Deponierer) sind ca. 400 Blutproben asserviert worden. Damit besteht die Chance, die OTA-Spiegel dieser an Risikoarbeitsplätzen tätigen Kollektive zu untersuchen, denn OTA ist aufgrund seiner langen Halbwertszeit im Serum ein sehr gut geeigneter Biomarker für eine Mykotoxin Exposition des Menschen. Etwa 160 Serumproben sind inzwischen am *IfADo* auf ihren OTA-Gehalt hin analysiert worden, und die Ergebnisse der ersten Zwischenauswertung werden präsentiert.

OTA wurde basierend auf publizierten Methoden analysiert, d.h. nach Extraktion des Serums und HPLC mit Fluoreszenzdetektion bestimmt: Die Nachweisgrenze lag bei 0,05 ng/ml, die Bestimmungsgrenze bei 0,1 ng/mL Serum. Alle Proben wurden „blind“ analysiert, d.h. die Codenummern wurden erst nach Vorliegen der gesamten Messreihe mit personen- und tätigkeits-bezogenen Daten verknüpft. Derzeit umfaßt die Gruppe der Deponierer 39 Personen (37 Männer, 2 Frauen), die alle EU-Inländer sind. Aus der Gesamtgruppe der Wertstoffsortierer (n=118, davon 81 Männer und 37 Frauen) sind n=41 EU-Inländer, n=61 andere Europäer und n=16 stammen aus Afrika bzw Asien. Die Bildung von Untergruppen wird als sinnvoll erachtet, weil die Personen möglicherweise unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten haben, die sich auf eine OTA-Hintergrundbelastung auswirken und so u.U. eine tätigkeitsbezogene Exposition vortäuschen oder verschleiern könnten. Die Tabelle fasst einige Ergebnisse der OTA-Analysen zusammen (in ng / mL Serum).

Tätigkeit	Gruppe	Anzahl	Max.	Mittelwert	Median
Deponierer	EU-Inländer	39	0,91	0,276	0,26
W.-Sortierer	EU-Inländer	41	1,28	0,468	0,42
W.-Sortierer	And. Europäer	61	1,9	0,457	0,38
W.-Sortierer	Afrika/Asien	16	0,68	0,314	0,34

Ein Vergleich der Medianwerte, gerade der beiden ersten Gruppen, kann als Indiz dafür gewertet werden, daß Wertstoffsortierer eine höhere OTA-Belastung haben als Deponierer. Die Maxima in unseren vier Gruppen liegen aber nicht höher als die in einer anderen Erhebung gefundenen OTA Spitzenwerte für die Allgemeinbevölkerung in zwei Regionen Süddeutschlands [Rosner *et al.*, 2000]: Karlsruhe (n=119) Max. 2,03 und Kulmbach (n=74) Max. 0,91 ng/mL; allerdings sind in diesen beiden Kollektiven die Mediane mit 0,21 ng/mL niedriger gewesen als in den nun untersuchten, in der Abfallwirtschaft tätigen Gruppen.

Die vorliegenden Befunde signalisieren keinen unmittelbaren Handlungsbedarf, stützen aber einen Verdacht auf zusätzliche inhalative Aufnahme von OTA durch Stäube, der weitere Untersuchungen an Risikoarbeitsplätzen rechtfertigt und ratsam erscheinen lässt.

Rosner H, Rohrmann B, Peiker G (2000) Ochratoxin A in human serum. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 51: 104-107

Raisins, ochratoxin A and human health

V. Ostry, J. Ruprich, J. Skarkova

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

Raisins are original candy - natural candy. They are one of the most nutritious dried fruits in the world. Raisins are cholesterol-free, low in sodium and totally fat-free. They provide many necessary vitamins and minerals, including iron, potassium, calcium and certain B vitamins. Raisins are a good source of fiber and rich in antioxidants. Raisins are 70% pure fructose which is easily digested for quick energy.

The process of drying fruit in the warm sunshine has been attributed to the Persians, and the first description of how black grapes could be dried in the sun to make raisins was written more than 2,000 years ago.

Ochratoxin A (OTA) is naturally occurring secondary metabolite produced by several toxigenic micromycetes (especially *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum*) on a variety of crops, especially cereal grains and further foodstuffs including raisins. OTA can enter raisins by contamination resulting from the growth of toxigenic fungi during drying (short-term humid weather).

Investigations of the determination OTA in raisins were incorporated in the project of monitoring exposure to chemical substances from foodstuffs in the system of Environment Health Monitoring in the Czech Republic.

Raisins were purchased from retail in 12 places of the Czech Republic (the samples came from Prague, Brno, Ostrava, Plzen, Hradec Kralove, Usti nad Labem, Ceske Budejovice, Zdar nad Sazavou, Znojmo, Jablonec, Benesov and Sumperk) during the years 1999 - 2002.

An HPTLC method for quantification of OTA was used. The combination of immunoaffinity chromatography (OchraTest, VICAM, USA) and HPTLC has increased the selectivity and sensitivity of the method used. Validation of the method was performed according to the principles of ICH Guideline. Method was accredited by CSN EN 45000.

The results of the determination of OTA in raisins are shown in the following **Table**.

Sampling places	1999	2000	2001	2002
	OTA /ng.g ⁻¹ /			
01	< 1	9.3	< 1	8.0
02	< 1	3.0	4.7	< 1
03	< 1	< 1	5.1	6.5
04	1.9	< 1	< 1	< 1
05	< 1	< 1	< 1	< 1
06	< 1	< 1	1.6	< 1
07	< 1	2.4	3.1	< 1
08	< 1	< 1	6.1	< 1
09	12.0	< 1	< 1	< 1
10	< 1	< 1	< 1	< 1
11	2.0	3.2	63.6	17.5
12	52.5	< 1	5.2	< 1
Mean	6	1.8	7.7	3.0
Median	0.5	0.5	2.4	0.5
90% percentile	11	3.2	6	7.9

The estimation of dietary exposure dose of OTA from raisins for the Czech population (adult, infant) is presented in the lecture. The results of dietary exposure dose of OTA are compared with PTDI (EU SCF 1998) = 5 ng/kg body weight/day. For example: PTDI for infant, weight 25 kg is 125 ng/person/day. The consumption of 16 g raisins contaminated with OTA 7.7 ng.g⁻¹ = 100% PTDI for infant.

Ochratoxin A in Bierhefe

Manfred Gareis

Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach

Saccharomyces spp. (*S. cerevisiae*, "*S. carlsbergensis*") werden als ober- oder untergärige Reinzuchthefen für das Brauen von Bieren eingesetzt.

Als Nahrungsergänzungsmittel wird Bierhefe in flüssiger Form oder in Form von Pulver, Flocken und Tabletten angeboten. Dabei wird vor allem der hohe Vitamin B₁-Gehalt von den Herstellern betont und eine tägliche Aufnahme des Naturproduktes empfohlen.

Die Konsumenten-Zielgruppen sind primär Kinder im Wachstum, Frauen in der Schwangerschaft und Stillzeit, Rekonvaleszenten, Menschen mit sportliche Aktivitäten und erhöhter körperlicher Anstrengung, Raucher und Personen, die hohen Umweltbelastungen ausgesetzt sind. Darüber hinaus sollen die Präparate zur Vitaminversorgung bei Reduktionskost eingenommen werden. Neben der direkten mehrmaligen Einnahme pro Tag von Tabletten werden Bierhefe-Flocken und -Pulver als Würzmittel für Speisen angeboten.

Naturprodukte sind häufig mit natürlich vorkommenden Toxinen kontaminiert, weshalb im Zusammenhang mit der Ochratoxin A-Belastung von Gerste und Malzen sich zwangsläufig die Frage stellte, ob Hefe aus dem Brauprozess ebenfalls mit Ochratoxinen belastet sein könnte. Zu diesem Zweck wurden 51 unterschiedliche Proben von Bierhefeprodukten aus dem normalen Marktangebot erworben und auf OTA analysiert.

Die Ochratoxin A-Bestimmung erfolgte nach Extraktion der Proben und Aufreinigung der Extrakte mit Immunoaffinitätssäulen mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion (Nachweisgrenze 0,03 ng/ml bzw. g).

In 29 Produktproben konnte Ochratoxin A in unterschiedlichen Konzentrationen (Maximum 1,5 ng/g) nachgewiesen werden.

Unter Berücksichtigung der empfohlenen Tagesrationen von z.B. 3 x 6 Bierhefe-Tabletten kann im ungünstigen Fall täglich eine Dosis von mehr als 10 ng Ochratoxin A aufgenommen werden. Bei einer berechneten täglichen Gesamtaufnahme von 27,9 OTA für Kinder und 39,9 ng OTA für Erwachsene über Nahrungsmittel in Deutschland (Cholmakov-Bodechtel et al., 2000, Archiv für Lebensmittelhygiene 51,114) stellt die Aufnahme von kontaminierten Bierhefepräparaten einen nicht unerheblichen Risikofaktor dar.

Screening von OTA und DON in deutschen Bieren von 1995 -2000

L. Winkelmann und H. Bosch

Deutscher Brauer-Bund e.V.

Seit Jahren beschäftigt sich der Deutsche Brauer-Bund mit den Ursachen für ein seit Jahrzehnten bekanntes Phänomen, das sich mit z.T. heftigem Überschäumen beim Öffnen einer Bierflasche äußert. Obwohl viele Ursachen hierfür verantwortlich sein können, hat sich herausgestellt, dass der Befall des Getreides mit Schimmelpilzen eine große Rolle spielt.

Aus diesem Grund und im Hinblick auf sich abzeichnende gesetzliche Regelungen werden seit 1995 jedes Jahr regelmäßig zusammengehörige Proben von Würze und Bier aus der laufenden Produktion auf OTA und DON untersucht. Zu Beginn der Untersuchungen wurde - wie allgemein üblich - OTA mittels HPLC und vorheriger Anreicherung, DON mit einem ELISA analysiert. Um die Vergleichbarkeit der Daten über die Jahre aufrecht erhalten zu können, wurde dies bis letztes Jahr so beibehalten.

Im Laufe der Bierproduktion stellt die Würzprobe die erste wirklich repräsentative Durchschnittsprobe des verwendeten Malzes dar. Die Daten der Würze- und Bieranalysen ergeben Durchschnittswerte deutlich unter allen in der Diskussion stehenden, eventuellen Grenzwerte. Allerdings gibt es einzelne erhöhte Werte, die sich zwar bis zum Bier im Verlauf des normalen Produktionsprozesses absenken, aber auf eine erhöhte Belastung im Malz zurückgeführt werden.

Daraus ergeben sich für die Brauwirtschaft folgende Erkenntnisse:

1. Durch das Brauen wird ein gewisser „Abreicherungsseffekt“ erzielt.
2. Die Daten zeigen eine z.T. vorhandene, aber geringe Kontamination des Bieres, die aus den Rohstoffen herrührt und nicht durch Maßnahmen im Produktionsprozess beeinflusst werden kann. Folglich muss die Reduzierung der Belastung im Getreide oberstes Ziel aller Bemühungen sein. Alle bekannten Möglichkeiten zur Reduzierung der Schimmelpilzbelastung müssen bereits bei der Urproduktion (Bodenbearbeitung, Fruchtfolge, Sortenwahl, Lagerhaltung etc.) konsequent genutzt werden.
3. Die Festsetzung von Grenzwerten im Endprodukt ist nicht sinnvoll.

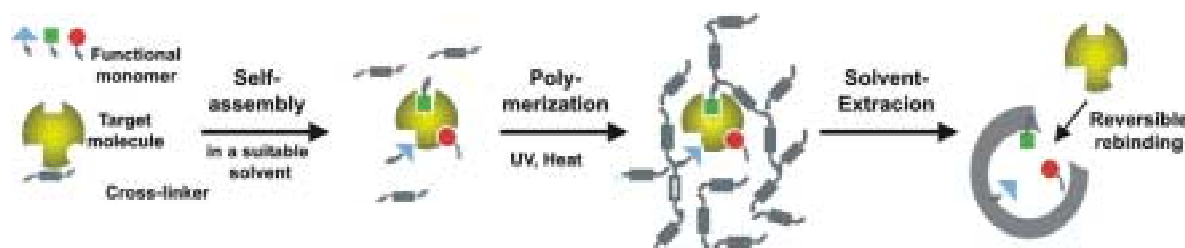
Towards the analysis of mykotoxins in beverages – molecularly imprinted polymers for deoxynivalenol and zearalenone

Robert Weiss¹ and Boris Mizaikoff²

¹ Institute for Chemical Technologies and Analytics, Vienna University of Technology, Getreidemarkt 9/151, A-1060 Vienna, Austria, roweiss@iac.tuwien.ac.at, www.iac.tuwien.ac.at/~csl/sensor.html

² School of Chemistry and Biochemistry, Georgia Institute of Technology, 770 State Street, Atlanta, Georgia 3022-0400, USA, boris.mizaikoff@chemistry.gatech.edu, http://asl.chemistry.gatech.edu

Among biomimetic recognition schemes, Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) have been in discussion as compound-selective recognition material for applications in separation techniques such as chromatography and solid-phase extraction (SPE) since several years. Their inherent advantages in contrast to biochemical/biological systems include robustness, endurance and costs. However, until recently only few publications throughout relevant literature describe the practical use of MIPs and in particular the application as selective enrichment matrix for clean up of food samples [1].



Non-covalent Molecular Imprinting relies on the formation of a pre-polymerisation complex between monomers providing suitable functional groups and the template through non-covalent bonds, such as ionic interactions or hydrogen bonding. Following polymerisation, the functional groups are locked in position by the polymeric network, whereas the template can be removed by solvent extraction. Rebinding of the “antigen” to these polymers is again based on non-covalent interactions (see *Figure*). This self-assembly process is similar to natural recognition processes, since most biomolecular interactions are non-covalent in nature.

Currently under investigation are MIPs for substances relevant in food/beverage analysis [2]. We have been focusing on 3 classes of substances: (1) metabolites of fruits such as flavonoids, (2) contaminants due to food production such as herbicides and (3) mycotoxin contamination. We have successfully developed imprints against the mycotoxines deoxynivalenol and zearalenone and have characterized synthesized molecularly imprinted polymers by HPLC elution experiments. The achieved results promise future application of molecularly imprinted polymers as alternative highly selective matrix for clean up and enrichment of DON and ZON during analysis of beverages such as beer and wine.

Literatur:

[1] L.I. Andersson, J. Chromatogr. B, 745, 3-13 (2000).

[2] A. Molinelli, R. Weiss, B. Mizaikoff, J. Agric. Food Chem., 50(7), 1804-1808 (2002).

Zearalenongehalt in Lebensmittelproben des Detailhandels

Otmar Zoller und Peter Rhyn

Bundesamt für Gesundheit, Abteilung Lebensmittelwissenschaft, CH-3003 Bern, Schweiz

Zearalenon (ZON) ist ein östrogenes Mykotoxin, das von einigen wichtigen Fusariumarten gebildet wird. Es wird deshalb relativ häufig in Rohgetreide nachgewiesen. Das Hauptziel dieser Studie war die Erarbeitung von quantitativen Daten für eine Abschätzung des durchschnittlichen Intakes der Schweizer Bevölkerung. Es wurden vorwiegend "Endprodukte" aus dem schweizerischen Detailhandel untersucht, da Abschätzungen auf Basis von Gehalten in Rohprodukten tendenziell zu hoch ausfallen können. Zur Hauptsache wurden Getreideprodukte untersucht: Mehle, Griess, Brot, Teigwaren, Reis, Süssgebäck, Snacks, Frühstückscerealien, Getreideriegel, Getreidemischungen zum Kochen (Getreiderisotto), Getreidebeikost für Kleinkinder; weiter wurden noch einige Hülsenfrüchte analysiert.

Die Extraktion erfolgte mit ASE (Accelerated Solvent Extraction). Nach clean up über eine Immunaффinitätssäule erfolgte die Bestimmung mit HPLC und Fluoreszenzdetektion. Bei einigen Proben mit nachweisbarem Gehalt an ZON erfolgte zusätzlich eine unabhängige Bestimmung mit LC-MS-MS, dabei wurde auch allenfalls vorhandenes ZON-Glucosid bestimmt. Die Bestimmungsgrenze der Fluoreszenzmethode lag in jedem Fall bei etwa 2 µg/kg Probe. Bei der Bestimmung von ZON in Linsen mit der oben erwähnten, eigentlich sehr selektiven Fluoreszenzmethode ist Vorsicht geboten. Die Problematik wird im Detail erläutert.

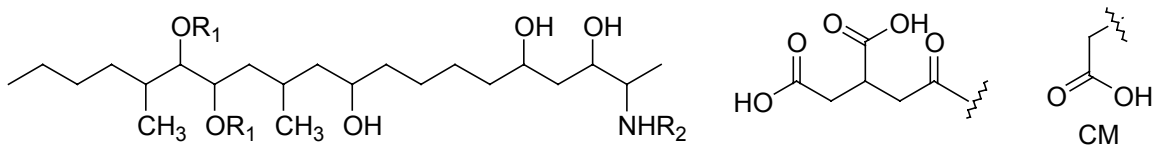
Insgesamt wurden recht niedrige Gehalte an ZON gefunden. In etwa 90 % der Proben lag der Gehalt unter 2 µg/kg. Wie erwartet war der Anteil mit nachweisbaren Gehalten bei Produkten auf Maisbasis am höchsten; alle Gehalte lagen jedoch unter 20 µg/kg. Der höchste Gehalt dieser Untersuchungsreihe wurde in einer Probe Weizenkleie festgestellt.

Bildung von Fumonisinartefakten in thermisch behandelten Lebensmitteln

W. Seefelder, H.-U. Humpf

Universität Würzburg, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie

Bei Fumonisininen handelt es sich um eine Gruppe von kanzerogenen Mykotoxinen [1], die hauptsächlich von *Fusarium verticillioides* (früher *F. moniliforme*) gebildet werden und vorwiegend in Mais und Maisprodukten zu finden sind. Hauptvertreter ist das Fumonisin B₁ (FB₁). Da Maismehl und -grieß bei der industriellen Herstellung verschiedener Lebensmittel in großen Mengen verarbeitet werden, ist die Kenntnis des Reaktions- und Stabilitätsverhaltens der Fumonisine während der Verarbeitungsprozesse eine entscheidende Voraussetzung für die Einschätzung des Verbraucherrisikos. Neben dem hydrolysierten Fumonisin B₁ (HFB₁), das vorwiegend nach Hitze- und Alkalibehandlung (z.B. Nixtamalisation) von Maismehl auftritt und in verarbeiteten Lebensmitteln wie z.B. Knabberartikeln zu finden ist [2], wurde kürzlich N-Carboxymethyl-Fumonisin B₁ (NCM-FB₁) als Reaktionsprodukt mit reduzierenden Zuckern beschrieben [3]. Wie jedoch die von uns durchgeführten Modellstudien mit Heissextrudaten zeigen, ist die Bildung von NCM-FB₁ von geringer Bedeutung für FB₁-kontaminierte Maisprodukte. Dies ergaben auch die Untersuchungen von maishaltigen Lebensmittelproben (NCM-FB₁: 10-76 µg/kg) [4]. Unsere Arbeiten konzentrieren sich derzeit auf Untersuchungen zum Vorkommen von weiteren Fumonisin-Artefakten, die bei der industriellen Verarbeitung von kontaminiertem Maismehl gebildet werden. Dazu werden verschiedene Modellstudien vorgestellt und die ersten Ergebnisse präsentiert.



FB₁: R₁ = TCA, R₂ = H, **HFB₁:** R₁ = H, R₂ = H, **NCM-FB₁:** R₁ = TCA, R₂ = CM

Literatur

1. NTP Studie (1999) NIH Publication Nr. 99-3955, National Institutes of Health.
2. Hartl M, Humpf H-U (1999) J Agric Food Chem 47: 5078-5083.
3. Howard PC, Churchwell MI, Couch LH, Marques MM, Doerge DR (1998) J Agric Food Chem 46: 3546-3557.
4. Seefelder W, Hartl M, Humpf H-U (2001) J Agric Food Chem 49: 2146-2151.

Mykotoxine in Kartoffelknollen mit Fusarium-Trockenfäule

Frank M. Ellner

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Ökotoxikologie und Ökochemie im Pflanzenschutz, Berlin

Fusarium-Trockenfäule, hervorgerufen durch *Fusarium sambucinum* Fuckel und *F. coeruleum* (Lib.) Sacc., ist in Mitteleuropa neben der bakterielle Nassfäule und der Phoma-Trockenfäule hauptsächlich für die Verluste und Qualitätsminderung an Kartoffelknollen im Lager verantwortlich.

F. sambucinum ist als Produzent von Mykotoxinen, vor allem von Diacetoxyscirpenol (DAS) aber auch Nivalenol, Deoxynivalenol, Fusarenon X und Zearalenon, bekannt. Untersucht werden sollte welche Toxine in Kartoffel gebildet werden, der Einfluss von Lagerdauer und Temperatur, sowie der Sorte auf die Toxinbildung.

In Knollen, die künstlich mit *Fusarium sambucinum* infiziert worden waren und deutliche Symptome von Trockenfäule zeigten, konnte DAS in Konzentrationen bis zu 200 µg/Knolle nachgewiesen werden. Weitere Trichothecene wie Nivalenol, Deoxynivalenol oder T-2 Toxin waren hingegen nicht detektierbar.

Die Menge gebildetes Toxin war direkt abhängig von der Zeitspanne zwischen Infektion und Aufarbeitung und der Lagertemperatur. Knollen, in denen der Pilz länger wachsen konnte, enthielten signifikant mehr DAS. Auch die Erhöhung der Lagertemperatur von 10 °C auf 20 °C führte zu erhöhter Toxinkonzentration.

Die Kartoffelsorte ‚Tomensa‘ mit der geringerer Anfälligkeit gegenüber Fusarium-Trockenfäule enthielt signifikant weniger DAS im Vergleich zu ‚Combi‘, einer anfälligeren Sorte.

Die höchsten Toxinkonzentrationen waren in Knollengewebe nachzuweisen das Symptome der Trockenfäule aufwies. Aber auch angrenzendes Gewebe, im Abstand bis zu 1 cm von der Faulstelle, war mit Toxin kontaminiert. Mit zunehmender Entfernung verringerte sich die nachweisbare Toxinmenge allerdings erheblich.

Fusarium-Trockenfäule verursacht nicht nur einen Lagerverlust sondern kann auch zu einer wesentlichen Qualitätsminderung führen. Dies um so mehr, als mit dem Vorkommen von humantoxischen Trichothecenen zu rechnen ist. Die gilt es bei der Verarbeitung von Kartoffeln zu Nahrungsmitteln zu beachten. Aber auch für Verbraucher sollte gelten Faulstellen großzügig auszuschneiden, um das Risiko so gering wie möglich zu halten.

Einsatz und Entwicklung von zertifizierten Referenzmaterialien für die Mykotoxinanalytik

R. Krska, R. Josephs

Institut für Agrarbiotechnologie (IFA-Tulln), Abteilung Analytikzentrum,
Konrad-Lorenzstr. 20, 3430 Tulln

Im Rahmen der internen Qualitätssicherung (QS) ist – so vorhanden - die Anwendung von passenden Referenzmaterialien (RM) die geeignetste Validierungsmaßnahme, um die Richtigkeit und Vergleichbarkeit der eigenen analytischen Methode zu belegen. Ein RM ist ein Material, von dem eine oder mehrere Eigenschaften (z.B. Konzentration) ausreichend bekannt sind, um beispielsweise zur Überprüfung einer Meßmethode zu dienen. Ein zertifiziertes RM (CRM) wird begleitet von oder ist rückführbar auf ein Zertifikat, welches von einer Zertifizierungskörperschaft veröffentlicht wurde. Verfügbare (C)RM reichen von einfachen Kalibrierlösungen für die Kalibration von analytischen Geräten bis hin zu komplexen natürlichen Matrix-Proben.

In der Mykotoxinanalytik gibt es derzeit nur einige wenige (C)RM und ganz generell einen Mangel an Vergleichbarkeit analytischer Daten. In einem von der europäischen Kommission geförderten Projekt (660.000 €, 1998-2002) wurden neben den bereits bestehenden CRMs für Fusarientoxine (Desoxynivalenol in Weizen und Mais), nun auch Referenzmaterialien mit zertifizierten Werten des östrogenen Fusarium-Toxins Zearalenon in Mais bzw. in Acetonitril hergestellt, um die Analysenqualität von Zearalenon auf europäischem Niveau zu verbessern. Nach einer Machbarkeitsstudie für die Herstellung der in Betracht kommenden Referenzmaterialien, die neben umfangreichen Homogenitäts- und Stabilitätsstudien auch zwei Laborvergleichstests umfaßte, wurde schließlich die Zertifizierungsübung mit insgesamt 23 Labors durchgeführt. Die ermittelten zertifizierten Werte des unkontaminierten Mais (BCR 716), des kontaminierten Mais (BCR 717) und der hergestellten Kalibrationslösung sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben:

BCR No.	Certified value	Uncertainty	No. of accepted sets of results (p)
699	9.95 µg/ml	0.08 µg/ml	-
716	< 5 µg/kg	-	20
717	83.2 µg/kg	2.0 µg/kg	18

Eine Zertifizierungskommission wird im November 2002 entscheiden, ob die am IFA produzierten Referenzmaterialien in Zukunft als CRM vertrieben werden können oder nicht. Im Rahmen der im Projekt durchgeführten Laborvergleichstests gelang es, die Streuung der Messergebnisse zwischen ausgewählten Labors in Europa, von 40% (Variationskoeffizient) vor 3 Jahren auf 6%, in diesem Jahr zu senken.

Im Rahmen des Vortrags soll weiters auf den neuen ISO Guide 33 – 2000 eingegangen werden, der u.a. die Überprüfung der Richtigkeit eines Analysenverfahrens durch ein Labor mit Hilfe von CRMs beschreibt. Anhand eines Fallbeispielles soll die Anwendbarkeit dieses Guides für die Mykotoxinanalytik demonstriert werden.

The Impact of Correction of Analytical Results for Recovery in Mycotoxin Determination

Joerg Stroka, Christoph von Holst, Elke Anklam

European Commission, Joint Research Centre, Food Products Unit, I-21020 Ispra

The impact of recovery correction (RC) for analytical results is a critical issue for many analysts and gives rise to several points of view, ranging from approval to refusal of RC.

As a matter of fact, mycotoxin analysts are directly confronted with this issue since the way of reporting results is regulated in EC Directive 466/2001. The reported results must indicate whether RC was performed or not and what the recovery rate was.

Since different procedures for RC might lead to trade disputes, a harmonised approach is highly desired. In addition, RC, if harmonised, not only has an impact on analytical results in routine analysis, but also on results obtained by validation studies, which is an important factor for interpretation of analytical results.

In this presentation the impact of RC on the basis of a re-evaluation of previously performed validation studies for the determination of aflatoxins in food and feed will be presented. Statistical results, using the conventional and the robust statistical approach for the determination of aflatoxin B₁, were compared in view of the relative between-laboratory-standard deviation. Mean values prior to and after RC were evaluated.

Results will be discussed on the basis of theoretical considerations and practical data obtained from the validation studies. The investigation revealed that it is most likely the correlation between the uncorrected data and the recovery rate that led to a reduced variability of the data corrected for recovery.

Alternative Extraction Methods for Zearalenone: Microwave-Assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction

Lea Pallaroni¹, Christoph von Holst¹, Erland Bjoerklund² and Elke Anklam¹

¹European Commission, Joint Research Centre, Food Products Unit, I- 21020 Ispra

²University of Lund, Department of Analytical Chemistry, PO Box 124, S-22100 Lund

In quantitative analysis the extraction step is the least evolved part of most analytical procedures. Driven by the demand of new extraction techniques replacing the conventional liquid extraction, advances in sample preparation have resulted in techniques such as Microwave Assisted Extraction (MAE) and Pressurised Liquid Extraction (trade name ASE Accelerated Solvent Extraction). These techniques allow working at elevated temperature and high pressure, drastically improving the speed of the extraction process.

In last decade there has been an increased interest in MAE and ASE. Most investigation has been devoted to organic contaminant in environmental samples, only recently these techniques have found their way into pharmacy, agriculture and food analyses.

In this study the main parameters involved in the extraction efficiency (solvent, time and temperature) were evaluated with zearalenone (ZON) fortified corn and wheat, applying a factorial design approach.

For the MAE the following parameters were investigated: solvents (acetonitrile, methanol, acetonitrile:methanol (1:1)), time (5 min, 10 min) and temperature (40°C, 80°C). Once the optimal conditions for both matrices were set, the influence of extraction power was evaluated. Wheat has shown to interact more strongly with the analyte compared to corn, which provides a good recovery rate. In order to confirm the results obtained with the fortified material, the method was tested on a sample from an international intercomparison study. The possibility of substituting organic solvents with water was excluded to avoid the formation of a thick "porridge" during the extraction of the corn and wheat flours in the microwave instrument.

A two steps static extraction mode was applied for the ASE, investigating the following parameters: various solvent compositions (acetonitrile:water (9:1), methanol:water (8:20, acetonitrile:methanol (1:1), ethanol:water (7:3), water), extraction time (5 min, 10 min) and temperature (40°C, 80°C and 120°C). The optimised conditions were used to evaluate the extraction efficiency on naturally contaminated materials.

The final ZON detection was performed using a reversed phase high performance liquid chromatograph (RP-HPLC) coupled to a mass spectrometer (MS) ion trap detector equipped with an atmospheric pressure chemical ionisation interface (APCI) working in the negative ionisation mode. This allowed the analysis of the raw extract after filtration without clean-up, thereby omitting analyte losses of the target analyte due to a sample preparation step. Quantification was performed on matrix-matched standard calibration curves in order to minimise the matrix effects.

Both extraction techniques (MAE and ASE) have shown to be good alternatives to classic extraction techniques, in fact MAE allows for a simultaneous extraction of 12 samples in a shorter time reducing the use of solvent, while ASE allows the use of an environmental friendly solvent mixture thanks to increased extraction power provided by elevated temperatures.

Simultane Bestimmung von strukturell unterschiedlichen Mykotoxinen in Getreide mit HPLC-MS - Probenaufarbeitung und Methodenoptimierung

Dorrit Griesshaber und Michael Oehme

Universität Basel, Organisch-Analytische Chemie, Neuhausstr. 31, CH-4057 Basel, Schweiz

In Mitteleuropa führt ein *Fusarien*-Befall von Lebens- und Futtermittel v.a. zu Kontaminationen mit den strukturell unterschiedlichen Mykotoxinen Nivalenol, Deoxynivalenol, Ochratoxin A, Citrinin, Zearalenon und Zearalenol. Da momentan die Bestimmung dieser Substanzen vorwiegend auf Einzelmethoden beruht, ist eine zeitsparende, robuste Methode zur simultanen Bestimmung dieser Mykotoxine für die Routineanalytik von grossem Interesse.

Die Kopplung von HPLC mit Massenspektrometrie hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. So können ebenfalls Substanzen mit geringer bzw. keiner UV- oder Fluoreszenz-Aktivität wie einige der oben genannten Mykotoxine relativ einfach und schnell ohne Derivatisierung identifiziert und quantifiziert werden.

Ziel der vorgestellten Untersuchungen ist es, eine Methode mittels Festphasenextraktion (SPE) und HPLC mit MS-Detektion für die oben genannten Mykotoxine aus kontaminierten Getreideproben (Weizen und Mais) zu entwickeln. Dabei wurde eine validierte Methode basierend auf der Ionisation mittels APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) nach Berger et al. [1] für A- und B-Trichothecene in Weizen modifiziert. Die Probenaufarbeitung erfolgte durch Extraktion mit Acetonitril/H₂O und der Verwendung von C₁₈- sowie SAX- (Strong Anion Exchange) SPE-Phasen. Die Trennung wurde an einer C₁₈-RP-HPLC-Säule mit einem MeOH/Formiat-Puffer-Gradienten durchgeführt. Die unterschiedlichen Polaritäten der einzelnen Substanzen erwiesen sich dabei als problematisch.

Von dem aktuellen Stand der Methodenentwicklung und der Messung verschiedener Realproben soll berichtet werden.

[1] U. Berger, M. Oehme, and F. Kuhn, *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4240-4245.

Klassifikation von verpilztem Mais mittels Infrarotspektroskopie und chemometrischer Auswertung

Gregor Kos, Hans Lohninger und Rudolf Krška

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

Fusarium graminearum richtet als Schimmelpilz auf Mais und Getreide weltweit großen Schaden in der Landwirtschaft an. Die landwirtschaftlichen Produkte werden ungenießbar und können daher nicht zur Produktion von Lebens- und Futtermitteln verwendet werden. Bis jetzt existiert keine Schnellmethode zur Bestimmung der Verpilzung, um einen raschen Überblick über Proben zu erhalten. Eine solche Methode muss ausserdem die folgenden Kriterien erfüllen: minimale Probenvorbereitung und Messzeit, automatisierte Auswertung (ja/nein Entscheidung), einfache Bedienbarkeit, Automatisierbarkeit, Robustheit (Tauglichkeit für in-situ Messungen). Die (wesentlich reduzierte) Zahl an "verdächtigen" Proben kann dann einer konventionellen und genaueren Analytik zugeführt werden.

Diese Studie präsentiert eine Methode, die – basierend auf Infrarotspektroskopie und abgeschwächter Totalreflexion (ATR) – eine Bestimmung innerhalb weniger Minuten erlaubt. Alle verwendeten Maisproben waren natürlich mit *Fusarium graminearum* verpilzt. Die für die Verpilzung maßgeblichen Parameter wie Ergosterol (für die gesamte Pilzmasse) und Deoxynivalenol (DON, das Toxin) wurden mittels etablierter Methoden (HPLC-DAD bzw. GC-MS nach Extraktion und Clean-up) bestimmt [1, 2].

Für die Infrarotmessung wurde die gemahlene Probe zuerst einer Teilchengrößenanalyse mittels Sieben unterworfen, und die Fraktion mit einem Teilchendurchmesser zwischen < 250 und 100 µm für die Spektrenaufnahme verwendet [3]. Die dadurch wesentlich bessere Wiederholbarkeit der Spektrenaufnahme erleichterte die nachfolgende Klassifikation wesentlich. Die Probe wurde mit reproduzierbarem Druck auf den ATR Kristall gepresst und das Mid-Infrarot Spektrum aufgenommen. Im Gegensatz zum Nah-Infrarot, das in der Lebensmittelanalytik gut etabliert ist, enthält das Mid-Infrarot Spektrum eine Fülle an Informationen über Lipide, Proteine und Kohlenhydrate, die durch die Verpilzung Veränderungen erfahren [4]. Unterschiede zwischen verpilzter und Blank-Probe können so direkt im Spektrum verfolgt werden.

Die Auswertung der Spektren erfolgte mittels multivariater Datenanalyse. Nach Testen verschiedener Algorithmen stellte sich die Hauptkomponentenanalyse als effektivste Methode heraus. Die Trennung zwischen verpilzter und Blank-Probe erfolgte im Plot der ersten vs. der zweiten Hauptkomponente. Proben mit einem Toxingehalt von bis zu 309 µg/kg konnten so vom Blank getrennt werden, was dem Bereich der natürlichen Verpilzung entspricht. Untersuchte Konzentrationsbereiche waren 0.73-4.5 mg/kg für Ergosterol und 0-2.6 mg/kg für DON. Der Prozentsatz an korrekt klassifizierten Proben lag zwischen 85 und 100 %.

References:

- [1] J. Weingaertner, et al., *Fres. J. Anal. Chem.*, 357, 1206-1210 (1997)
- [2] K. Schwadorf and H. Müller, *J. of AOAC*, 72, 457-462 (1989)
- [3] Olinger J.M., Griffiths P.M., *Applied Spectroscopy* (6) 47, 687-694 (1993)
- [4] Gordon S.H. et al., *Intern. J. of Food Microbiology* 35, 179-186 (1997)

Mykotoxingehalte in Getreide und Futtermitteln Schleswig-Holstein – Erhebung aus 2001

M. Reutter

Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt
Institut für Tiergesundheit und Lebensmittelqualität GmbH
Gutenbergstraße 75-77, 24116 Kiel

Die Sensibilisierung der Landwirtschaft und der Futtermittelindustrie hinsichtlich der Mykotoxinbelastung, insbesondere der Fusarientoxine hat seit dem Fusariumjahr 1998 deutlich zugenommen. Die zwischenzeitlich veröffentlichten Richtwerte für Zearalanon (ZEA) und Deoxynivalenol (DON), die geänderten Schwerpunktbildung bei der amtlichen Futtermittelkontrolle, sowie das gerade anlaufenden QS-System fördern diese Einstellung noch. Allgemein verfügbare aktuelle Daten zur Mykotoxinbelastung von Futtermitteln sind allerdings nur wenig verfügbar. Die Darstellung der aus Routineuntersuchungen gewonnenen Erkenntnisse für die Mykotoxine ZEA, DON, Ochratoxin A (OTA) und Aflatoxin B1 aus Futtermitteluntersuchungen in Schleswig-Holstein soll hier helfen, die Informationsbasis zu verbreitern.

Die zur Auswertung herangezogenen Proben stammen aus Produktionskontrollen von Futtermittelfirmen, Eingangsuntersuchungen von Rohstoffen (Einzelfuttermitteln), Proben aus der Futtermittelkontrolle sowie internen Kontrollprogrammen.

Nach dem Extremjahr 1998 hat sind in Schleswig-Holstein, auch auf Grund günstiger Witterungsverhältnisse, die Belastungssituation von Futtermitteln mit Fusarientoxinen (ZEA/DON) überwiegend entspannt. Bei den OTA-Gehalten waren einige hohe Werte auffällig.

Futterart	ZEA (µg/kg)		DON(mg/kg)		OTA (µg/kg)	
	90%-Perzentil	Max	90%-Perzentil	Max	90%-Perzentil	Max
Schweinefutter	29,0	122	0,10	0,95	1,20	32,6
Weizen	30,0	379	0,20	2,4	4,44	8,72

Zusätzliche Ergebnisse für ZEA, DON, und OTA von weiteren Futtermitteln und Einzelkomponenten werden präsentiert. Die Aflatoxinbelastung in Milchleistungsfuttermitteln wird kurz dargestellt.

Mykotoxine in Futtergetreideproben aus landwirtschaftlichen Betrieben in Bayern (Ernte 1991-2000)

W.I.F. Richter, M. Schuster

Bayerische Landesanstalt für Tierzucht, Grub. Postfach 1180 85586 Poing. Tel. 08999141 – 430; Telefax 08999141 – 105; e – mail: wolfgang.richter @ blt.bayern.de

In orientierenden Untersuchungen zur Getreidequalität in den Jahren 1991 – 2000 wurden 1757 Proben auf Zearalenon (ZEA) und Ochratoxin A (OTA) sowie 229 Proben auf Deoxynivalenol (DON) untersucht, mit dem Ziel, die mittlere Belastung des auf den landwirtschaftlichen Betrieben erzeugten und gelagerten Getreides zu erfassen und vorbeugende Maßnahmen zur Vermeidung der Mykotoxinbildung daraus abzuleiten bzw. mögliche Kontaminationsquellen zu schließen. In sechs Amtsbereichen wurden in Ferkelerzeugerringen Getreideproben weitgehend zufällig gezogen. Für die Probenahme je Erntejahr wurde vorgegeben, daß je Amtsbereich ca. 40 Getreideproben in 10-20 Betrieben zu ziehen sind, um die Hauptgetreidemenge eines Betriebes zu erfassen. Die Probenahme sollte weitestgehend für die verfütterte Getreidemenge repräsentativ sein. Neben Winterweizen, Wintergerste und Hafer wurde auch Körnermais und Triticale zur Probenahme nachgefragt. OTA und ZEA wurden mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion in allen Proben analysiert (Wiederfindungsraten 80-85 %). Die Nachweisgrenzen (NWG) lagen bei Weizen, Gerste und Triticale für OTA bei 1 µg/kg und für ZEA bei 5 µg/kg. Bei Hafer wurde mit einem zusätzlichen Entfettungsschritt eine NWG von 1,0 µg/kg für beide Toxine erreicht. Die NWG für DON betrug je nach Matrix 30-50 µg/kg.

Ernte 1991 – 2000				Ernte 2000	
Gehaltsbereiche OTA (µg/kg)	Anzahl der Proben	Gehaltsbereiche ZEA (µg/kg)	Anzahl der Proben	Gehaltsbereiche DON (mg/kg)	Anzahl der Proben
< 0,1	1512	< 2	1545	< 0,1	187
0,1 - < 3,0	206	2 - < 50	183	0,1 - < 1,0	32
3,0 - < 200	39	50 - < 250	25	1,0 - < 2,0	6
> 200	0	250 - < 500	2	2,0 - < 5,0	3
-	-	> 500	2	> 5,0	1

Legt man die Orientierungswerte des BML aus dem Jahr 2000 für DON und ZEA zugrunde, zeigt sich, dass nur 2% der Proben ZEA Gehalte über dem Orientierungswert für prä-pupertäre weibliche Zuchtschweine von 0.05 mg/kg aufwiesen. Die Untersuchung der Ernte 2000 auf DON ergab, dass 4 % der Proben über dem DON-Orientierungswert von 1 mg/kg für Schweine lagen. In nur 2 % der untersuchten Proben wurden OTA Gehalte über 3 µg/kg ermittelt, einem Gehalt der laut EG Verordnung 472/2002 vom 12.3.2002 für Lebensmittel (Getreideerzeugnisse) noch als tolerabel angesehen wird. Ein Gehalt von > 200 µg/kg, der nach Krogh (1987) zu Veränderungen an Nieren von Schweinen führen soll, wurde nicht nachgewiesen. Die Ergebnisse lassen auf eine sehr gute Konservierung und Lagerung des Futtergetreides schließen.

Die Untersuchung der Körnermaisproben (1998-2000;n=42) aus dieser Erhebung auf Fumonisine (Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der LMU München, NWG ELISA von < 3µg/kg) ergab 12 positive Proben mit Gehalten von 3 bis 520 µg/kg.

Zum Einfluss der Bodenbearbeitung auf den Fusarienbefall in unterschiedlichen Fruchtfolgesystemen

Siegrid Steinkellner, Vitore Shala-Mayrhofer und Ingrid Langer

Institut für Pflanzenschutz, Universität für Bodenkultur Wien, Peter Jordan-Strasse 82, A-1190 Wien

Im Zusammenhang mit konservierender Bodenbearbeitung wird gerade bei Mais und Weizen immer wieder auf die Gefahr eines verstärkten Fusariumbefalls und die dadurch bedingte Mykotoxinproblematik hingewiesen. Unter österreichischen Produktionsbedingungen bestehen hinsichtlich der Gefahr durch Fusariosen deutliche regionale Unterschiede. Während sie im Trockengebiet Ostösterreichs im allgemeinen nur in einzelnen Jahren als problematisch eingestuft werden, kommt ihnen in den übrigen Anbaugebieten eine entscheidende Bedeutung zu. Auf vier Versuchsstandorten im östlichen und im zentralen Niederösterreich sowie im östlichen Oberösterreich wurden jeweils mindestens zwei verschiedene konservierende Bodenbearbeitungsverfahren der konventionellen (wendenden) Bodenbearbeitung gegenübergestellt. Der Befall durch Fusariosen wurde durch visuelle Bonituren zum Erntetermin sowie durch Auslegen von Samen auf geeigneten Nährböden im Labor erhoben.

Bei Weizen lag auf den beiden Standorten im niederösterreichischen Trockengebiet die durch visuelle Bonitur ermittelte Befallshäufigkeit der Ähren und der, nach Auslegen auf einem Nährboden im Labor, bestimmte Fusariumbefall der Körner, in allen Bodenbearbeitungsvarianten unter 1 % (Versuchsjahr 2000).

Im Vergleich dazu konnten in den feuchteren Anbaugebieten in den Versuchsjahren von 1999 bis 2001 signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Bodenbearbeitungsvarianten hinsichtlich des Ährenbefalls durch Fusarien festgestellt werden. Die höchsten Befallshäufigkeiten wurden jedoch nicht bei Direktsaat, sondern vielmehr in einzelnen Grubbervarianten mit max. 16,3 % erhoben. Die Kontamination des Erntegutes am Standort im östlichen Oberösterreich mit Desoxynivalenol (DON) war minimal bzw. lag unter der Nachweisgrenze. Als vorherrschende Fusarium-Arten wurden *F. avenaceum*, *F. poae* und *F. sporotrichoides* bestimmt. Die Ernteproben aus dem zentralen Niederösterreich zeigten bei vergleichbaren bzw. niedrigeren Befallswerten eine wesentlich höhere DON-Kontamination, die vorherrschenden Fusarium-Arten waren *F. graminearum*, *F. sporotrichoides* und *F. culmorum*. Bei sehr geringem Befallsdruck in den vorliegenden Erhebungen konnten zwischen visuell erhobenen Befallswerten und der Mykotoxinkontamination des Erntegutes keine eindeutigen Zusammenhänge festgestellt werden.

Bei Körnermais zeigten sich auf den beiden Standorten in den feuchteren Anbaugebieten weder bei visueller Bonitur der Maiskolben (5,7 - 13 % BH) noch nach Auslegen von Maiskörnern auf einem Kulturmedium (4,5 - 18,3 % BH) Unterschiede zwischen den einzelnen Bodenbearbeitungsvarianten. In einzelnen Varianten lag der durchschnittliche DON-Gehalt über dem Richtwert von 500 µg/kg, Unterschiede zwischen Bodenbearbeitungsvarianten konnten statistisch jedoch nicht abgesichert werden. Als vorherrschende Fusarium-Arten konnten jeweils *F. graminearum*, *F. culmorum* und *F. subglutinans* identifiziert werden.

Die vorliegenden Untersuchungen müssen unter dem Aspekt eines – vor allem witterungsbedingt – sehr geringen Fusarium-Befallsdrucks bewertet werden

Evidence of ochratoxin A detoxification activity of rumen fluid, intestinal fluid and soil samples as well as isolation of relevant microorganisms from these environments

G. Schatzmayr¹, D. Heidler¹, E. Fuchs¹, A. P. Loibner², R. Braun² and E. M. Binder²

¹ Biomin GTI GmbH, Industriestr. 21, A-3130 Herzogenburg; e-mail: gerd.schatzmayr@biomingti.com

² IFA-Tulln, Department of Environmental Biotechnology, Konrad Lorenzstr. 20, 3430 Tulln, Austria

Dietary ochratoxin A (OTA) has a negative impact on performance of chickens and pigs (1, 2, 3). To avoid losses in animal production through intake of this mycotoxin and to prevent the carry over to humans, strategies for counteracting have to be developed. In contrast to physical and chemical detoxification methods inactivation of ochratoxins by enzymatic reactions is a very specific and gentle process. The basis for the development of a new feed additive with this mechanism is the isolation of microorganisms, which are on the one hand highly active concerning OTA-detoxification and on the other hand harmless to animals and humans. Therefore various environments have been investigated to find microorganisms with the capability to degrade or to cleave the phenylalanine-moiety of ochratoxin A. The resulting metabolite, ochratoxin α (OT α), is known to be less or even non-toxic (4, 5).

Chromatographic methods were used for qualification and quantification of ochratoxin A and some of its metabolites. The ochratoxin A, which was used for enrichment- and degradation-studies was produced by *Petromyces albertensis* in liquid culture medium and extracted with chloroform. After evaporation of the solvent OTA was dissolved in Tris-HCl and used for these investigations. Using several enrichment-techniques like variations of culture media, addition of antibiotics, changes of atmosphere in the headspace of culture-flasks, one strain was isolated out of rumen fluid. A partial analysis of the 16 S rDNA gene revealed that this strain is related to *Lactobacillus vitulinus*. Since the relationship is only 99.8% this bacterium is supposed to be a new strain of this species. The same cultivation methods have been used for a screening of microorganisms in different segments of pig-intestine. At the end of enrichment- and isolation-procedures four bacterial strains were obtained. One of these strains was supposed to be *Streptococcus pleomorphus* (similarity: 99.2%), one belonged most probably to *Eubacterium callanderi* (99.8%). The 16 S rDNA gene of the only OTA-degrading strain from the large intestine had a similarity of 99.3% to the respective gene of *Eubacterium callanderi*. Isolate F6, which was out of intestinal fluid obtained from the small intestine of a pig is supposed to be a new strain of *Eubacterium ramulus* (95.7%). Furthermore aerobic bacteria were enriched from soil samples. For this reason soil samples were incubated in a minimal culture-medium containing OTA to favor the growth of OTA-metabolizing strains. Afterwards strains capable of transforming OTA to OT α were isolated. Partial sequencing of the 16S rDNA gene revealed that strains with the highest degradation-activities belonged to the genera *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Rhodococcus*, *Ralstonia* and *Ochrobactrum*. Subsequently these bacteria were compared to *Phenylobacterium immobile* (6) concerning the influence of various factors like temperature, oxygen and addition of phenylalanine. Further studies with *in vitro* models have to show if any of these microbes can be used for the development of a new feed additive to reduce the toxic effects of OTA.

- 1) Rotter, R.G., Frohlich, A.A. and Marquardt, R.R. (1989). Influence of dietary charcoal on ochratoxin A toxicity in Leghorn chicks. *Canadian Journal of Veterinary Research* 53 (4), 449-453.
- 2) Manning, R.O. and Wyatt, R.D. (March 1984). Toxicity of *Aspergillus ochraceus* contaminated wheat and different chemical forms of ochratoxin A in broiler chicks. *Poultry Science* 63, 458-465.
- 3) Haazele F.M., Guenter W., Marquardt R.R. and Frohlich A.A. (1993). Beneficial effects of dietary ascorbic acid supplement on hens. *Canadian Journal of Animal Science* 73 (1), 149-157.
- 4) Fun Sun Chu, Icksam Noh, Chi C. Chang (1972). Structural Requirements for Ochratoxin Intoxication. *Life Science* 11 (10), 503-508.
- 5) Xiao, H., Madhyastha, S., Marquardt, R.R., Li, S., Vodella, J.K., Frohlich, A.A. and Kemppainen, B.W. (1996). Toxicity of ochratoxin A, its openend lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 137, 182-192.
- 6) Wegst W. and Lingens F. (1983). Bacterial degradation of ochratoxin A. *FEMS Microbiology Letters* 17, 341-344.

Effects of *Fusarium*-toxin contaminated wheat in ruminant nutrition

S. Dänicke¹, D. Gädeken¹, K.-H. Ueberschär¹, U. Meyer¹ and H. Scholz²

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

² Clinic for Cattle Diseases, Veterinary School, Bischofsholer Damm 15, D-30173 Hannover, Germany

An experiment was carried out to examine the effects of a *Fusarium*-contaminated wheat (10 mg deoxynivalenol and 0.76 mg zearalenone, ZON, per kg dry matter) on fattening performance and slaughter yields of growing bulls, and on carry over of ZON into tissues and body fluids. In a second study, rumen physiological parameters were investigated in wethers equipped with a rumen fistulae. Moreover, the influences of a detoxifying agent (Mycofix[®]Plus, MP, Biomin GmbH, Herzogenburg, Austria) were considered as an additional experimental factor beside the contamination of the wheat (uncontaminated control wheat, *Fusarium*-toxin contaminated wheat). The experiments were designed according to a complete two by two factorial model of ANOVA which required the testing of both the control diet and of the contaminated diet either in the absence or presence of MP.

The fattening experiment with bulls (n=14 per treatment) covered the live weight range between 244 kg and 460 kg. The respective wheat batches were included in the concentrate portion at 64 %. Concentrates were fed restrictively whereas maize silage was offered for *ad libitum* consumption. Daily dry matter intake and live weight gain (kg per animal and day) were 7.40, 7.52, 7.51 and 7.49 and 1.367, 1.296, 1.380 and 1.307 for bulls fed the unsupplemented control wheat, the supplemented control wheat, the unsupplemented and *Fusarium* toxin contaminated wheat and the supplemented *Fusarium* toxin contaminated wheat, respectively. Feeding of the *Fusarium* toxin contaminated wheat resulted in a reduced dressing percentage, an increased weight of the emptied gastro-intestinal tract and a reduced weight of the testicles. No MP-effects were seen for these parameters. ZON or its metabolites were not detected in edible tissues.

The rations for wethers were composed of hay and of the respective wheat batch at a ratio of 1 to 1 on a dry matter basis. The results of the rumen physiological parameters revealed that the molar ratios of short chained volatile fatty acids and ammonia concentration in rumen fluid remained unchanged in response to dietary treatments whereas the addition of MP to the diets buffered the postprandial decrease in rumen pH. This effect was independent of the mycotoxin contamination of the wheat. The pH-differences in rumen fluids collected from wethers fed the MP-supplemented and unsupplemented rations amounted 0.2 to 0.3 on average in the time period between 1.5 h and 5 h after feeding. The kinetic profile of the *in sacco* dry matter degradation indicated a reduced degradation velocity for wheat straw incubated in wethers fed the mycotoxin contaminated rations whereas no changes were obvious when alfalfa hay was incubated. MP had no effect on the kinetics of dry matter degradation.

The effect of fusarium toxin contaminated maize on performance and animal health of female weaning piglets (Einfluss von Fusarium-toxin kontaminiertem Mais auf die Leistung und Tiergesundheit weiblicher Absatzferkel)

Susanne Döll¹, S. Dänicke¹, Ute Schnurrbusch² und G. Flachowsky¹

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

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

Fusarium toxins in general and in particular zearalenone (ZON) and deoxynivalenol (DON) cause major problems not only in the German livestock production. Especially pigs react most sensitive to feedstuffs contaminated with these mycotoxins. ZON is known to exhibit estrogenic properties and is therefore associated with reproductive disorders and causes hyperestrogenism. DON intoxication can result in a decreased feed intake, a modulated immune response or an impaired integrity of the intestinal mucosa. However, adverse effects will only occur if critical concentrations of mycotoxins are exceeded. The Federal Ministry of Consumer Protection, Food and Agriculture published orientation values for critical concentrations of ZON and DON in complete diets for farm animals, but the literature data for these values were not always consistent. Furthermore, in practice adverse effects are reported at dietary DON- and ZON-concentrations below the orientation values. The present study was designed to scrutinize the critical concentrations of DON and ZON in diets for prepubertal female pigs.

One hundred female weaning piglets were allotted to 20 pens, 4 pens per treatment group. The piglets were fed a starter diet containing 50% maize. Zero, 12%, 25% 50% and 100% of this uncontaminated control maize were substituted by Fusarium toxin contaminated maize to give increasing ZON and DON concentrations in the diets (see Table 1). The animals received the diets over a live weight range from $12.4 \pm 2.2\text{kg}$ to $32.5 \pm 5.6\text{kg}$. Live weight (per animal) and feed consumption (per pen) were recorded once a week. At the end of the trial the animals were slaughtered. Organ weights were recorded and blood and tissue samples were taken for further investigations. Possible target organs of these mycotoxins were examined for conspicuous diversifications.

Table 1: Effects of increasing dietary DON and ZON concentrations on feed intake, daily weight gain and the relative uterus weight of female weaning piglets

ZON (mg/kg)	DON (mg/kg)	Feed intake (kg/d)	Daily weight gain (kg/d)	Uterus weight (mg/kg LW)
0.010	0.190	1.071 ^b	0.584 ^b	413 ^b
0.064	0.796	1.086 ^b	0.604 ^b	528 ^b
0.148	0.988	1.074 ^b	0.604 ^b	395 ^b
0.223	1.936	1.017 ^b	0.563 ^b	481 ^b
0.419	3.924	0.830 ^a	0.471 ^a	811 ^a
ANOVA (probability)				
Group		<0.001	<0.001	<0.001
Linear		<0.001	<0.001	<0.001
Quadratic		0.002	0.001	0.001
PSEM		0.014	0.021	48

Feeding a diet containing 0.419mg ZON/kg and 3.924mg DON/kg resulted in a significant decrease in daily weight gain mainly due to the decrease in feed intake. The relative uterus weight of this group was increased by almost 100% compared to the control group. The weights of other organs remained unaffected. The serum concentration of the immunoglobulines A, G and M were not influenced by the mycotoxin treatment.

Bestimmung von DON und DOM-1 im Urin vom Schwein mittels HPLC/APCI-MS

E: Razzazi¹, J. Böhm¹, B. Kettner¹, W. Hochsteiner², H. Kahlbacher²

¹ Institut für Ernährung / Veterinärmedizinische Universität Wien

² II. Medizinische Universitätsklinik für Klautiere / Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1 / A-1210 Wien

DON kommt als Hauptvertreter der B-Trichothecene in österreichischen Futtermitteln vor. Zu den Vertretern der B-Trichothecene zählen NIV, DON, 12AcDON, 3AcDON, NIV, Fus-X, die toxikologisch unbedenklicher als Vertreter der A-Trichothecene beurteilt werden. Gegensätzliche Berichte über Immunsuppressionen bei Tieren liegen vor und die Wirkungen der B-Trichothecene können möglicherweise noch nicht ganz richtig eingeschätzt werden. Sie sind als Wegbereiter für Infektions- bzw. Invasionskrankheiten einzustufen.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, in welcher Form und auf welche Weise die Schweine DON metabolisieren. In einer Studie wurden zwei Gruppen zu je 7 Tieren mit kontaminiertem Getreide (Hafer, Versuchsgruppe) und mit unbelastetem (Kontrollgruppe) gefüttert. Die Tagesdosis betrug in der Versuchsgruppe eine Belastung von 0,23 mg/kg KM u. Tag. Der Versuch dauerte 14 Tage und während dessen wurde Spontanharn gesammelt. Am Ende des Versuches wurden alle Tiere geschlachtet und Proben entnommen. Die Harnproben wurden auf DON und DOM-1 analysiert. Für die Analyse des Futtermittels (kontaminierte Hafer) wurde eine HPLC Methode speziell entwickelt, die imstande ist B-Trichothecene inklusive DOM-1 zu trennen. Die gewählte Analysenmethode basiert auf einer HPLC-MS-Methode unter Verwendung eines APCI-Interfaces. Die Extraktion und Probenvorbereitung wurde mit Mycosep-Säulchen No. 277 (BiominGTI, Herzogenburg) und in einem Schritt durchgeführt. Ein Gradientensystem wurde für die Trennung von DON, DOM-1, 15AcDON, 3AcDON und NIV verwendet. Der HPLC Fluss betrug 1ml/min ohne Split und wurde direkt mit dem APCI-Interface gekoppelt. Die Detektion mittels Massenspektrometer erfolgte im negativen Modus, in welchem die untersuchten Substanzen eine bessere Ionisierung zeigten als im positiven. Die Quantifizierung im Harn und Hafer erfolgte im SIM Modus und unter Verwendung von Molekülpeaks und der Hauptfragmente. Die entwickelte Methode wurde validiert.

Bei allen Tieren der Kontrollgruppe sowie bei der Versuchsgruppe (vor dem Beginn der Fütterung) konnte DON nicht oder nur in Spuren im Harn nachweisen werden (DOM-1 nicht nachweisbar). Nach dem Start des Fütterungsversuchs und bereits am ersten Tag konnte ein Anstieg der DON und DOM-1 Konzentration im Urin der Versuchsgruppe festgestellt werden. Ab dem zweiten Fütterungstag im Verlauf des zwei wöchigen Versuchs konnte ein Konzentrationsplateau im Harn bei gleicher Futteraufnahme beobachtet werden.

DOM-1 konnte in den 24 untersuchten Schweineharnproben der Versuchsgruppe im Mittelwert von 32 ppb (max. 200 ppb) und DON im Mittel von 580 ppb (max. 8 ppm) bestimmt werden. Die beschriebene HPLC/MS Methode eignet sich somit vortrefflich zur Metabolitenbestimmung des DON sowie zu diagnostischen Zwecken einer DON-Belastung.

The role of oxidative stress in the toxicity of ochratoxin A

J.Fink-Gremmels and G.J. Schaaf

Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, Yalelaan 16, 33508 TD Utrecht, The Netherlands

Introduction: Ochratoxin A (OTA), a mycotoxin produced by various *Aspergillus* and *Penicillium* species, is known to affect multiple sites of the nephron: acute exposure seems to affect mainly the post-proximal parts, while chronic exposure leads predominantly to damage in the proximal tubule where OTA accumulates due to selective uptake. The exact mechanisms involved in OTA cellular toxicity are still under investigation. OTA inhibits cellular protein synthesis, which may account for many systemic effects attributed to OTA, but which cannot explain the apparent site-specific toxic effects. Several studies have proposed the involvement of oxidative stress, as OTA was found to induce lipid peroxidation in sub-cellular fractions as well as in intact cells. Thus, it was the aim of the present study to assess the pro-oxidant effects of OTA in the kidney by using two different *in vitro* models, primary rat proximal tubule cells (PT) as well as the a continuous cell line (LLC-PK₁).

Materials and Methods: LLC-PK₁ cells were obtained from ATCC (CL101) and cultured in medium 199 supplemented with 5% FCS and 2 mM glutamine. Rat proximal tubule cells were freshly isolated as described elsewhere. Cells were seeded on collagen pre-coated 60 mm culture dishes in supplemented DMEM/F12 for all experiments. Cell viability was assessed in all experiments by means of the MTT assay. Furthermore, the cellular glutathione (GSH) levels were determined in all experiments measuring total glutathione according to the Griffith method. Following exposure to OTA, ROS-production was determined with the fluorescence probe 2',7'-dihydrochloro-dihydrofluorescein. Alpha-tocopherol (TOCO) and n-acetylcysteine (NAC) served as anti-oxidants.

Results: OTA induced on both cell types a dose-dependent production of reactive oxygen species (ROS) over a concentration range from 1 to 200 microMol. The OTA-induced ROS response was significantly reduced following treatment with TOCO. However, TOCO was ineffective in protecting cells against the (cyto)toxic effects of OTA. In contrast, NAC treatment of cells completely reversed the OTA-induced increase in ROS levels and OTA cytotoxicity. Furthermore, NAC limited the GSH depletion in OTA exposed PT- and LLC-PK₁ cells, and prevented the formation of 8-oxyguanine, an indicator of oxidative DNA damage.

Discussion and Conclusions: The described experiments confirm a significant role of oxidative stress in the toxicity of OTA as it induces the spontaneous production of ROS by decreasing cellular GSH levels within 24 h resulting in loss of cell viability. TOCO, a lipophilic anti-oxidant scavenging particularly peroxy- and alkoxy radicals, thus preventing the propagation of LPO, provided incomplete protection against OTA induced toxicity. In contrast, NAC, serving as pre-cursor for cellular GSH, did effectively prevent GSH-depletion by OTA and subsequent loss of cell viability. These findings point towards the pivotal role of cellular GSH maintenance as defense mechanism and possible route of excretion following binding of OTA to GSH. NAC also prevented the formation of 8-oxyguanine DNA adducts by OTA, which was for the first time demonstrated in renal cells.

Genetic relationships of ochratoxin producing *Penicillia*

R. Geisen and P. Färber

Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Haid-und-Neu-Str. 3, 76131 Karlsruhe

It has long been described in the scientific literature that *P. verrucosum* is the only species of the genus *Penicillium*, which is able to produce ochratoxin. However current chemotaxonomical and genetic characterization of ochratoxin producing *Penicillia* strongly support the view that two species, in particular *P. nordicum* and *P. verrucosum* are able to produce ochratoxin. The chemotaxonomical and genetic data are completely coincidental. *P. nordicum* is a species which can produce high amounts of ochratoxin and occur mainly as contaminant on proteinaceous foods. It cannot produce citrinin. The natural habitat of *P. verrucosum* are plants and plant type products. This species is able to produce citrinin in parallel to ochratoxin. Different genetic typing methods, like RAPD PCR and sequencing of the ITS regions have been performed and give clear evidence for the diversity of both species. The two observed RAPD groups has a different secondary metabolite profile, which clearly show the phenotypic and genetic differences of the two species. The impact of these facts on ochratoxin production will be discussed.

Wirkung von Ochratoxin A und Ochratoxin C auf die Monozyten- und Lymphozytenfunktion

H. Köhler¹, M. Heller¹, H. Rosner², W. Erler¹, U. Gräfe³, G. Müller¹

¹ Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Fachbereich 4, Jena, Naumburger Strasse 96a, D - 07743 Jena

² Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, FGr 92, Thielallee 88-92, D - 14195 Berlin

³ Hans-Knöll-Institut für Naturstoffforschung, Beutenberg 11, D - 07745 Jena

Die Wirkung von Ochratoxinen in praxisrelevanten Konzentrationen auf immunologische Funktionen bei Mensch und Tier wurde bisher nur wenig untersucht. Beim Menschen beträgt entsprechend einer Studie aus Deutschland die mittlere OTA-Konzentration im Serum 0,27 ng/ml, das Maximum liegt bei 2,03 ng/ml (1). In gepoolten Seren von Zucht- und Mastschweinen wurden Mittelwerte von 1,04 ng/ml bzw. 0,77 ng/ml bei Maximalwerten von 148,2 ng/ml ermittelt (2). In natürlich kontaminierten Futter- und Lebensmitteln kann neben Ochratoxin A (OTA) auch Ochratoxin C (OTC) vorkommen (3,4), ihm wird aber eine geringere Toxizität als OTA zugeschrieben.

Um die Effekte der unter praktischen Bedingungen vorkommenden Mykotoxinbelastungen im Organismus auf immunologische Funktionen zu erkennen, wurden In-vitro-Experimente durchgeführt. Dabei wurde die Wirkung eines OTA-haltigen *Aspergillus-ochraceus*-Rohtoxins, von OTA, OTC und einer mit OTC identischen HPLC-Fraktion aus dem Rohtoxin (RE 2) in Konzentrationen von 0,46 - 3000 ng/ml untersucht. Als Prüfparameter dienten Funktionen von Lymphozyten (metabolische Aktivität, mitogeninduzierte Proliferation, Expression des Aktivierungsmarkers CD25, Beeinflussung des Zellzyklus) sowie von Monozyten (Bildung freier Sauerstoffradikale, Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF α). Des Weiteren wurde untersucht, ob durch Zusatz von Phenylalanin oder seinem Analogon Aspartam bzw. von den Radikalenfängern Piroxicam oder Indomethacin die durch OTA bedingte Hemmung der Lymphozytenproliferation aufgehoben werden kann.

Unsere Ergebnisse weisen auf eine komplexe Wechselwirkung von OTA und OTC mit dem Immunsystem hin, wobei die mit OTC identische HPLC-Fraktion RE 2 eine bis zu 100-fach stärkere Wirkung aufwies als reines OTA. In hohen Konzentrationen war eine unspezifische Suppression aller untersuchten Immunzellfunktionen festzustellen, die mit zytotoxischen Effekten in Zusammenhang stand. Durch niedrige Konzentrationen wurden vor allem Monozytenfunktionen auf unterschiedliche Weise beeinflusst. Die Bildung freier Sauerstoffradikale und von TNF α wurde gehemmt, die Produktion von IL-6 dagegen stimuliert, allerdings mit deutlichen individuellen Variationen. Dies scheint bedingt zu sein durch eine spezifische Wechselwirkung der Ochratoxine mit bestimmten funktionellen Mechanismen.

Der Zellzyklus mitogenstimulierter Lymphozyten wurde durch alle vier Mykotoxinpräparationen konzentrationsabhängig in der G0/G1-Phase und z. T. in der G2/M-Phase gehemmt. Phenylalanin und Aspartam beeinflussten die Ochratoxin-Wirkung nicht. Sowohl durch Piroxicam als auch durch Indomethacin wurde die OTA-bedingte Hemmung der Lymphozytenproliferation weiter verstärkt.

Unsere Untersuchungen weisen darauf hin, dass Immunmodulationen bereits durch Mykotoxin-Konzentrationen hervorgerufen werden können, die bei "geringer" Belastung des Organismus auftreten können und die noch nicht mit klinischen Symptomen oder Leistungseinbußen einhergehen.

Literatur bei den Verfassern

Haben Enzym polymorphismen fremdstoffmetabolisierender Enzyme Einfluß auf die Genotoxizität von Ochratoxin A?

Stefan Lebrun¹, Harald Schulze², Klaus Golka¹ und Wolfram Föllmann¹

¹ Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund, Ardeystr. 67, 44139 Dortmund

² Urologische Klinik der Klinikum Dortmund gGmbH, Westfalendamm 403, 44143 Dortmund

Das Mykotoxin Ochratoxin A (OTA) wird von verschiedenen Aspergillus und Penicillium Spezies produziert und weltweit als Kontaminante von Lebens- und Futtermitteln angetroffen.

Es konnte experimentell gezeigt werden, dass OTA nephrotoxische, immunosuppressive, genotoxische und kanzerogene Wirkung hat. Es steht außerdem in Verdacht für die Entstehung von Tumoren des harnableitenden Systems bei Patienten, die unter der endemischen Balkannephropathie leiden, verantwortlich oder zumindest daran beteiligt zu sein.

Der Mechanismus, der zu einer DNA-Schädigung durch OTA führt ist bislang noch nicht aufgeklärt. Es ist eine noch offene Frage, ob eine metabolische Aktivierung von OTA für Effekte in Zielorganen wie der Niere und dem Urothelium notwendig ist oder nicht.

Im Rahmen der hier vorgestellten Studie wurden humane Urothelzellen, die aus Operationsmaterial urologischer Patienten stammten, isoliert und als Primärkulturen kultiviert. An diesen Zellkulturen wurde die Induktion von DNA-Schäden durch OTA mit dem alkalischen Einzelzell-Gelelektrophorese-Assay (Comet-Assay) detektiert.

Mit den Zellen jeder einzelnen Probe wurde ein separater Comet-Assay durchgeführt und analysiert. Es konnte festgestellt werden, dass die verschiedenen Zellen unterschiedlich stark auf OTA reagierten, d.h. die resultierenden Taillängen differierten von Kontrollniveau (keine erhöhten DNA-Schäden im Vergleich zur Kontrolle) bis zu stark erhöhten Taillängen.

Parallel zur Gewinnung der Gewebeproben wurden Blutproben der entsprechenden Patienten gesammelt. Nach einer Isolierung der Lymphozyten-DNA wurde in dieser der Genotyp des jeweiligen Patienten für verschiedene fremdstoffmetabolisierende Enzyme bestimmt. Analysiert wurden Polymorphismen der N-Acetyltransferase 2, Cytochrom P450 1A2 und 2E1, sowie der Glutathiontransferasen T1, M1, M3 und P.

Korrelationen zwischen der enzymatischen Prädisposition der Gewebespende und der im Comet-Assay resultierenden OTA-Effekte werden vorgestellt und eine möglichen Beteiligung der untersuchten Enzyme an einer Bioaktivierung von OTA diskutiert, wobei die Möglichkeit einer enzymatischen Prädisposition in Bezug auf eine Empfindlichkeit gegenüber dem Mykotoxin Ochratoxin A im Vordergrund steht.

Programmed cell death by interaction of ochratoxin A with other nephrotoxins

G. Schwerdt, F. Weber, C. Schuster, S. Silbernagl, M. Gekle

¹Physiologisches Institut, Universität Würzburg, Röntgenring 9, D - 97070 Würzburg

Ochratoxin A (OTA) at low concentrations is nephrotoxic and chronic exposure may lead to renal failure. But the human body is exposed scarcely to ochratoxin A alone. Other nephritogenic agents, either ingested as food contaminant or therapeutically administered may interact with OTA and thus alter OTA's effect on cells. However, little is known about the interaction of OTA with other substances and their combined effect on cells. Therefore, we determined the effects of co-exposure of OTA and other (potentially) nephrotoxic substances. We measured the activation of the apoptosis inducing enzyme caspase-3, DNA ladder formation (a typical apoptosis marker) as well as the effects on protein content or necrosis in cultured renal cell lines. Cells originally derived from the proximal tubule (IHKE cells, human origin) or the collecting duct (MDCK-C7, canine origin) of the kidney. Both cell lines have been shown to activate the apoptosis pathway after OTA exposure in the nanomolar, and thus relevant, concentration range.

Substances used in combination with OTA included: cadmium, a known nephrotoxin with apoptotic effects; cisplatin (anticancer drug, also a known nephrotoxin with apoptotic effects); GSNO, a NO donor (NO as vasoactive substance); H₂O₂ (generated during oxidative cell stress), cyclosporin A (an immunosuppressive agent with renal side effects); and amphotericin B (antifungal agent with renal side effects). All those substances were used in concentrations which can be found in the tissue. Because of the great number of possible combinations we developed a cost efficient method to determine the effects on cells: measurements were done in 96-well format with the cells cultured directly in 96-well plates. Caspase-3 activity and protein content could thus be determined rapidly and close on one another and necrotic effects in parallel.

The cells responded differently to the combinations: a combination of OTA with cadmium had potentiating caspase-3 activating effects on both cell lines. A combination of OTA with cisplatin also had a potentiating effect on MDCK-C7 cells but antagonistic effects on IHKE cells (this was due to the high apoptosis induction of cisplatin alone in IHKE cells). Combined with an NO-donor, in both cell lines the caspase-3 activation was lower as with both substances when applied alone (i.e. antagonistic effect). A combination with OTA and H₂O₂ was potentiating in the human cell line (IHKE) but additive in the canine cell line whereas OTA combined with cyclosporin A led to an additive caspase-3 activation in both cell lines. OTA combined with the antifungal agent amphotericin B led to antagonistic caspase-3 activation in both cell lines. DNA ladder formation confirmed the above-shown results. Necrotic effects for all combinations tested were very small and additive (i.e. no potentiation or antagonisation) except for cisplatin and H₂O₂ in MDCK-C7 cells where a potentiation was determined.

We conclude that the co-exposure of renal cells to OTA with other substances can enhance or reduce the apoptotic potential of one substance alone depending on the substance and on the cell line investigated. A "harmless" substance can thus convert to a potent cell toxic substance when combined with OTA or other mycotoxins. These first findings show the necessity to further investigate the combined effects of OTA or other mycotoxins with other substances or of mycotoxins with each other.

This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Ge 905/3-4).

Vergleich von Zytotoxizitätsverfahren zur Beurteilung einer Schimmelpilz-Sporenexposition

T. Schulz, K. Senkpiel, H. Ohgke

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Universität zu Lübeck

Durch Schimmelpilze hervorgerufene toxische Gesundheitsschädigungen werden auf die Wirkungen der Mykotoxine zurückgeführt. Vor allem die Beeinträchtigungen durch nutritive Aufnahme der Mykotoxine stehen dabei im Mittelpunkt der Forschung. In jüngster Zeit hat jedoch auch das Interesse an toxischen Auswirkungen von Mykotoxinen nach inhalativer Exposition zugenommen. Das Organic dust toxic syndrome oder auch Fälle von Enzephalopathien werden beispielsweise mit dem Einatmen von Mykotoxinen in Verbindung gebracht. Die Mykotoxine sind u. a. in den Sporen toxinogener Schimmelpilze zu finden. Zur Abschätzung des Gesundheitsrisikos für schimmelpilz-exponierte Personen erscheint somit die Untersuchung von Sporenextrakten auf toxische Eigenschaften sinnvoll. Eine Möglichkeit hierfür stellen die Zytotoxizitätstests dar, von denen drei für diese Studie ausgewählt wurden: der MTT-assay, der MB-assay und der PTGT. In veränderter Form sind diese Tests teilweise schon als unspezifische Screening-Methoden zur Erfassung von Mykotoxinen in verschiedensten Probenmaterialien zum Einsatz gekommen.

Der MTT-assay wurde mit der adhärensten menschlichen Lungenepithelkarzinomzelllinie A549 durchgeführt, basierend auf den Beschreibungen von Alley et al.. Das Testprinzip besteht in einem quantitativen Nachweis der metabolischen Zellaktivität. Das wasserlösliche gelbe Tetrazolium-Salz (MTT) wird hierbei von den metabolisch aktiven Zellen zum wasserunlöslichen Formazan-Salz reduziert.

Der MB-assay wurde wie von Finlay et al. beschrieben durchgeführt. Als Zelllinie wurde hier ebenfalls A549 verwendet. Bei diesem Test werden mittels der Anfärbung von Proteinen und Nukleinsäuren durch Methylene blue lebensfähige Zellen nachgewiesen.

Der PTG-Test (Pollenschlauchwachstumstest) wurde am Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg entwickelt und hier, wie von Kristen et al. vorgeschlagen, durchgeführt. Das Testprinzip besteht in einem quantitativen Nachweis von gewachsener Pollenschlauchmasse durch den Farbstoff Alcian blue.

Die drei Zytotoxizitätstests wurden zunächst hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber elf Mykotoxinen erprobt. Anschließend wurden sie zur toxikologischen Untersuchung von Sporenextrakten aus acht Pilz-Wildstämmen verwendet. Die Sporenextrakte wurden schließlich mittels HPLC-Analytik auf den Gehalt von Mykotoxinen überprüft und die Ergebnisse mit denen der Zytotoxizitätstests verglichen.

Es zeigte sich, dass keine direkte Korrelation der mittels Zytotoxizitätstests erhaltenen Ergebnisse bezüglich des Vorkommens von Mykotoxinen in den Sporenextrakten von Schimmelpilzen aus Wohnräumen abgeleitet werden konnte.

Alley M.C., Scudiero D.A., Monks A., Hursey M.L., Czerwinski M.J., Fine D.L. et al.: Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 48, 589-601 (1988)

Finlay G.J., Baguley B.C., Wilson W.R.: A semiautomated microculture method for investigating growth effects of cytotoxic compounds on exponentially growing carcinoma cells. *Anal Biochem* 139, 272-277 (1984)

Gareis M., Johanning E., Dietrich R.: Mycotoxin Cytotoxicity Screening of Field Samples. In: Johanning E. (ed), *Bioaerosols, fungi and mycotoxins*; New York, 202-213 (1999)

Kristen U., Kappler R.: The Pollen Tube Growth Test. *Methods in Molecular Biology* 43, 189-198 (1995)

Ochratoxin A

Poster

Gehalt von Ochratoxin A und Ergosterol in den Proben von Malz und Bier aus einer lokalen Brauerei

J. Grajewski¹, D. Kiec¹, K. Szczepaniak¹, B. Skladanowska¹, M. Twaruzek¹, J. Böhm²

¹ Institut für Biologie und Umweltschutz, Kazimierz Wielki – Bydgoszczer Akademie,
Chodkiewicza-Str. 30, PL-85-064 Bydgoszcz

² Institut für Ernährung, Veterinärmedizinische Universität, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien

Die Kommission der Europäischen Gemeinschaft setzte Höchstwerte für Ochratoxin A (OTA) in Lebensmitteln fest. Obwohl in der Verordnung der EU Nr. 472.2002 die maximal tolerierbaren Werte für Getreiderohstoffe, alle ihre Verarbeitungsprodukte und Trauben angenommen wurden, fehlt es weiterhin an Richtlinien für Kaffee und seine Verarbeitungsprodukte, Wein, Bier, Kakao und Wurzeln.

In dem zuletzt in Deutschland unter der Aufsicht des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) realisierten Projekt wurde nachgewiesen, dass die OTA-Belastung durch den Bierkonsum 11% der Gesamtbelastung eines Erwachsenen ausmacht.

Viele andere Untersuchungen fanden heraus, dass in mehr als 50 % der untersuchten Biersorten OTA festgestellt werden konnte, obwohl es meist sehr niedrige Konzentrationen waren. Feuchtnasse Ernten während der letzten zwei Jahre in Nordeuropa könnten beigetragen haben, dass Gerste und Malz stärker mit Lagerschimmel befallen sind.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war die saisonale Untersuchung von Malz und Bier aus einer lokalen Brauerei in Pommern, die sehr billige Produkte auf dem Markt anbietet.

In der Zeit vom November 2001 / Januar 2002 wurden aus 4 verschiedenen Partien von nicht gemahlenem und gemahlenem Malz sowie vom Bier "Krajan" vor und nach der Pasteurisation 4 Proben entnommen, in denen man OTA und die Gesamtzahl der Pilze bestimmt hat. Im Malz wurde zusätzlich Ergosterol bestimmt.

Die OTA Analysen wurden mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion, die Probenvorreinigung der Malzproben (nach Extraktion mit 60% Acetonitril) und Bierproben wurden mit den Immunoaffinitätssäulchen OchraPrep^R (Rhone-Diagnostics, UK) durchgeführt.

Ergosterol wurde mittels HPLC und UV-VIS-Detektion mit vorhergehenden Konzentrierung auf Extrelut^R-Säulen (Merck,D), bestimmt.

Die mikrobiologischen Malzuntersuchungen wurden mittels Verfahren nach Koch auf Agar Nährboden YGC durchgeführt. Bier wurde auf dem gleichen Nährboden untersucht, aber mit vorhergehender Filtration mit Hilfe des Membranfilters der Marke Pyrex.

Im gemahlene Malz wurde ein bedeutend höherer Gehalt von Pilzen (max. $6,0 \times 10^5$ KBE je 1g) gezählt, ihre Anwesenheit im Ausmaß von wenigen Kolonien wurde noch in der Würze beobachtet. In allen Partien des untersuchten Malzes wurde ein hohes Niveau von Ergosterol (von 10,4 bis 22 mg/kg) gemessen. Nur in einer Malzlieferung und seinem Schrot wurde OTA zwischen 0,13 und 0,20 µg/kg analysiert.

OTA wurde in 70 % von 40 Proben Würze und Bier nachgewiesen. Die Konzentration von OTA war niedrig und lag zwischen 0,005 - 0,026 µg/l.

Die *Ochratoxin A* - Belastung ausgewählter Lebensmittel aus dem Blickwinkel der vorgesehenen österreichischen Richtwert-Regelung

I. Hainschitz, K. Rieger, H. Siegl

Lebensmitteluntersuchungsanstalt des Landes Vorarlberg Montfortstraße 4 A-6901 Bregenz
Tel: #43(0)5574/511-47099 Fax: #43(0)5574/511-42095 E-Mail: LMUA@vlr.gv.at

In der Kommission zur Herausgabe des österreichischen Lebensmittelbuches werden derzeit die Richtwerte für *Ochratoxin A* (OTA) diskutiert. Das Mykotoxin gilt als stark nephrotoxisch und ist ein Karzinogen mit genotoxischen Eigenschaften. Auf Grund dieser toxischen Eigenschaften wurde vom wissenschaftlichen Lebensmittelausschuss (SCF, 1998) bei einer annehmbaren Tagesdosis von 1,2 – 14 ng/kg Körpergewicht ein Höchstwert von 5 ng/kg vorgeschlagen.

Um den Beitrag von Genussmitteln zu dieser empfohlenen Gesamtaufnahme von OTA zu bestimmen, wurden von der Lebensmitteluntersuchungsanstalt des Landes Vorarlberg in den letzten Monaten Getränke sowie deren Ausgangsstoffe und Zutaten untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf Bier, Fruchtsäften sowie Kaffee und Kaffeeersatz.

Die Kaffee(ersatz)pulver wurden mit einer Methanol-NaHCO₃-Lösung extrahiert und die Lösung durch Immunoaffinitäts-Festphasenextraktion aufgereinigt. Bier und Fruchtsäfte wurden gepuffert direkt auf die Festphasen aufgebracht. Die Analyse erfolgte durch HPLC mit Fluoreszenzdetektion. Eine Absicherung erfolgte durch Überführen des OTA in den Methyl-ester mit Bortrifluorid/Methanol.

Es wurden 26 Bierproben untersucht. Der Mittelwert lag bei 0,018 µg/l mit Höchstwerten von 0,04 µg/l. Die Untersuchung von verschiedenen Fruchtsäften zeigte, dass bei 34 von 37 Proben die OTA Belastungen unter der Nachweisgrenze von 0,01 µg/l lag. Ein Traubensaft war allerdings mit 0,31 µg/l belastet.

Die Untersuchung der Kaffeepulverproben zeigte ein ähnliches Bild. Bei den 39 untersuchten Proben lagen 31 unter der Nachweisgrenze von 0,2 µg/kg. Mit 10,5 µg/kg lag der höchste Wert aber deutlich über dem Richtwert von 3 µg/kg. Von 15 im Gastgewerbe gezogenen bereits aufgebrihten Kaffeeproben lagen alle unter der Nachweisgrenze.

Die Analyse von Kaffeeersatz und Kaffeemitteln lieferte wesentlich höhere Werte. Von 47 Proben lagen zwar 13 unter der Nachweisgrenze, aber 23 hatten einen OTA Gehalt von über 10 µg/kg. Bei immerhin noch 8 Proben konnte ein Wert von über 100 µg/kg nachgewiesen werden mit einem Höchstwert von 210 µg/kg. Weitere Untersuchungen belegten dass der OTA-Eintrag über die bei der Herstellung verwendete Trockenfrüchte (bis 650 µg/kg) erfolgt.

Wenn die vom SCF vorgeschlagene Höchstaufnahme von 5 ng pro Tag und kg Körpergewicht zu Grunde gelegt wird, resultiert für eine 60 kg schwere Person ein Wert von 0,3 µg/Tag. Das bedeutet bei einem Kaffeeersatz mit 100 µg/kg OTA und dem Konsum nur einer Tasse (5 – 7 g Pulver), dass alleine aus dieser Quelle diese Höchstaufnahme deutlich überschritten wird. Der Eintrag über die restliche Nahrung wie Cerealien, die für etwa die Hälfte der OTA-Aufnahme verantwortlich sind, bleibt hier unberücksichtigt.

Ein Richtwert in der Größenordnung von 3 µg/kg ist daher sinnvoll bis die Festlegung der Höchstgehalte auf Grundlage des ALARA –Prinzips (as low as reasonably achievable) erfolgt. Die Überprüfung der Lebensmittel auf *Ochratoxin A* durch die amtliche Lebensmittelkontrolle ist ein notwendiger Beitrag zum Schutz der öffentlichen Gesundheit und zur weiteren Reduktion der Aufnahme.

Vorkommen und Bestimmung von Ochratoxin A in Glühwein

M. Reutter

Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt
Institut für Tiergesundheit und Lebensmittelqualität GmbH
Gutenbergstraße 75-77, 24116 Kiel

Im Rahmen einer Markterhebung wurden im Zeitraum November 2000 bis Januar 2002 Glühweine und Punschgetränke aus dem Einzelhandel Schleswig-Holsteins auf ihren Ochratoxin A (OTA)-Gehalt hin untersucht. Neben Getränken auf Rotweinbasis wurden auch entsprechende Produkte auf Weißwein- und Fruchtweinbasis, sowie Kindergetränke auf Fruchtsaftbasis untersucht.

Die Bestimmungen wurden nach einem europäischen Normentwurf zur Bestimmung von OTA (pr.EN 14133) durchgeführt.

Insgesamt 56 verschiedene Rotweinprodukte von 23 verschiedenen Herstellern/Abfüllern auf Rotweinbasis wurden untersucht. Neben den klassischen Glühweinen wurden auch Punschgetränke mit Alkoholzusatz und Feuerzangenbowlezubereitungen mit einbezogen. In allen Proben lag der OTA Gehalt oberhalb der Bestimmbarkeitsgrenze von 0,01 µg/l, das 90%-Perzentil bei 0,88 µg/l. 10,7% der Proben wiesen einen OTA Gehalt von mehr als 3 µg/l auf. Der Maximalwert einer Punschspezialität lag bei 7,54 µg/l. Bei einer Überprüfung des Herstellungsprozesses dieses Produkts konnte als Ursache die spezielle Weinauswahl hierfür ermittelt werden. Anstelle des dort üblicherweise eingesetzten italienischen Grundweines mit einem OTA Gehalt von < 1µg/l, wurde in diesem Fall sogenannter „Aufzugswein“ eingesetzt. Er wird aus Restpartien und Rückläuferware verschiedenster Proveniezen durch Entkorken gewonnen. Ein OTA Eintrag aus den verwendeten Glühweinessenzen sowie des zugesetzten Rums konnte ausgeschlossen werden.

Bei den 24 verschiedenen Glühweinen auf Weißwein- oder Fruchtweinbasis sowie den Glühpunschen auf Fruchtsaftbasis war nur in 45,8% der Proben OTA bestimmbar. Das 90%-Perzentil lag bei 0,04 µg/l, der Maximalwert bei 0,10 µg/l.

Die OTA Quelle ist in allen Produkten auf die Qualität der entsprechenden Ausgangsweine oder Säfte zurückzuführen. Kommerziell erhältliche Glühweingewürzproben (7 von 11) enthielten zwar z.T. OTA bis zu 3,5 µg/kg, bei entsprechender Dosierung von 2-10 g/l Flüssigkeit kann aber ein maximaler Anteil von 0,04 µg/l auf deren Eintrag zurückgeführt werden.

Ochratoxin A in maternal and fetal blood and in maternal milk

Jacek Postupolski¹, Kazimierz Karlowski¹ and Paweł Kubik²

¹ National Institute of Hygiene, Department of Food Research, 24 Chocimska Street, 00-791 Warsaw, Poland

² Mother and Child Institute, 17A Kasprzaka Street, 01-211 Warsaw, Poland

Ochratoxin A levels were measured in blood serum of mothers and fetuses and in mothers' milk. The mean concentration of OA in maternal serum was 1.14 ng/ml and in umbilical cord blood serum it was 1.96 ng/ml. The mean ratio of OA concentrations in maternal and fetal blood serum was 1.96. In maternal milk OA was found in 5 out of 13 studied samples. The mean intake of OA with mother's milk was not exceeding the acceptable daily intake by adults, nevertheless it was near 60% of TDI. The OA concentration ratio in maternal blood serum versus that in milk was 0.0058 on average. These results confirm the correlation between OA concentration in maternal and fetal blood serum, and between OA concentration in maternal serum and milk.

Bestimmung von Ochratoxin A in gerösteten Kaffee mittels ASE

H. Klaffke, I. Mehlitz, R. Tiebach

FG 222 - Mykotoxine und Kontaminanten im BgVV - Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Thielallee 88-92, 14195 Berlin

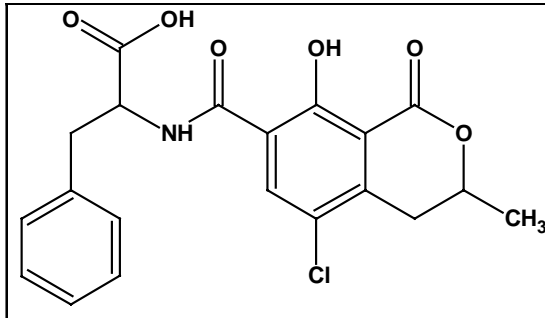


Abbildung 1: Struktur von Ochratoxin A

Ochratoxin A (OTA; Abbildung 1) ist ein Mykotoxin, das von verschiedenen Pilzen der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* gebildet werden kann. Für dieses Mykotoxin konnten in verschiedenen Tierversuchen karzinogene, nephrotoxische, teratogene und immuntoxische Eigenschaften ermittelt werden. Diese toxikologischen Wirkungen bewogen auch das Scientific Committee on Food einen temporären TDI von 5 ng OTA/kg Körpergewicht pro Tag zu empfehlen.

Wie umfassende Untersuchungen der Belastungssituation zu Ochratoxin A in Deutschland (1995-1998) gezeigt haben, sind in einer Vielzahl von Lebensmitteln, zu denen auch Kaffee gehört, deutliche Ochratoxingehalte nachweisbar.

Für Kaffee und daraus hergestellte Produkte, allen voran für Röstkaffee sind in den letzten Jahren viele verschiedene immunchemische und chromatographische Verfahren entwickelt worden. Bei den Methoden hat sich vor allem die Bestimmung mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion nach zweistufiger Aufreinigung über SPE-Phenyl- und Immunaффinitätssäule als besonders effizient und robust bewährt.

Einige Studien wiesen in den letzten Jahren darauf hin, dass die oftmals auftretenden Analysenprobleme bei der Bestimmung von OTA in Röstkaffee zum einem durch eine nicht korrekte Probenahme als auch durch eine unvollständige Extraktion des Ochratoxins aus der Lebensmittelmatrix verursacht werden.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde deshalb die Extraktionsproblematik genauer betrachtet, wobei vor allem die Leistungsfähigkeit moderner Extraktionssysteme, wie die der beschleunigten Lösungsmittelextraktion (Accelerated Solvent Extraction; ASE), mit der in der Routine gebräuchlichen zweistufigen Extraktion (Schütteln, Ultraschall) der Slurry (Nassaufschlemmung) verglichen wurde.

Die Versuche an dem natürlich kontaminierten Röstkaffee zeigten, dass nach geeigneter Vermahlung des Materials und der damit verbundenen Homogenisierung mit der ASE vergleichbare bzw. bessere Ergebnisse erhalten werden konnten als mit der herkömmlichen Methode. Dabei lag der Vorteil der ASE vor allem in der Zeitersparnis und der besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Modulation der zytotoxischen Aktivität von humanen natürlichen Killerzellen durch Ochratoxin A und C

M. Heller, H. Köhler, B. Burkert, B. Rohrmann, S. Thierbach, G. Müller

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

Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) sind über ihre Funktion definierte Immunzellen, die eine spontane zytotoxische Aktivität gegen eine Vielzahl von Tumorzellen und virusinfizierten Zellen zeigen. NK-Zellen spielen somit eine wichtige Rolle bei der Verhinderung der Entstehung von Tumoren und bei der Abwehr von Virusinfektionen. Die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen kann sowohl durch verschiedene Erkrankungen als auch durch toxische Einflüsse, wie z.B. Mykotoxine, verändert werden.

Da neben akut toxischen sowie genotoxischen und kanzerogenen Wirkungen von Ochratoxin A (OTA) in der Literatur auch immunmodulatorische Effekte beschrieben wurden, sollte in unsere immunologischen Arbeiten zu diesem Toxin auch der Effekt auf die zytotoxische NK-Zellfunktion einbezogen werden. Dabei waren vor allem subtoxische Konzentrationen, wie sie in Lebensmitteln und Futtermitteln zu finden sind, von besonderem Interesse. In früheren eigenen *in vitro*-Versuchen mit verschiedenen permanenten Zelllinien und *in vivo*-Versuchen am Schwein hatten wir bei zum Teil sehr niedrigen Konzentrationen nicht nur hemmende sondern auch stimulierende Einflüsse auf die Zytokinausschüttung sowie auf bestimmte Infektionsabwehrmechanismen festgestellt.

Ausgehend von der Tatsache, daß OTA stets in Verbindung mit sekundären OTA-Metaboliten, wie Ochratoxin C (OTC), in Nahrungs- und Futtermitteln vorkommt, wurden in die Untersuchungen sowohl reines kristallines OTA als auch eine *Aspergillus-ochraceus*-Rohtoxinpräparation sowie synthetisches OTC und eine HPLC-Fraktion des Rohtoxins einbezogen. Die Rohtoxinpräparation enthielt neben OTA ca. 5% OTC. Die HPLC-Fraktion bestand nur aus OTC. Als permanente Zelllinien kamen die humane natürliche Killerzelllinie NK-92 als Effektorzelllinie und die humane Lymphoblastenzelllinie K-562 als Targetzelllinie zum Einsatz. Parallel zum Einfluß der verwendeten Ochratoxin-Präparationen auf die zytotoxische Aktivität von NK-92 ermittelten wir auch den zytotoxischen Effekt auf diese Zelllinie selbst mittels MTT-Test.

Ein eindeutiger zytotoxischer Einfluß konnte bei den verwendeten Konzentrationen nur bei synthetischem OTC und der HPLC-Fraktion ermittelt werden. Eine 50%ige Wachstumshemmung (IC_{50} -Werte) lag beim synthetischen OTC bei ca. 5000 ng/ml und bei der HPLC-Fraktion bei ca. 500 ng/ml. In dieser Hinsicht erwies sich demzufolge NK-92 im Vergleich zu anderen Zelllinien, wie z. B. der humanen Monozytenzelllinie THP-1, als relativ unempfindlich.

Alle verwendeten Ochratoxin-Präparationen führten mit zunehmender Konzentration zur Hemmung der zytotoxischen Aktivität von NK 92, wobei die Hemmkonzentrationen bei den einzelnen OTA-Präparationen unterschiedlich ausfielen. Die IC_{50} -Werte betragen für OTC ca. 800 ng/ml und für die HPLC-Fraktion ca. 100 ng/ml. Reines OTA und die Rohtoxinpräparation zeigten bis 1000 ng/ml nur eine leichte Hemmung. 1 bis 10 ng/ml führten außer bei der HPLC-Fraktion zu einer geringen Stimulierung der zytotoxischen Aktivität von NK-92. Somit beeinflussten OTA und OTC bereits im subtoxischen Bereich die NK-Zell-Aktivität in unterschiedlicher Weise.

Bei allen Untersuchungen wurden mit den OTC-Präparationen stärkere Hemmwirkungen bei niedrigeren Konzentrationen erzielt, als mit dem Roh- und Reintoxin.

Das bedeutet, daß entgegen den meisten Angaben aus der Literatur OTC die wirksamere Substanz gegenüber OTA darstellt. Folgen der Beeinflussung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen durch Ochratoxin *in vivo* im Hinblick auf die vorwiegend anti-tumorigene Wirkung von NK-Zellen lassen sich zwar vermuten, sind aber nach diesen *in vitro*-Untersuchungen nur schwer abzuschätzen.

Vorkommen von Ochratoxinen in Gewürzen

Rainer Scheuer und Manfred Gareis

Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach

Gewürze stellen einen Vektor für die Belastung von Lebensmitteln mit Mykotoxinen dar. Im Zusammenhang mit der Ochratoxin-Problematik wurden über einen Zeitraum von ca. 2 ½ Jahren nahezu 700 Einzelproben von Gewürzen unterschiedlicher Herkunft auf ihre OTA/OTB-Gehalte untersucht. Dabei wurden mehr als 50 verschiedene Gewürzarten, die in 18 übergeordnete Gruppen zusammengefaßt wurden, berücksichtigt.

Die OTA-Kontamination der meisten Gewürzproben lag unter der Nachweisgrenze. Auffällige Belastungen wurden für Chili mit einem Median von fast 2 µg/kg und einem Maximalwert von mehr als 40 µg/kg ermittelt. Auch bei Paprika konnte in einer Probe ein recht hoher Wert von ca. 19 µg/kg gefunden werden und bei Pfeffer lag der höchste Wert bei ca. 4 µg/kg. Die Meßwerte für das OTB liegen in der Regel um gut eine Zehnerpotenz unter den Meßwerten für das OTA.

Bezogen auf die Herkunftsregionen der Gewürze waren Proben aus der Region „Südostasien mit Indien“ höher kontaminiert als entsprechende Proben aus Europa, Amerika, Afrika und Vorderasien. Die mit OTA hoch belasteten Paprikaprobe stammten ausschließlich aus Israel. Diese Ergebnisse waren Anlass dafür, dass dort nun vor dem Export Kontrollen zur Mykotoxinbelastung durchgeführt werden.

Tabelle: Medianwerte und Maximalwerte der OTA/OTB-Gehalte bei Gewürzen

Gruppen	Probenzahl	OTA-Med	OTA-Max	OTB-Med	OTB-Max
Blüten	8	0,19	1,06	n.n.	n.n.
Chili	11	1,95	41,83	0,12	2,71
Fruchtgewürze	31	n.n.	0,47	n.n.	15,07
Gemüse	50	n.n.	0,95	n.n.	0,10
Koriander	15	n.n.	0,10	n.n.	n.n.
Knoblauch	47	n.n.	0,45	n.n.	0,05
Kräuter	125	n.n.	0,67	n.n.	5,30
Muskat	16	n.n.	0,12	n.n.	n.n.
Nüsse/Kerne	28	n.n.	0,10	n.n.	n.n.
Paprika	94	n.n.	18,89	n.n.	1,44
Pfeffer	68	n.n.	3,80	n.n.	4,59
Pilze	8	n.n.	0,12	n.n.	n.n.
Rhizom	10	0,08	1,90	n.n.	0,05
Rindengewürze	8	n.n.	0,53	n.n.	n.n.
Samen	48	n.n.	0,91	n.n.	0,14
Umbelliferen	43	n.n.	0,74	n.n.	n.n.
Zwiebel	64	n.n.	0,25	n.n.	0,10
Sonstige	7	n.n.	0,77	n.n.	0,09

Med : Medianwert (µg/kg); Max : Maximalwert (µg/kg); n.n.: Wert liegt unter der Nachweisgrenze der Methode (0,01 µg/kg).

Ochratoxinbildung durch *Penicillium verrucosum* auf Gerste in Abhängigkeit der Parameter Wasseraktivität, Wassergehalt und Temperatur

Manfred Gareis und Wolfgang Rödel

Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach

Vor dem Hintergrund der Vermeidungsstrategien einer Ochratoxin A - Belastung von Lebensmitteln und Getränken wurde in den letzten Jahren von der deutschen Brauwirtschaft gefordert, Braugetreide nach der Ernte auf Wassergehalte von 12% zu trocknen, um somit einer Ochratoxin A- Bildung während der Lagerung sicher vorzubeugen zu können.

Ziel des Forschungsvorhabens war es daher, die Ochratoxinbildung durch *Penicillium verrucosum* auf Gerste zu untersuchen und die Parameter Wasseraktivität und Wassergehalt im Hinblick auf sichere Lagerungsbedingungen vergleichend zu ermitteln.

Unter definierten Bedingungen wurden dazu für Braugersteproben Sorptionsisothermen für 10°C, 15°C und 25°C erstellt und Beimpfungsversuche mit einem toxinogenen *P. verrucosum*-Isolat über sechs Wochen Lagerungszeit bei 25 °C durchgeführt.

Eine Ochratoxin A-Bildung auf Gerste durch *P. verrucosum* wurde nach zweiwöchiger Lagerdauer ab einem Wassergehalt von $\geq 19\%$ beobachtet, was a_w -Werten bei 25 °C von 0.83 bzw. 0.82 (adsorptiv bzw. desorptiv) entspricht. Die Toxingehalte stiegen bei Wassergehalten von 20% ($a_{w [ads]} 25\text{ °C}=0.86$) und 21% ($a_{w [ads]} 25\text{ °C}=0.88$) um das 5,8- bzw. das 16,1-fache. Gleichmaßen wurde ein Anstieg der Ochratoxin A-Werte nach vier- und sechswöchiger Lagerung festgestellt (1,2- bis 2,4-fach).

Für Ochratoxin B wurde eine Toxinbildungsgrenze bei 18% Wassergehalt ($a_{w [ads]} 25\text{ °C}=0.81$) ermittelt. Ein Anstieg um den Faktor 1,5 bis 3,2 erfolgte bei zwei Wochen Lagerung bei Wassergehalten von 19% bis 21%. Eine vier- bis sechswöchige Lagerung führte wie bei Ochratoxin A ebenfalls zu erhöhten Toxinkonzentrationen (1,4- bis 2,7-fach).

Die Ergebnisse zeigen zudem, dass die Bestimmung des Wasseraktivitätswertes (a_w) von Braugerste als begleitende Maßnahme zur Lagerungskontrolle und zur Abschätzung der mikrobiologischen Situation sinnvoll ist und daher empfohlen werden kann (mikrobiologische Komponente). Die a_w -Messung kann darüber hinaus auch, unter Berücksichtigung der jeweiligen Lagerungsbedingungen, zur Neubeurteilung und Optimierung der bisher bekannten und geforderten Feuchte-Grenzwerte als objektive Basis genutzt werden (ökonomische Komponente).

Die Untersuchungsergebnisse stehen in Übereinstimmung mit Literaturdaten und belegen zweifelsfrei, dass bei Wassergehalten unter 18% eine Bildung von Ochratoxin durch *Penicillium verrucosum* nicht zu erwarten ist.

Eine Trocknung von Braugerste auf 12% als präventive Maßnahme gegen eine Ochratoxinkontamination, wie verschiedentlich von Seiten der deutschen Brauwirtschaft gefordert, ist den Ergebnissen zufolge nicht erforderlich und erscheint aufgrund damit verbundener Energiekosten auch ökonomisch als nicht sinnvoll.

Analytical evaluation of a trial feeding ochratoxin A to pigs

E. Fuchs¹, E.M. Binder², G. Schatzmayr², D. Heidler² and R. Krska¹

¹ IFA-Tulln, Department of Environmental Biotechnology and Center for Analytical Chemistry, Tel.: ++43 2272 66280 409; Fax.: ++43 2272 66280 403; email: efuchs@ifa-tulln.ac.at

² Biomin GTI, Industriestr. 21, A-3130 Herzogenburg

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

OTA has been shown to be a potent nephrotoxin in almost all animal species. Detoxification can be achieved by chemical or enzymatic hydrolysis, the products of such reactions are ochratoxin α and phenylalanine [4,5]. Ochratoxin α like ochratoxin A, is a fluorescing molecule, therefore sensitive analysis is possible at very low concentration levels.

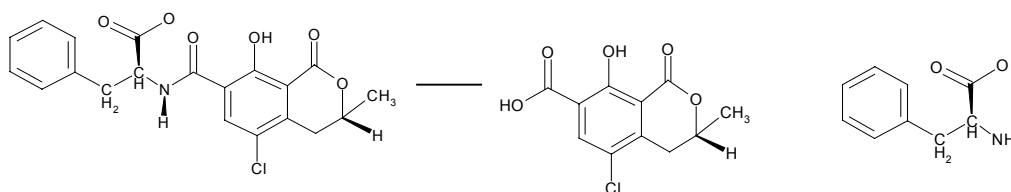


figure 1: Cleavage of ochratoxin A to ochratoxin α and the amino acid phenylalanine

Feed additives counteracting this toxin are necessary to minimize the negative impact on animals and further in humans. A new strategy is the degradation of ochratoxin A using micro-organisms added to the feedstuff. For the evaluation of certain feed additives feeding trials are performed. Feed conversion rates, daily weight gain and mortality are the tested parameters. Analytical parameters like the concentration of ochratoxin A and the metabolite ochratoxin α give further valuable information.

Thus, plasma and kidneys of pigs were analysed using liquid liquid extraction techniques for both matrices [1, 2, 3]. After chromatographic separation on an ODS Hypersil column 2,1 x 10mm, 3 μ m quantification by use of fluorescence detection of ochratoxin A and ochratoxin α was performed. The results indicate a high stability of ochratoxin A in the plasma of pigs and a dependence of the OTA concentration on the sex of the animals.

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

Monitoring of Ochratoxin A biosynthesis related genes in *Penicillium verrucosum* by differential-display reverse transcription-PCR (DDRT-PCR) experiments.

P.F. Färber and R. Geisen

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

Ochratoxin A (OTA), is an isocoumarin derivative of the secondary metabolism of different filamentous fungi. Main producers are filamentous fungi belonging to the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. OTA is a genotoxic carcinogen for animals and humans. In addition OTA can cause severe effects on fetal development and the immune system. Sources for this mycotoxin can be as well plant materials, e.g. cereals, coffee, beer, wine and fruit juices as food products based on animal tissues except for ruminants. Despite the importance of this mycotoxin for human and animal health nearly nothing is known about the genetic basis for ochratoxin biosynthesis. A presumable biosynthetic pathway for OTA is proposed and most of the metabolic intermediates are isolated and described. But structural as well as regulatory genes remain unknown, they still have to be identified. Besides others one possible approach in this concern is the analysis of differentially expressed genes by DDRT-PCR experiments. A stringent prerequisite for the performance of this type of experiments is the knowledge about permissive/restrictive growth conditions for OTA biosynthesis and/or the existence of ochratoxin A negative mutant strains besides the ochratoxin A producing wild type strain respectively. A well defined minimal medium supplemented by glycerol/ NH_4^+ was used for permissive growth conditions and the same minimal medium supplemented by glucose/ NO_3^- was used for restrictive growth conditions respectively. Differentially expressed RNA populations as well from permissive/restrictive growth conditions as from OTA⁻ mutants strains/OTA⁺ wild type strains respectively have been labeled by [α 33P] dATP and run on a polyacrylamide sequencing gel. The detection of differentially expressed genes was performed by autoradiography on X-ray films. Differentially expressed DNA bands were selected, eluted out of the polyacrylamide gel and used as a template in succeeding PCR reactions for amplification. These differentially expressed DNA bands will be sequenced and the results will be compared to different data bases.

Vergleichende *in-vitro*-Untersuchungen zur ruminalen Metabolisierung von Ochratoxin A aus kontaminierten Getreide und kristallinen Ochratoxin A

R. Blank, Anne Westphal, S. Wolfram

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

Einleitung: Nach bisherigen Untersuchungen beim Schwein führt die Verabreichung analytisch gleicher Dosierungen von OA aus natürlich kontaminierten Getreide im Vergleich zu kristallinen OA zu deutlich höheren (3-4 vierfache) Konzentrationen in Blut und Gewebe. Als mögliche Ursachen werden in der Literatur eine verringerte Löslichkeit des kristallinen OA oder aber eine verzögerte Freisetzung bzw. ein reduzierter mikrobieller Abbau von OA aus natürlich kontaminierten Getreide aufgrund von Matrixeffekten angegeben. Beim Wiederkäuer wird OA in den Vormägen zum weniger toxischen O α abgebaut, wobei in der Mehrzahl der Studien kristallines OA eingesetzt wurde. Neuere Untersuchungen von Höhler et al. (1999) an Schafen weisen jedoch darauf hin, dass die Fütterung von OA aus natürlich kontaminierten Weizen zu messbaren Konzentrationen an OA im Blut führt. Das Ziel dieser Untersuchung war es mittels des Hohenheimer-Gas-Tests zu überprüfen, ob die Herkunft des OA einen Einfluss auf den ruminalen Abbau von OA ausübt.

Material und Methoden: Die *in-vitro*-Inkubationen wurden entsprechend den Vorgaben der VDLUFA (1997) durchgeführt. Pansenflüssigkeit wurde von 2 Pansen-fistulierten Ochsen entnommen, deren Ration ein Konzentrat:Rauhfutter-Verhältnis von 40 : 60 aufwies. Den Inkubationsansätzen (30 ml) wurden entweder 2 μ g kristallines OA bzw. OA aus inokulierten Weizen zugesetzt. Die Inkubationen wurden zu den Zeitpunkten 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 und 24 h durch Zugabe von 1 ml *ortho*-Phosphorsäure (85 %) gestoppt. Die Analyse von OA und O α in der flüssigen und festen Phase erfolgte mittels HPLC (Fluoreszenzmethode).

Ergebnisse: In der Tabelle ist die Gesamtmenge an OA und O α zu den verschiedenen Inkubationszeitpunkten relativ zur Ausgangsmenge (100 %) dargestellt. Die O α -Werte sind als OA-Äquivalente angegeben. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede für den ruminalen Abbau von OA bezüglich des Ausgangsmaterials. Die Halbwertszeiten (HWZ, h) für das Verschwinden von OA aus inokulierten Weizen betrug $3,23 \pm 1,16$ und $3,06 \pm 1,03$ für kristallines OA. Die entsprechenden HWZ für die Bildung von O α betragen $3,27 \pm 1,24$ und $3,82 \pm 0,79$.

Zeit, h	OA Inokulierten Weizen	OA kristallin	P	O α Inokulierten Weizen	O α kristallin	P
0	95,8 \pm 16,1	87,6 \pm 9,9	0,2291	2,4 \pm 2,0	0,4 \pm 0,7	<0,000
0,5	78,1 \pm 13,9	77,3 \pm 13,4	0,8269	5,0 \pm 3,8	4,6 \pm 3,9	0,3618
1	79,5 \pm 11,6	76,0 \pm 9,3	0,2736	8,7 \pm 4,7	8,9 \pm 4,8	0,6934
2	71,1 \pm 15,0	64,1 \pm 13,5	0,0131	16,4 \pm 7,8	17,5 \pm 7,4	0,4332
4	34,2 \pm 16,3	30,7 \pm 19,8	0,1596	42,5 \pm 16,6	42,4 \pm 10,9	0,9552
8	5,6 \pm 4,4	2,5 \pm 3,9	0,0225	64,3 \pm 5,9	57,9 \pm 8,9	0,0266
12	1,0 \pm 0,8	0,1 \pm 0,4	0,0506	80,2 \pm 16,9	64,8 \pm 11,5	0,0637
24	-	-	-	72,5 \pm 15,9	62,1 \pm 11,1	0,1265

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass bezüglich der ruminalen Hydrolyse von OA keine Unterschiede zwischen kristallinen OA und OA aus kontaminierten Weizen bestehen.

Höhler, D., Südekum, K.-H., Wolfram, S., Frohlich, A. A., Marquardt, R. R. (1999). J. Anim. Sci. 77, 1217-1223
 Naumann, C., Bassler, R. (1997): Die chemische Untersuchung von Futtermitteln, Verlag VDLUFA

Analytik von Ochratoxin A in Lebensmitteln – mit Nachsäulenderivatisierung zuverlässig in den ppt-Bereich

Sebastian Kastrup¹ und Uwe Aulwurm²

¹ Dr. Wiertz – Dipl. Chem. Eggert – Dr. Jörissen GmbH, Hamburg

² LCTech GmbH, Dorfen

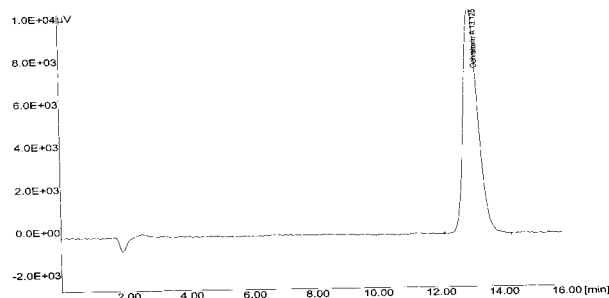
Ochratoxin A (OTA) ist ein von verschiedenen Pilzen der Gattung *Penicillium* oder *Aspergillus* gebildetes Mykotoxin. OTA hat nephrotoxische, teratogene, immunotoxische und kanzerogene Wirkungen. In Untersuchungen wurde festgestellt, daß OTA in Getreide, Kaffee, Kakao, Trockenfrüchten und Wein in z.T. erheblichen Mengen auftaucht.

Wegen seiner nicht unerheblichen Toxizität hat die Europäische Kommission deshalb mit Wirkung vom 5. April 2002 Höchstmengen für OTA in Getreideprodukten einschließlich Reis und Buchweizen sowie Rosinen festgesetzt:

Für weitere Lebensmittel werden bis Ende 2003 maximale Werte festgesetzt, u.a. für Kaffee, Bier und Wein. Wegen der schon erwähnten Toxizität wird auf nationaler Ebene die Herabsetzung dieser Werte insbesondere für Kindernahrung diskutiert. Ein möglicher Grenzwert von **0,01 – 0,03 µg/kg** stellt beträchtliche Ansprüche an die Analytik von OTA, da bei gleicher Spezifität die Empfindlichkeit der Methode verzehnfacht werden muß!

Nachweise von OTA basieren auf DC, ELISA oder HPLC-Methoden. Gerade letztere zeichnen sich durch eine hohe Genauigkeit und Empfindlichkeit aus, da OTA im Fluoreszenzdetektor gemessen werden kann. Bei Gehalten von weniger als 0,5 g/kg stören aber oft Begleitsubstanzen die Bestimmung, da im Bereich 330/460 nm häufig native Fluoreszenzen auftreten. Hier bietet die Nachsäulenderivatisierung des OTAs mit Ammoniak unter Verwendung des Pickering-Nachsäulenderivatisierungsmoduls PCX 5200 gleich mehrere Vorteile:

- Die Emissions- bzw. Extinktionswellenlänge verschiebt sich in den Bereich 390/440 nm, in dem native Fluoreszenzen weit weniger stören.
- Die Empfindlichkeit der Methode steigt drastisch, da das entstandene Derivat eine höhere Fluoreszenzintensität als das reine OTA aufweist.
- Begleitende störende Substanzen werden durch die Derivatisierung „unsichtbar“.
- Das Nachsäulenderivatisierungsmodul PCX 5200 ist sofort einsatzbereit.



Die Abbildung zeigt einen OTA-Standard (100 pg absolut)

Mit der beschriebenen Methode kann OTA sicher und empfindlich im Fluoreszenzdetektor bis zu **1 pg OTA** (Injektionsvolumen 100 µL) nachgewiesen werden! Damit können die momentanen und kommenden Grenzwerte für OTA spezifisch überprüft werden.

New EU legislation - maximum limits for Ochratoxin A in foodstuffs

M. Corkhill, R. Fielder, P. Goodwin

Immunoassay Business Group, Tepnel *BioSystems* Ltd, One Newtech Square,
Deeside Industrial Park, CH5 2NT

Regulatory limits for Ochratoxin A (OA), proposed by *The Standing Committee for Foodstuffs*, came into force on the 5th April 2002 (EC No. 472/2002). Limits were set for rice and buckwheat (5µg/kg), cereal products (3µg/kg) and dried vine fruits i.e. currants, raisins and sultanas (10µg/kg). The proposed Regulatory limits for coffee, wine, beer, grape juice, cocoa and spices will be reviewed by the end of December 2003.

Tepnel *BioSystems* (TBS) has developed a novel, quantitative, 96-well enzyme immunoassay kit for the rapid detection of OA at levels well below those proposed in the new legislation. The *BioKits* Ochratoxin A Assay utilises a unique biotinylated-OA reporter molecule which competes effectively with OA in the analytical sample for antibody binding sites on the solid phase. The theoretical limit of detection for the assay is 0.3 p.p.b. (i.e. µg/kg). The working range of standards employed (0.02 to 1 ng/ml) enables quantitation of OA at levels of >1.0 to <50 p.p.b. in a variety of commodities including cereals, dried vine fruits, green coffee and white wine. Simple methanol:water or bicarbonate buffer extraction solutions are employed prior to the immunoassay analysis which can be completed in only 80 minutes. The assay is at least as sensitive as other immunoassays and is significantly more cost-effective than immuno-affinity columns for multi-sample analysis.

Three different OA contaminated matrices (cereals, dried vine fruits and green coffee) were obtained from the U.K. Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) and tested in the *BioKits* OA assay. The results obtained in the *BioKits* OA assay were consistent with the consensus robust means (z-scores -0.5 to +0.9).

TBS also provides immunoassay- and PCR-based analytical solutions for other food analytes such as allergens, species content and genetic modification. In addition, the company has access to "dry-strip"-type rapid testing technologies, which may be of particular importance in screening for mycotoxins. TBS is in the process of extending its range of novel immunoassay methods (similar to that described above) and dry-strip tests into the areas of allergen detection, total aflatoxin and other mycotoxin screening.

E-mail: oa@tepnelbiosystems.com Tepnel *BioSystems* Web: www.tepnel.com

Fumonisine Poster

Vorkommen von Fumonisine in Mais in der Türkei

O. Simsek, C. Demir, M. Arici

Trakya Universität Fakultät für Landwirtschaft Institut für Lebensmittelingenieurwesen 59030 Tekirdag, Türkei

Mais ist das günstigste Getreide für Fumonisinbildung durch *Fusarium* spp. Wachstum. In dieser Arbeit wurden die *Fusarium moniliforme* und Vorkommen von Fumonisin B1 und von Fumonisin B2 in den 100 Maisproben, die von den Samsun- Dörfern und Bezirken gesammelt wurden, untersucht. Die Toxine wurden mit HPLC über ihre Eigenfluoreszenzen bestimmt. Bei den Maisproben lag die Nachweisgrenze bei 50 ng/g Körner.

Die Infektion von *Fusarium moniliforme* wurde zwischen 4-100 % in den 100 analysierten Maisproben gefunden. In den sechs Proben wird kein *Fusarium moniliforme* gefunden.

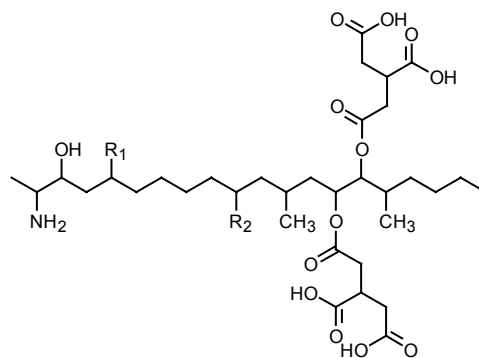
In den 52 von 100 Maisproben wurden Fumonisin B1 zwischen 50- 25720 ng/g und in den 25 von 100 Proben Fumonisin B2 zwischen 50-5700 ng/g gefunden. In 48 Maisproben konnte fumonisin nicht festgestellt werden.

Bestimmung von Fumonisinen in Lebensmitteln - Methodenvergleich -

A. Brockmeyer, S. Schmidt, G. Thielert

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Sigmaringen, Hedingerstraße 2/1, 72488 Sigmaringen

Fumonisine sind eine Gruppe von Mykotoxinen, die vor allem in Mais vorkommen und von einigen *Fusarien spp.*, hauptsächlich *Fusarium moniliforme*, gebildet werden. Bisher sind 7 verschiedene Fumonisine beschrieben, von denen natürlicherweise jedoch nur FB₁, FB₂ und FB₃ in bedeutenden Mengen vorkommen. Die Aufnahme von Fumonisinen durch die Nahrung wird mit einem erhöhten Auftreten von Krebserkrankungen in Zusammenhang gebracht.



FB₁: R₁=OH, R₂=OH; FB₂: R₁=OH, R₂=H; FB₃: R₁=H, R₂=OH

Abb.: Grundstruktur der Fumonisine

Während im Rahmen des gesundheitlichen Verbraucherschutzes der Fumonisinegehalt in Lebensmitteln hauptsächlich mittels HPLC-FLD oder HPLC-MS/MS bestimmt wird, finden im Tierfuttermittelbereich vielfach ELISA Verwendung, wobei in beiden Fällen Mais, Maismehl und Maisgrieß das Hauptuntersuchungsgut darstellen. Um einen möglichen Einsatz des ELISA in der Lebensmittelüberwachung bewerten zu können, wurden die oben genannten Methoden hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit verglichen. Ebenso wie der ELISA beruht die verwendete HPLC-FLD-Methode auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion, da zur Aufreinigung und Anreicherung der Fumonisine Immunoaffinitätssäulen eingesetzt werden. Die HPLC-MS/MS-Bestimmung erfolgt dagegen ohne weiteren Aufreinigungsschritt direkt aus der Extraktionslösung. Für den Vergleich wurden natürlich belastete Maismehl- und Maisgrießproben mit unterschiedlichen Fumonisinegehalten herangezogen. Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden werden vorgestellt.

Comparison of Derivatization Agents for Fumonisin Determination in Beer

Andri Papadopoulou-Bouraoui, Joerg Stroka and Elke Anklam

European Commission, Joint Research Centre, Food Products Unit, I-21020 Ispra

Beer can be contaminated with mycotoxins such as fumonisins and zearalenone if contaminated cereals are used for its production or if the conditions during production are such that they allow their development.

Fumonisin (FBs) can be found in corn and are associated with human esophageal cancer. They are also the cause of leucoencephalomalacia in horses and of pulmonary edema in pigs. Zearalenone (ZEA) can be found in a variety of cereals such as corn, barley, wheat or sorghum, and it causes hyperoestrogenism and reproductive tract alterations.

A simultaneous determination of fumonisins and zearalenone has recently been developed involving a tandem immunoaffinity column clean-up step, followed by pre-column derivatization prior to reversed-phase HPLC separation and fluorescence detection [1]. The pre-column derivatization of FBs is performed with the most commonly used agent involving o-phthalaldehyde (OPA) and 2-mercaptoethanol (2-ME) as a reaction partner and has no effect on Zea when determined simultaneously with the FBs. This easy-to-perform rapid derivatization reaction yields highly fluorescent fumonisin derivatives. However, the instability of the derivatives as well as the high toxicity and strong odour of 2-ME are the main disadvantages associated with this derivatization agent. Recently, three attractive alternatives to 2-ME (3-mercapto-propionic acid (3-MPA), N-acetyl-cysteine (N-Ac) and thioglycerol (TG)) have been proposed [2] for the derivatization of fumonisin B₁ (FB₁) and B₂ (FB₂).

In this publication we present a comparison between the conventional derivatization agent 2-ME and N-Ac, TG, and 3-MPA as to their applicability for the simultaneous determination of FB₁, FB₂ and Zea in beer with particular emphasis given to N-Ac. The performance characteristics of the methods such as the limits of detection and quantification, repeatability, and matrix interferences were compared.

References

- Papadopoulou-Bouraoui A., Stroka J. and Anklam E. 2001. Simultaneous determination of Fumonisin B₁ and B₂, and Zearalenone, and of Aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ and Ochratoxin A in beer, by HPLC separation and fluorescence detection. Poster presented at the 6th International Symposium for Food Authenticity and Safety. 28-30 November 2001, Nantes, FRANCE.
- Stroka J., Capelletti C., Papadopoulou-Bouraoui A., Pallaroni L. and Anklam E. 2001. Investigation of alternative reaction agents to 2-mercaptoethanol for the derivatization of Fumonisin with o-Phthalaldehyde prior to HPLC analysis, submitted to J. Agric. Food Chem. (2002).

A SURVEY OF FUMONISINS (B₁, B₂, B₃) IN INDONESIAN CORN-BASED FOOD AND FEED SAMPLES

Nuryono¹, C.T. Noviandi², J. Boehm³, A. Agus², S. Wedhastri², Y.B. Maryudani² and E. Razzazi³

¹ Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Gadjah Mada University, Sekip Utara, Yogyakarta 55281, Indonesia

² Mycotoxicology Unit, Life Sciences Laboratory, Gadjah Mada University, Jl. Kaliurang Km 4, Yogyakarta, Indonesia

³ Institute of Nutrition, Veterinary Medicine University, Veterinaerplatz 1, A-1210 Vienna, Austria

Contamination of commercial processed food with mycotoxins is a very important issue in Indonesia. Since there are striking lacks of data published about the contamination of processed food and home made food and feedstuff in Indonesia, it is very important to have an overview of this problem. Therefore the monitoring, control, risk assessment and prevention of mycotoxins in agricultural products, in food, in feed in this area are of high relevance.

A survey to evaluate the contamination level of fumonisins (B₁, B₂, B₃) in Indonesian corn-based food and feedstuffs was carried out. The survey was conducted from February to May 2001. Foodstuffs, which are consumed directly such as snacks and other products, were investigated for fumonisin contamination. 74 food and feed samples purchased from local retail stores and local poultry shops around Yogyakarta, Java, Indonesia were analyzed using ELISA (*Ridascreen^R Fumonisin Fast*, R-Biopharm, Germany) method according to procedure as mentioned in manual. Results indicate that 74.3% of samples analyzed were contaminated in a large range of 10.0 - 3307 µg/kg, and the concentration of fumonisins depends on the type of samples. Detection limit of the method used was 8.7 µg/kg. In general, it could be stated that contamination of fumonisins in food samples was lower than those of feed samples. From eight food samples of maize flour, and corn-based beverages and cereals, none was contaminated (below detection limit). For food samples of industrial products (20 samples), 14 were contaminated in the range of 22.8 - 105 µg/kg and 18 of 19 samples from home made products were contaminated between 12.9 - 234 µg/kg. The food samples contaminated in highest level occurred in raw corns. Of ten samples, 6 were contaminated from 68.0 - 2471 µg/kg. For feed samples, 17 types of raw corns were evaluated. Of those samples, 16 contained fumonisins in a large range of 17.6 - 3306 µg/kg. The results presented here show that fumonisin contamination in some Indonesian food and feedstuffs is a very serious problem. The extent of fumonisin contamination in other Indonesian agricultural products, for the most part, has not been determined. Therefore, further research and analyses of other food and feed products for mycotoxin contaminations is required.

Aufreinigung von Fumonisinen und ihren Hydrolysaten über neuartige SPE-Materialien

T. Kapp¹, H. St. Klaffke¹, P. Majerus², E. Märtlbauer³, I. Mehltitz¹, H.-J. Stan⁴,
R. Tiebach¹, E. Usleber⁵, R. Weber¹, I. Zimmer³

¹ Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Thielallee 88-92, 14195 Berlin

² Landesuntersuchungsamt - Institut für Lebensmittelchemie, Maximinerachtstr. 11a, 54295 Trier

³ Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstr. 13, 80539 München

⁴ Institut für Lebensmittelchemie der TU-Berlin, Gustav-Meyer-Allee 25, 13355 Berlin

⁵ Milchwissenschaften - Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig-Universität, Ludwigstrasse 21, 35390 Giessen

Fumonisine sind sekundäre Stoffwechselmetaboliten des Schimmelpilzes *Fusarium moniliforme* (*F. verticillioides*) und zählen somit zu den Mykotoxinen. Im Tierversuch wurde für Fumonisin B₁, dem Hauptvertreter dieser Toxingruppe, eine kanzerogene Wirkung bei Ratten und Mäusen festgestellt. Daneben besitzen Fumonisine bei verschiedenen Tierarten neuro-, nephro- und pneumotoxische Eigenschaften. Es wird weiterhin vermutet, dass Fumonisine im Zusammenhang mit regional gehäuften Auftreten von Speiseröhrenkrebs beim Menschen (z.B. Italien, Südafrika) eine Rolle spielen. Vergleichbare toxikologische Eigenschaften wie die Ausgangsverbindung zeigten auch die sogenannten Hydrolysate der Fumonisine (HFB) im Tierversuch. Diese Verbindungen entstehen in technologischen Prozessen aus den Fumonisinen durch Hydrolyse unter der Abspaltung der beiden Tricarbonsäuren, wenn auf das Lebensmittel hoher Druck und Temperatur einwirken bzw. wenn dieses mit stark alkalischen oder sauren Lösungen behandelt wird.

Ihr Nachweis im Lebensmittel ist somit besonders wichtig, um eine Belastung des Verbrauchers durch Fumonisine und deren Hydrolysate zu minimieren.

Analytisch erfassen lassen sich diese Mykotoxine und ihre Abbauprodukte mittels immunchemischer und physikalisch-chemischer Verfahren (TLC, GC, HPLC und HPLC-MS)[1]

Wichtigster Abschnitt der Analyse ist wie bei vielen Mykotoxinen dabei die Probenaufreinigung.

Für die Bestimmung der Fumonisine in einfachen Lebensmittelmatrizes, wie z.B. Maismehl und -grieß, ist die Probenaufreinigung mittels starken Anionenaustauschern mehrfach beschrieben [2,3] bzw. sogar methodisch in internationalen Ringversuchen abgesichert[4]. Für komplexere oder zusammengesetzte Lebensmittel hat sich wie bei anderen Mykotoxinen auch die immunchemische Aufreinigung bewährt [5].

Für die routinemäßige Aufreinigung der Hydrolysate wurden bisher nur C₁₈-Materialien verwendet, bei der auch eine gleichzeitige Erfassung der Fumonisine teilweise möglich war.

Bei vielen komplexeren Lebensmitteln, wie z.B. Maisextruderprodukte und maishaltiger Fertignahrung ist diese Probenaufreinigung oft als unzureichend einzustufen.

Daher wird anhand konkreter Lebensmittelmatrices die Verwendung eines neueren Polymer-Festphasenmaterials beschrieben, die Ergebnisse betreffend der Reinigungseffizienz dargestellt und mit den Ergebnissen herkömmlicher Verfahren verglichen.

Die Autoren danken dem Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft für die im Rahmen des Forschungsvorhabens "Fumonisin - Aufnahme des deutschen Verbrauchers" gewährte finanzielle Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

Literatur:

[1] G.S. Shephard, J. Chrom. A, **815** (1998), 31

[2] E.W.Sydenham, G.S. Shephard, P.G. Thiel, J. AOAC Int., **75** (1992),313

[3] K. Duncan, S. Kruger, N. Zabe, B. Kohn, R. Prioli, J. Chrom. A, **815** (1998), 41

[4] P.G.Thiel, E.W. Sydenham, G.S. Shephard, D.J. van Schalwyk, J. AOAC Int., **76** (1993),361

[5] M. Solfrizzo, A. De Girolamo, A. Visconti, Food Add. Contam. **18** (2001), 237

Trichothecene
und
Zearalenon
Poster

Evaluation of Glucomannan for its Adsorption Ability of Aflatoxin and T-2 toxin in the Gastrointestinal tract of Broiler Chickens

G. Devegowda¹, T. N. K. Murthy and B. N. Reddy

¹Head, Division of Animal Sciences, College of Veterinary medicine, Bangalore, INDIA.

Introduction

- Among the mycotoxins, Aflatoxin, T-2 toxin and Ochratoxin are important to the poultry industry.
- Glucomannan (Mycosorb[®], Alltech Inc, USA), a cell wall derivative of *Saccharomyces cerevisiae*¹⁰²⁶, has received much attention in minimizing the mycotoxins present in the contaminated diets of livestock and poultry

Objective

- To measure % adsorption of Aflatoxin and T-2 toxin by glucomannan in gastrointestinal tract of broilers at different time intervals after feeding of contaminated diets.

Experimental treatments

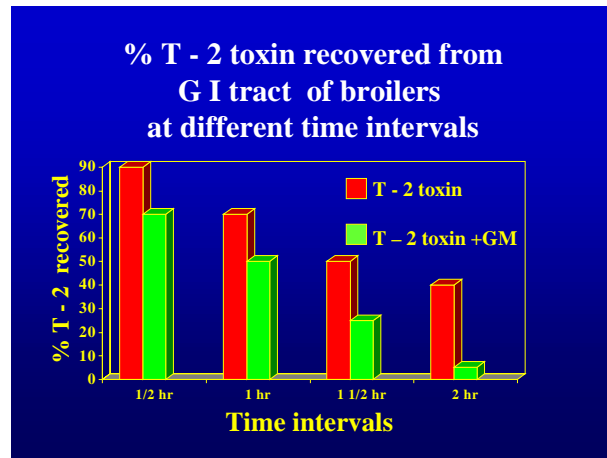
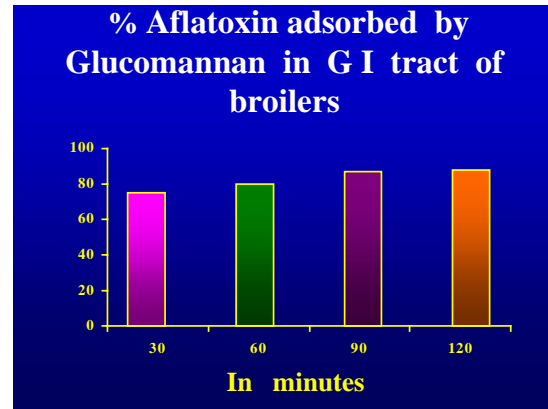
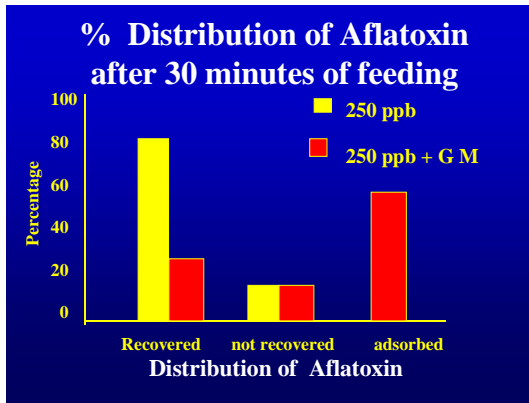
Trt. no	Basal diet	Aflatoxin (ppb)	T-2 toxin (ppb)	Glucomannan (0.1%)
1	+	-	-	-
2	+	-	-	+
3	+	250	-	-
4	+	250	-	+
5	+	500	-	-
6	+	500	-	+
7	+	-	500	-
8	+	-	500	+
9	+	-	1000	-
10	+	-	1000	+

Experimental details

- 240 broilers of five weeks old were housed in cages
- Quantity of feed and amount of toxin consumed was measured
- Birds were sacrificed after 0, 30, 60, 90 & 120 minutes of feeding
- Gut contents were collected, dried and mycotoxin concentration was estimated

Results

The results are as follows :



Conclusions

- Supplementation of Glucomannan at 1kg / ton of feed is beneficial in preventing the absorption of Aflatoxin and T-2 toxin into the biological system.
- Glucomannan had the ability to adsorb Aflatoxin upto 75 -90 % and T-2 toxin upto 30 - 35% in gastrointestinal tract of broilers.

Einfluss der Phenolsäuren in Weizen auf Fusariumresistenz und Deoxynivalenolbildung

G. Engelhardt, M. Königer, U. Preiß

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Außenstelle München,
Menzinger Str. 54, 80638 München

Die Anfälligkeit von Getreide für Ährenfusariosen und das damit verbundene Vorkommen von Deoxynivalenol (DON) sind stark sortenabhängig. Es besteht eine positive Korrelation zwischen den Resistenzeigenschaften verschiedener Weizensorten und den DON-Gehalten (1). Da die Bekämpfung der Pilzinfektion mit Fungiziden nur begrenzt möglich ist, kommt ihrer Prävention und damit der Kenntnis der Eigenschaften der zugelassenen Sorten eine große Bedeutung zu. Nach McKeenan et al. (2) gibt es Hinweise dafür, dass die Fusarienresistenz verschiedener Getreidearten mit dem Gehalt des Kornes an Phenolsäuren steigt. Zwei Hauptvertreter dieser Substanzklasse, die zu den sog. sekundären Pflanzenstoffen zählen, sind die Cumarsäure und die Ferulasäure. Als Vorstufen in der Ligninbiosynthese werden sie in vielen Pflanzenteilen gebildet und liegen dort in gebundener und freier Form vor. Ziel der Untersuchungen war es, die Gehalte der wichtigsten Phenolsäuren in freier und gebundener Form in den Ähren verschiedener Weizensorten während einer Vegetationsperiode zu ermitteln und mit der Anfälligkeit der Sorten gegen Fusarien zu vergleichen.

Untersucht wurden 10 Winterweizensorten der Ernte 2000 mit unterschiedlicher Anfälligkeit für Fusarien (3). Die Durchführung des Freilandversuchs und die Bereitstellung des Probenmaterials erfolgten durch die Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Freising. Die Probenahme geschah ab dem Zeitpunkt des Ährenschiebens bis zur Kornreife in wöchentlichem Abstand. Zum Nachweis von freien und gebundenen Phenolsäuren wurde eine Extraktions- und Aufarbeitungsmethode entwickelt. Auftrennung und Bestimmung der Substanzen erfolgten durch HPLC mit Gradientenelution und UV-Detektion.

Die Gehalte an Ferulasäure und Cumarsäure stiegen zunächst bei allen Sorten steil an und fielen dann wieder kontinuierlich bis zur Kornreife. Die empfindlichste Zeit für eine Fusariuminfektion ist die Ährenblüte. Erste Versuchsergebnisse zu diesem Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung zeigen, dass die Sorten mit einer geringeren Anfälligkeitseinstufung die höchsten Ferulasäure-Konzentrationen aufweisen, während diese bei den anfälligeren Sorten deutlich niedriger sind. Es ergibt sich eine negative Korrelation ($r = -0,82$) zwischen der Ferulasäure-Konzentration der Winterweizensorten und der Rangfolge ihrer Anfälligkeit für Ährenfusariosen aus der Beschreibenden Sortenliste (BSL). Setzt man die Ferulasäure-Konzentrationen mit der Einstufung der verschiedenen Sorten auf Basis von DON-Gehalten in Beziehung, erhält man auch hier eine negative Korrelation ($r = -0,92$). Nach diesen Ergebnissen scheint die Ferulasäure eine Rolle bei der Abwehr von Fusariuminfektionen zu spielen und dadurch indirekt das Ausmaß der Mykotoxinbildung zu beeinflussen.

(1) Miedaner, T., Reinbrecht, C., Lauber, U., Schollenberger, M., Geiger, H.H., Effects of genotype and genotype-environment interaction on deoxynivalenol accumulation and resistance to *Fusarium* head blight in rye, triticale, and wheat. *Plant Breed.* 120, 97-105 (2001).

(2) McKeenan J.D., Busch, R. H., Fulcher, R.G., Evaluation of wheat (*Triticum aestivum* L.) phenolic acids during grain development and their contribution to *Fusarium* resistance. *J. Agr. Food Chem.* 47, 1476-1482 (1999).

(3) Anonym, Beschreibende Sortenliste Getreide, Mais, Ölfrüchte, Leguminosen, Hackfrüchte. Bundessortenamt, Landbuch Verlag, Ausgaben 1997 und 1998.

Danksagung Unser besonderer Dank gilt Herrn Dr. Obst, Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, für das Probenmaterial und die sehr hilfreichen Diskussionen.

Mykotoxingehalte im Sojaextraktionsschrot

Hana Valenta¹, S. Dänicke¹ und A. Blüthgen²

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

² Institut für Hygiene und Produktsicherheit, Bundesanstalt für Milchforschung, Hermann-Weigmann-Str.1, 24103 Kiel

Sojaextraktionsschrot ist ein wichtiger Bestandteil von Mischfuttermitteln. Über Mykotoxingehalte im Sojaextraktionsschrot und damit über dessen Beitrag zur Mykotoxinbelastung von Mischfuttermitteln ist bisher – mit Ausnahme von Aflatoxinen - wenig bekannt. Deshalb wurde im Rahmen einer Studie Sojaextraktionsschrot aus dem Handel in Deutschland auf die wichtigsten Mykotoxine untersucht.

Es wurden insgesamt 55 Proben aus dem Jahr 1999, wobei es sich teilweise um Verdachtsproben handelte, auf die Fusarien-Mykotoxine Deoxynivalenol und Zearalenon, außerdem auf Ochratoxin A und Aflatoxine analysiert. Deoxynivalenol und Zearalenon wurden zuerst orientierend mit ELISA analysiert, die positiven Proben wurden anschließend mit HPLC nach Einsatz von Immunoaffinitätssäulen (IAC) bestimmt. Die Analyse von Ochratoxin A erfolgte zuerst nach einer HPLC-Methode mit Flüssig-Flüssig-Reinigung der Extrakte, die positiven Proben wurden danach mit HPLC nach IAC-Reinigung abgesichert. Aflatoxine wurden ebenfalls mit einer HPLC-Methode nach Reinigung über IAC analysiert.

Deoxynivalenol war in keiner Probe oberhalb der Nachweisgrenze des ELISA (0,11 mg/kg) nachweisbar. Zearalenon wurde dagegen in 27 Proben mit einer maximalen Konzentration von 0,36 mg/kg nachgewiesen. Ochratoxin A war in 5 Proben enthalten, die höchste Konzentration betrug jedoch nur 1 µg/kg. In 35 Proben wurde Aflatoxin B1 nachgewiesen, wobei die höchste Konzentration 0,5 µg/kg betrug. Die Ergebnisse werden im Poster diskutiert.

Bestimmung von Deoxynivalenol mittels LC-MS/MS (HPLC-Tandem Massenspektrometrie)

O. Kappenstein, H. St. Klaffke, H.-J. Spott, R. Tiebach, R. Weber

FG 222 – Mykotoxine und Kontaminanten im
BgVV – Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
Thielallee 88-92, 14195 Berlin

Deoxynivalenol (DON, Vomitoxin), ist ein Epoxysesterterpen und zählt zu der Gruppe der Ketotrichothecene (Typ B Trichothecene). Dieses Mykotoxin, ist ein sekundäres Stoffwechselprodukt und wird hauptsächlich von den Pflanzenpathogenen der Gattung *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) und *Fusarium culmorum* gebildet.

In Tierversuchen wurden sowohl akut- als auch chronisch- toxische Wirkungen von DON beschrieben. Nach Verabreichung einzelner Dosen, besitzt DON zwei charakteristisch toxikologische Wirkungen: eine verringerte Futteraufnahme (Anorexie) und Erbrechen (Vomitus). DON ist vermutlich nicht kanzerogen, es wurden aber teratogene und immuntoxische Wirkungen beobachtet [1].

Empfindliche ($\mu\text{g}/\text{kg}$) und selektive Methoden für die Bestimmung von DON in Lebensmitteln (Getreide und Getreideprodukte) sind notwendig, um einen wirksamen Verbraucherschutz zu gewährleisten.

Für die quantitative Deoxynivalenol Analytik existieren sowohl immunochemische, wie z. B. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA's), als auch chromatographische Methoden. Die Anwendung von gaschromatographischen (GC) Methoden verlaufen über aufwendige Derivatisierungsschritte (z.B. Trimethylsilyl- oder Pentafluoropropionyl- Derivate). Die Detektion erfolgt anschließend über Mass Spectrometry (MS), Electron Capture Detection (ECD) oder Flame-Ionization Detection (FID). Die Detektion der flüssigkeitschromatographischen (HPLC) Methoden erfolgt im unteren UV-Bereich und limitiert somit die Anwendung von UV- bzw. DAD- Detektoren [2]. Eine Bestimmung von DON mittels HPLC-APCI-MS mit negativer Ionisation wurde bereits beschrieben [3].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Bestimmung von Deoxynivalenol im Spurenbereich eine LC-MS/MS Methode entwickelt. Unter Verwendung einer HPLC kombiniert über ein APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) Interface mit einem Tandem Massenspektrometer. Die routinemäßige Analytik von Deoxynivalenol wird mittels Multiple Reaction Monitoring (MRM) unter positiver Ionisation durchgeführt.

Die Autoren danken dem Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft für die im Rahmen des Forschungsvorhabens "Analytik und Vorkommen wichtiger Fusarientoxine (Deoxynivalenol und Zearalenon) sowie Aufnahme dieser Toxine durch den deutschen Verbraucher" gewährte finanzielle Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

Literatur:

[1] World Health Organization (WHO): Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO FOOD ADDITIVES SERIES 47. International Programme on Chemical Safety (IPCS), Geneva, 2001.

[2] DeVries, J.W.; Trucksess, M. W.; Jackson L. S.: Mycotoxins and food safety. Advances in experimental medicine and biology. Vol. 504. Kluwer Academic/ Plenum Publishers 2002.

[3] Razzazi-Fazeli, E.; Böhm, J.; Luf, W.: J. Chromatogr. A, 854 (1999) 45-55.

Fusarientoxine in Getreide und Futtermitteln Thüringens – Ergebnisse der Jahre 1998 bis 2001

U. Kirchheim, H. Hartung, L. Herold und B. Meixner

Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Jena

In den letzten 10 bis 15 Jahren haben die Probleme durch Pilzbefall, insbesondere durch Ährenfusarien, zugenommen. Die gebildeten Mykotoxine - bedeutsam sind v. a. Deoxynivalenol (**DON**) und Zearalenon (**ZEA**) - können die Verarbeitungseigenschaften des Getreides (Back-, Malzqualität) sowie die Gesundheit und damit das Leistungspotential landwirtschaftlicher Nutztiere beeinträchtigen.

Von 1998 bis 2001 wurden im Rahmen der Besonderen Ernteermittlung (BEE) insgesamt 1074 Getreideproben (Winterweizen, Winterroggen, Triticale, Gerste) auf ihren Gehalt an **DON** und **ZEA** untersucht. Integriert in diese Untersuchungen waren auch Getreidemuster (n = 98) des ökologischen Landbaus. Komplettiert wurde das Monitoring in 2001 mit Fusarientoxinanalysen in Futtermitteln (n = 106; Alleinfuttermittel für Sauen und Mastschweine; Sojaextraktionsschrot, Mais) aus Schweineproduktionsbetrieben. Dabei erfolgte die **DON**-Analytik mittels kompetitivem ELISA (BEE- und Öko-Proben; Fa. Biopharm, Nachweisgrenze [NWG] - 111 µg/kg) bzw. mittels LC/MS (Futtermittel, NWG - 50 µg/kg). **ZEA** wurde mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion (NWG - 20 µg/kg, Ernte 1998) bzw. kompetitivem ELISA (Fa. Biopharm, NWG - 50 µg/kg [Ernte 1999] bzw. 25 µg/kg [ab Ernte 2000]) bestimmt.

Die Fusarientoxinbelastung des Getreides variiert von Erntejahr zu Erntejahr. Dominierendes Toxin war dabei **DON**. Besonders hohe DON-Konzentrationen waren im Erntejahr 1998 zu finden. In den Folgejahren zeigte sich diese massive Toxinbelastung nicht (Tabelle).

Hauptsächlich im Weizen und in Triticale sind hohe **DON**-Gehalte zu erwarten. So wiesen z. B. 1998 jede fünfte Weizenprobe und ca. 40 % der Triticalemuster DON-Konzentrationen von über 1 mg/kg auf. Roggen und Gerste waren dagegen weniger betroffen. Auch die Getreidemuster (vorwiegend Weizen) aus ökologischem Anbau zeigten insgesamt etwas geringere **DON**-Gehalte (Tabelle).

Nennenswerte **ZEA**-Kontaminationen waren kaum feststellbar, bedenkliche Gehalte (größer 0,25 mg/kg) die Ausnahme. Dies gilt ohne Einschränkungen für alle Erntejahre, die untersuchten Getreidearten sowie für beide Anbauverfahren.

Die Ergebnisse des Futtermittel-Monitorings folgen den Befunden aus BEE und ökologischer Erzeugung. Kritische **DON**-Gehalte (größer 1 mg/kg) waren nur vereinzelt zu finden. Auch **ZEA** konnte nur in 5 % der untersuchten Futtermittelproben nachgewiesen werden.

Tab.: DON in konventionell (BEE) und ökologisch erzeugtem Getreide (Maximum in mg/kg)

	Ernte 2001		Ernte 2000		Ernte 1999		Ernte 1998	
	Positive Proben		Positive Proben		Positive Proben		Positive Proben	
	Prozent	Maximum	Prozent	Maximum	Prozent	Maximum	Prozent	Maximum
Weizen								
konventionell	40	1,90	55	4,60	49	5,37	71	11,08
ökologisch	23	0,52	nicht untersucht		12	0,20	54	4,02
Triticale - konv.	60	2,70	67	5,00	70	3,92	75	13,50
Roggen - konv.	24	0,34	6	0,96	12	2,00	34	2,94
Gerste - konv.	51	0,95	23	0,85	nicht untersucht		nicht untersucht	

Progression of the mycotoxin and nutrient concentration in wheat after inoculation with *Fusarium culmorum* (Entwicklung der Mykotoxin- und Nährstoffkonzentration in Weizen nach Inokulation mit *Fusarium culmorum*)

Karen Matthäus, Hana Valenta, S. Dänicke, and G. Flachowsky

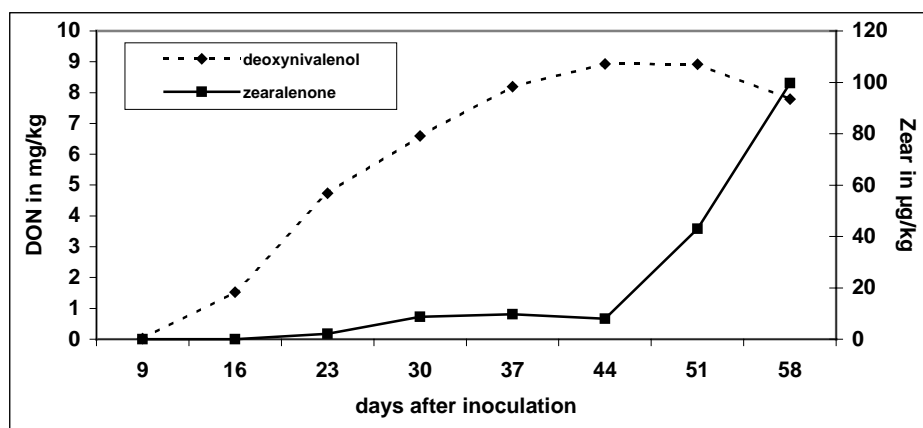
Institute of Animal Nutrition, Federal Agricultural Research Centre (FAL), Bundesallee 50, 38116 Braunschweig, Germany

Fusarium head blight, caused by *Fusarium spp.*, has become a major problem in agriculture. Infection with *Fusarium* leads to mycotoxin contamination as well as yield- and quality losses. The fungal growth can modify the content of nutrients of the grain as well as chemical and physical properties, which possibly influences the nutritional value for farm animals. Because of its content of nutrients and energy, wheat is an important source of energy in human nutrition and in nutrition of monogastric animals. Hence it is important to find out the impact of *Fusaria* and their mycotoxins on properties influencing processing and nutritional value of such wheat grains.

This work shows the results of a field trial with the winter wheat variety Ritmo. For this purpose, part of the wheat grown on an experimental field of 11 ha at the experimental station Mariensee was infected with *Fusarium culmorum* in 2001. From anthesis until harvest, samples were taken once a week.

The investigation was focused on the progression of the contamination of the wheat with deoxynivalenol and zearalenone. Furthermore, the impact of mycotoxin contamination on the quality parameters starch, crude protein and crude ash was scrutinized. The viscosity, non starch polysaccharides (NSP) and thousand seed weight were investigated as well.

Regarding the progression of zearalenone and deoxynivalenol contamination it was shown that the deoxynivalenol content of the grain increased after early milk ripeness while the zearalenone content increased significantly after full ripeness of the wheat. The contamination of the inoculated samples at harvest varied from 15 to 190 µg/kg for zearalenone and from 3 to 11 mg/kg for deoxynivalenol.



The contents of starch, crude protein and crude ash of the inoculated samples ranged from 68 to 72 %, from 12 to 15 % and from 1.7 to 1.8 % at the time of harvest. The viscosity ranged between 1.2 and 1.9 mPas at that time. The thousand seed weight was about 16 g, the content of soluble NSP was approx. 2.4 %.

Purification and characterization of the Zearalenone degrading enzyme produced by *Gliocladium roseum*

Inge Matthies, Heinrich Buchenauer

Institute of Phytomedicine, University of Hohenheim, 70593 Stuttgart

Microbial metabolism of mycotoxins is of considerable interest because of the potential applications of this process in the agricultural and food industries as well as in human medicine and environmental biotechnology. The ability of the mycoparasite *Gliocladium roseum* to degrade Zearalenone (ZON) was investigated as well as the interaction between *G. roseum* and *F. graminearum*. The Fusarium toxin ZON is harmful to animal and man due to its estrogenic effect.

A constitutively expressed enzyme opening the lactone linkage within the macrocyclic ring system of ZON was isolated from *G. roseum*.

The production of this ZON-degrading enzyme can be enhanced by induction of gene expression by the substrate ZON itself or by its derivatives α -Zearalenol (α -ZOL), Zearalanol (ZAN) or α -Zearalanol (α -ZAL). The enzyme has been shown to catalyze the transformation of the mycotoxin ZON and has therefore been named ZON degrading enzyme. The resulting products of the enzymatic reaction are less toxic because they have lost their estrogenic capacity.

A 18480 fold purification of the enzyme was achieved by ammonium sulfate precipitation followed by chromatographic steps on anion exchange and hydrophobic interaction columns. The purified enzyme appears to be homogeneous after electrophoretic separation on acrylamide gels. The molecular weight was determined by SDS-PAGE and by gel filtration. V_{max} and the K_m value have also been calculated. The optimum for the ZON degrading reaction was at pH 8,0 and 40°C. The specific activity after purification to homogeneity was 0,0107 U/mg protein. The enzyme is not glycosylated at its N-terminus.

The purified enzyme showed also superoxide dismutase (SOD) activity. According to this fact it can be assumed that the ZON degrading enzyme has more than one active site. Three protein spots were evident in the preparation after 2D-electrophoresis probably representing different processed levels of the same protein. The final enzyme preparation showed at least three main spots with isoelectric points (IEP) of 5.3, 5.7 and 5.9 at the same size of 28 kDa and an additional not yet identified spot at 25 kDa with an IEP of 6,6.

The N-terminal amino acid composition of these protein spots have strong similarities (88% identity) with mitochondrial Mn-superoxide dismutases. Peptide fragments generated from tryptic digestion of the isolated protein showed also similarities to SOD.

The enzyme does not react with a polyclonal antibody prepared against human MnSOD. It is not inducible by paraquat or hydrogen peroxide as observed for many other SODs.

In summary, although an enzyme with hydrolase or esterase activity had been postulated as the degrading principal for ZON we clearly demonstrated by molecular genetical and biochemical methods that a SOD like protein is responsible for this enzymatic reaction.

Einfluss der Fermentation von Silomais auf die Nachweisbarkeit von Deoxynivalenol (DON)

W. Richter¹, M. Schuster¹, E. Rattenberger²

1 Bayerische Landesanstalt für Tierzucht, Grub. Postfach 1180 85586 Poing, Tel. 08999141 – 440, Telefax 08999141 – 105, E-Mail: richte @ blt.bayern.de

2 Tiergesundheitsdienst Bayern e.V., Senator-Gerauer-Str., 23 85586 Poing

Vorfrucht, Sorte, Bodenbearbeitung und Witterung zur Blüte wie zur Ernte bestimmen den Befall des Futtergetreides mit Fusarien. Verbunden damit ist das Vorkommen von Mykotoxinen, die von den Fusarien gebildet wurden. Am häufigsten wird das Mykotoxin Deoxynivalenol (DON), das der Gruppe der Trichothecene zugerechnet wird, nachgewiesen. Unbestritten ist der Einfluss dieses Toxins auf die tierischen Leistungen, insbesondere beim Schwein (RICHTER et al. 1996), und die Tiergesundheit. VALENTA und OLDENBURG (1995) konnten Zearalenon in Maissilage bestimmen. ZEILINGER 1986 weist den Abbau des Fusarientoxins Diacetoxyscirpenol in Grassilage nach. Das komplexe Geschehen der Fermentation von Gras oder Mais könnte eventuell Möglichkeiten der Reduktion aufweisen, wobei die Reduktion nicht zwingend eine geringere Toxizität mit sich bringt. Dies ist aber noch nachzuweisen. In einem ersten Schritt sollte mit dem Einsilieren von DON-belastetem Ausgangsmaterial nachgewiesen werden ob mit den vorhandenen Analysemethoden DON nach dem Einsilieren noch nachgewiesen werden kann.

DON – Gehalte (mg/kg) in Ausgangsmaterial und Silagen

Versuch	Ausgangsmaterial	Silage	Gärqualität
WW* Körner in Silomais einsiliert	2,4	< NWG	sehr gut
WW* Körner in CCM einsiliert	0,25	> NWG	sehr gut
Maisschrot in Silomais einsiliert	46	15,7	gut
Silomais	3,7	0,7	gut

* WW = Winterweizen

In Silierversuchen mit einsiliertem, mit DON kontaminiertem, Weizen konnte im Laborsilo bei sehr guter Gärqualität eine vollständige Reduktion von DON erreicht werden. Das Einsilieren von DON kontaminiertem Maisschrot führte bei guter Gärqualität zu einer deutlichen Reduktion von DON im fermentierten Maisschrot. Die Untersuchung von mit DON kontaminiertem Silomais und den daraus hergestellten Silagen führte zu einer deutlichen Reduktion. Ob es sich bei der Reduktion nur um eine Transformation oder Metabolitenbildung handelt konnte mit der vorhanden Analytik nicht geklärt werden. Auf Forschungsbedarf im Hinblick Analytik und Toxizität von DON in fermentierten Produkten wird hingewiesen.

Fusarientoxine in Lebensmitteln

M. Schollenberger, H.-M. Müller, W. Drochner

Institut für Tierernährung der Universität Hohenheim

Zum Vorkommen von Fusarientoxinen in Getreide existiert umfangreiches Datenmaterial, das die weltweite Verbreitung dieser Mykotoxine dokumentiert. Obwohl Getreideprodukte in der menschlichen Ernährung eine wichtige Rolle spielen, wurden bisher jedoch nur relativ wenige Untersuchungen zur Erfassung der Belastung von Lebensmitteln selbst durchgeführt. Da es während der Lebensmittelverarbeitung zu Abnahme (z. B. durch Reinigung des Getreides, durch Backprozesse) oder Fraktionierung (z.B. beim Mahlen) der Toxine kommen kann, ist ein Rückschluß von den Toxinkonzentrationen im Getreide auf die Gehalte in Lebensmitteln jedoch sehr schwierig. Nun wird in Deutschland die Einführung von Grenzwerten für Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) in Lebensmitteln diskutiert. Die vorliegende Untersuchung soll zur Information beitragen, wie hoch die Belastung von Lebensmitteln mit Fusarientoxinen ist und in welchem Prozentsatz an Proben die Konzentration der diskutierten Grenzwerte überschritten wurde.

Bestimmt wurde der Gehalt der Trichothecene Nivalenol, DON, Fusarenon-X, 15-Acetyldeoxynivalenol, 3-Acetyldeoxynivalenol, HT-2 Toxin und T-2 Toxin mittels GC/MS in Weizen für die menschliche Ernährung, in Weizenmehlen sowie Brot und Nudeln. ZON und seine Alkohole wurden mittels HPLC/Fluoreszenzdetektion in Weizen und Weizenmehlen analysiert. Die Nachweisgrenzen für die Toxine lagen zwischen 1 und 12 µg/kg. Die Weizenproben stammten aus den Ernten 1998 und 2000 aus Lagerhäusern in Baden-Württemberg, die anderen Lebensmittelproben aus dem Lebensmittelhandel im Großraum Stuttgart. Die Proben an Weizenmehl wurden im ersten Halbjahr 1999, die Proben an Brot und Nudeln jeweils im ersten Halbjahr 1998 bzw. 1999 entnommen.

Von den analysierten Toxinen wurde Deoxynivalenol in den untersuchten Lebensmittelgruppen mit der größten Häufigkeit und mit den höchsten Gehalten bestimmt. Die mittleren Gehalte lagen für Weizen, Weizenmehl, Brot und Nudeln bei 471, 292, 134 bzw. 322 µg/kg. Zearalenon wurde in Weizen und Weizenmehl untersucht und war hier das zweithäufigste Toxin, die Gehalte in den positiven Proben lagen zwischen 2 und 158 µg/kg. Fusarenon-X, α- und β-Zearalenol waren in keiner Probe nachweisbar. Die Zahl der positiven Proben für die anderen Toxine bewegte sich zwischen 0 und 24 %.

Z. Zt wird in Deutschland die Einführung eines Grenzwertes für Deoxynivalenol und Zearalenon in Lebensmitteln diskutiert. Der größte prozentuale Anteil an Proben über dem diskutierten Grenzwert wurde für das DON beim Weizen der Ernte 1998 mit 32 % ermittelt. In den Weizenproben der Ernten 2000 lag dieser Wert bei 9 %. Bei den Weizenmehlproben die im ersten Halbjahr 1999 entnommen wurden, lagen 15 % über 500 µg/kg. Die Proben an Nudeln und Brot stammten aus den ersten Halbjahren 1998 und 1999, es lagen 9 % der Nudelproben und 5 % der Brotproben über den vorgeschlagenen Grenzwerten.

Die Untersuchung zeigt, daß in einzelnen Lebensmittelgruppen mit einem höheren Prozentsatz an Proben über dem diskutierten Grenzwert für DON gerechnet werden muß und daß die in den Lebensmitteln erreichten Gehalte die Grenzwerte um ein Mehrfaches übersteigen können.

Production of the mycotoxin 8-deoxy-trichothecin by *Spicellum roseum* isolated from a cultivated mushroom in Japan

Kenji Tanaka¹, Ronald D. Plattner², Reiko Yamagishi¹, Masatoshi Minamisawa³, Masaru Manabe³, Shoichi Kawasugi⁴, Manfred Gareis⁵ and Gen Okada⁶

¹ National Food Research Institute, Japan,

² NCAUR, ARS, USDA, U.S.A.,

³ Japan Grain Inspection Association, Japan,

⁴ Japan International Research Centre for Agricultural Sciences, Japan,

⁵ Institute for Microbiology and Toxicology, Federal Centre of Meat Research, Germany,

⁶ Japan Collection of Microorganisms, RIKEN (The Institute of Physical and Chemical Research), Japan

Spicellum roseum is the causative agent of the pink mold damping-off disease and has been isolated from *Flammulina velutipes*, a kind of Japanese mushroom. Identification of the fungal strain was done morphologically and by rDNA sequence analysis (Okada et al.¹). The ability of *S. roseum* to produce trichothecene mycotoxins was reported by Seifert et al.². In the study presented here we examined whether the Japanese strains isolated from mushroom are trichothecene producers or not.

For that reason the strains were inoculated on rice medium and cultured at 25°C for 2 weeks. Following extraction and clean-up of the samples, the extracts were trimethylsilylated and analysed by GC-ECD and GC-MS (gas chromatography -electron capture detection and mass spectrometry, respectively).

8-Deoxy-trichothecin was detected and confirmed with GC-MS by means of EI (electron impact) and CI (chemical ionisation) mode. However, deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, fusarenon-X and nivalenol were not detected in the extract, all of which are well known to be detected from scabby wheat. Fractionated sample revealed the toxicity against *Moina macrocopa*, a kind of animal plankton, and cultured animal cells (MTT-bioassay with swine kidney target cells). The toxicity of 8-deoxy-trichothecin has not been known yet. Further experiments will be needed hereafter and are in progress.

References

¹ Gen Okada, Akiko Takematsu, Takashi Sugita, Keith A. Seifert and Katsuji Yamanaka: *Proceedings of the 6th International Symposium of the Mycological Society of Japan*, p. 66 (1998)

² Keith A. Seifert, Gerry Loui-Seize and Marc E. Savard: *Mycologia*, **89**(2), 250-257 (1997).

Deoxynivalenol in Lebensmitteln: Ergebnisse einer Pilotstudie

P. Majerus¹, V. Curtui², H. Otteneder¹ und E. Usleber²

¹ Landesuntersuchungsamt - Institut für Lebensmittelchemie, Maximineracht 11a, 54295 Trier

² Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig-Universität, Ludwigstrasse 21, 35390 Giessen

Zur Abschätzung der Belastung von Lebensmitteln mit Deoxynivalenol wurden 2001 in einem vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin* geförderten Pilotprojekt, schwerpunktmäßig 333 Proben im Einzelhandel (Region Trier bzw. Giessen) beschafft. Die Untersuchung auf DON erfolgte mittels Enzymimmuntest bzw. mittels HPLC (mit IAC-Reinigung). Die Nachweisgrenzen lagen je nach Produktgruppe zwischen 20 ng/g und 100 ng/g. Die Untersuchungsergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Probenart	ZEBS-CODE	n	n positiv	% positiv	Minimalwert (µg/kg)	Maximalwert (µg/kg)	Mittelw. positive Proben (µg/kg)	Median positive Proben (µg/kg)
Alle Proben		333	177	53	22	3020	251	142
Getreide, -mischungen	150...	7	3	43	131	370	224	172
Roggenmehle	16010.	13	11	85	50	167	91	86
Weizenmehle	16011.	81	59	73	25	497	161	124
Weizengrieß	16020.	22	19	86	72	1260	626	587
Kleie	16080.	9	8	89	104	549	237	187
Flocken	1609..	23	7	30	48	598	194	129
Müsli	1611..	6	2	33	53	187	-	-
Brotbackmisch.	162...	9	9	100	63	326	168	168
Brot	17....	32	11	34	32	197	90	87
Nudeln (v.a. aus Hartweizen)	220...	44	28	64	50	3020	472	297
Säulings-, Kleinkindernahrung	480...	70	12	17	22	283	104	104
Sonstige		17	7	41	55	150	104	98

Aufgrund dieser Daten zeichnet sich für einzelne Produktgruppen, insbesondere Hartweizenprodukte, eine erhöhte Belastung mit Deoxynivalenol ab, was im Hinblick auf künftige Höchstmengenregelungen kritisch zu sehen ist. In Säuglings- und Kleinkindernahrungsmitteln scheint eine Belastung mit DON bei entsprechender Anstrengung in der Rohwarekontrolle seitens der Hersteller prinzipiell vermeidbar zu sein. Weitergehende Untersuchungen zur Optimierung der Analytik von DON sowie zur Ermittlung der Belastung des Verbrauchers unter Einbeziehung weiterer Fusarientoxine (insbesondere Zearalenon) drängen sich aufgrund dieser Ergebnisse auf.

* Unser besonderer Dank für die Bereitstellung der Mittel gilt Frau Zimmermann und Herrn Dr. Weber

Verbundforschungsprojekt "Analytik und Vorkommen wichtiger Fusarientoxine (Deoxynivalenol und Zearalenon) sowie Aufnahme dieser Toxine durch den deutschen Verbraucher"

Johann Lepschy¹, Erwin Märtlbauer², Gerhard Thielert³, Ewald Usleber⁴, Rudolf Weber⁵, Joachim Wolff⁶

¹ Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Vöttinger Strasse 38, 85354 Freising

² Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstrasse 13, 80539 München

³ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt, Fidelis-Graf-Strasse 1, 72488 Sigmaringen

⁴ Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig-Universität, Ludwigstrasse 21, 35390 Giessen

⁵ Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Thielallee 88-92, 14195 Berlin

⁶ Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung, Schützenberg 12, 32756 Detmold

Durch die seit 1999 in mehreren "Opinions" des wissenschaftlichen Ausschuß für Lebensmittel der Europäischen Union publizierten - derzeit überwiegend noch vorläufigen - tolerierbaren Tageshöchstaufnahmen (tTDI bzw. TDI) für eine Reihe von Fusarientoxinen besteht im Hinblick auf den gesundheitlichen Verbraucherschutz konkreter Handlungsbedarf zur Einhaltung dieser Höchstwerte über die gesamte menschliche Nahrungsaufnahme. In der Literatur finden sich zwar zahlreiche Angaben zum weltweiten Vorkommen von Fusarientoxinen in Getreide. Diese Arbeiten basieren allerdings stets auf relativ kleinen Stichprobenzahlen, in den meisten Fällen wurde Getreide aus der regionalen Ernte untersucht. Mehr noch, aus vielen Arbeiten geht nicht klar hervor, ob es sich um visuell stark kontaminiertes oder einwandfreies Probenmaterial, ob es sich um Getreide für Lebens- oder Futtermittel handelte. Problematisch für eine Bewertung der Belastungssituation des Verbrauchers in Deutschland, vorbereitend für die Festsetzung von Höchstmengen in Lebensmitteln, sind insbesondere folgende Aspekte zu nennen:

- Aufgrund methodisch/analytischer Unterschiede ist häufig eine Vergleichbarkeit der publizierten Ergebnisse nicht gegeben.
- Potentiell belastete getreidehaltige Lebensmittel sind oft von komplexer, zusammengesetzter Natur. Validierte und zuverlässige Untersuchungsverfahren für verarbeitete Lebensmittel existieren derzeit nicht.
- Eine umfassende oder gar repräsentative Probennahme und Untersuchung potentiell belasteter Produkte auf Fusarientoxine existiert im Lebensmittelbereich nicht.
- Untersuchungen zu Minimierungsstrategien und müllereitechnischen Verfahren zur Reduzierung der Toxinbelastung in Lebensmitteln fehlen

Ziel des hier vorgestellten, vom deutschen Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft geförderten Verbundforschungsprojekts (BLE 00HS055) ist die Schließung dieser Wissenslücken für die zwei wichtigsten Fusarientoxine, Deoxynivalenol und Zearalenon. In den ersten Monaten des Projektzeitraums von 3 Jahren wurden überwiegend analytische Aspekte bearbeitet. Zur Vermeidung systematischer analytischer Fehler wird mit einem breiten Methodenspektrum (verschiedene Extraktionsmittel- und -verfahren; Extraktreinigung mittels physikalisch-chemischer oder immunaffinitätschromatographischer Verfahren; Detektion mittels Enzymimmuntests, HPLC (UV- oder Fluoreszenzdetektion) bzw. LC-MS/MS) gearbeitet. Erste Ergebnisse mit einfach strukturierten Probenmatrizes zeigen, dass die beteiligten Institute mit recht guter Vergleichbarkeit arbeiten.

In ersten Untersuchungsreihen zeichnen sich folgende Ergebnisse ab:

- Die DON- Konzentration von Mehlen liegt normalerweise im Bereich von 100-200 µg/ kg DON.
- Durumweizen und Teigwaren weisen z.T. hohe DON-Belastungen bis zu 3000 µg/kg auf.
- Die vermeidbare DON-Belastung von Kleinkindernahrung mit DON rechtfertigt Forderungen nach Höchstmengen.

Untersuchung von Lebensmitteln im Rahmen des Fusarientoxin-Überwachungsprogramms des Landes Sachsen-Anhalt

Katrin Woese

Landesuntersuchungsamt für Gesundheits-, Umwelt- und Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, Fachbereich Lebensmittelsicherheit, Freiimfelder Str. 66-68, 06112 Halle

In Sachsen-Anhalt wurde wie auch deutschlandweit in den vergangenen Jahren bei entsprechend günstigen Witterungsbedingungen sowie veränderten Fruchtfolgen und Bodenbearbeitungstechnologien in der Landwirtschaft ein starker Befall des angebauten Getreides mit Fusarien festgestellt. Eine stichprobenartige Untersuchung ergab die Korrelation mit hohen Gehalten an den Mykotoxinen Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon. Vor diesem Hintergrund wurde im Jahr 2001 von verschiedenen Landeseinrichtungen gemeinsam ein „Fusarien- und Fusarientoxinüberwachungsprogramm Sachsen-Anhalt“ initiiert, um über eine Laufzeit von mehreren Jahren durch die Feststellung des Umfangs des Fusarien-Befalls auf dem Feld und die Ermittlung der Mykotoxingehalte von Getreide auf allen Erzeugungs- und Verarbeitungsstufen ein möglichst wirklichkeitsgerechtes Bild der Belastung einheimischer Produkte zu gewinnen.

Nachdem auf dem Mykotoxin-Workshop 2001 bereits erste Ergebnisse vorgestellt wurden, soll nun eine Gesamtauswertung der Untersuchung von Getreide aus Getreidelägern sowie von Mehlen, Backmischungen, Braugerste, Malz und Bier mit gesichert sachsen-anhaltinischer Herkunft auf die Belastung mit DON und Zearalenon im Jahr 2001 vorgenommen werden.

Insgesamt wurden 162 Proben untersucht. Aus den Daten wird deutlich, daß DON im Berichtszeitraum für sachsen-anhaltinisches Lebensmittel-Getreide und daraus hergestellte Produkte kein Problem darstellte. Beobachtet werden konnte die für Mykotoxinkontaminationen typische sogenannte schiefe Verteilung der Werte, d. h., einige wenige Proben waren relativ hoch belastet, während die Mehrzahl der untersuchten Lebensmittel keine oder nur geringe Belastungen aufwies. Der Medianwert lag für alle untersuchten Probenarten unterhalb der Bestimmungsgrenze von 70 µg/kg, während der Mittelwert für Weizen und Gerste die Bestimmungsgrenze deutlich überschritt. Auffällig war die von Getreide zu Verarbeitungsprodukten hin abnehmende DON-Belastung. Dieser Effekt ist mit einer Reinigung des Getreides bzw. mit einer Entfernung der äußeren, im Vergleich zum Korninneren höher belasteten Kornschichten, im Verlauf der Verarbeitung zu erklären. Nur eine Probe überschritt mit einem Deoxynivalenol-Gehalt von 913 µg/kg den Empfehlungswert der EU.

Zearalenon war nur in einer der 162 Proben, einem Braumalz, quantifizierbar. In einer weiteren (Roggen-) Probe konnte das Toxin qualitativ nachgewiesen werden; der ermittelte Gehalt lag jedoch mit 4,4 µg/kg unter der Bestimmungsgrenze der Analysenmethode von 20 µg/kg. Somit wies nur 1 % der untersuchten Erzeugnisse eine (geringe) Zearalenonkontamination auf. Die Zearalenonbelastung der Verbraucher durch Getreide und Getreideprodukte aus Sachsen-Anhalt war somit im Berichtszeitraum vernachlässigbar.

Evaluation of the effect of measures taken after a DON outbreak

M.C. Spanjer, J.M. Scholten and P.M. Rensen

Inspectorate for Health Protection, Hoogte Kadijk 401, 1018 BK Amsterdam, The Netherlands,
Tel: ++ 31 20 524 4703, Fax: ++ 31 20 524 4700, E-mail: Martien.Spanjer@kvw.nl

In april 1999 an amount of 2600 µg/kg DON was found in a sample breakfast cereals in the Netherlands. This event was the start of a lot of activities which dealt with the prevention, control, health and consumer aspects of DON in food for human consumption. The Food Inspection Services started a monitoring program to measure DON in cereal products, flour and raw cereals. The National Institute of Public Health and the Environment, another part of the Ministry of Health in the Netherlands, was asked to carry out a risk analysis on DON. This was the basis for the Minister of Health to set an action limit for consumer products. She also informed Brussels and asked for a European limit. The Main Board on Agriculture set out to implement measures to be taken at harvesting, milling and bread baking industry. The Scientific Committee on Food expressed an opinion on DON in december 1999. Worldwide attention was also raised and lead to discussion of a DON limit by JECFA in february 2001.

In the period may 1999 until march 2002 a number of more than 1700 samples were analysed on DON. These originated from the cereal harvest of the years 1998 until 2001. The results showed a sharp decrease of DON content in samples of harvest 1999 when compared to 1998. This lower level was maintained in the 2000 and 2001 harvests. Apparently the measures taken to control the DON level succeeded to maintain values below the action limits. Nevertheless these activities a smaller outbreak of DON appeared in pasta products at a lower extent. This indicated that control should be done systematically, not sporadically, and at a European level, which is made possible since EC has set a limit in july 2000. Analytical results of the measurements are presented, together with the chronological order of the associated activities of national, EU and worldwide bodies on human health control. Special attention is paid to DON in bread, related to the level in flour.

Andere Mycotoxine

Poster

Belastung von Winterweizen mit *Alternaria*-Mykotoxinen im Land Brandenburg

Marina Müller, G. v. d. Waydrink, M. Peters und K. Umann

Zentrum für Agrarlandschafts- und Landnutzungsforschung (ZALF) e.V., Institut für Primärproduktion und Mikrobielle Ökologie, Gutshof 7, 14641 Paulinenaue; e-mail: mmueller@zalf.de

Über eine Kontamination landwirtschaftlicher Nutzpflanzen mit *Alternaria*-Toxinen liegen in Deutschland bisher nur wenig Erkenntnisse vor. Verglichen mit der Bedeutung der Gattung *Alternaria* als natürlicher Besatz der Pflanzenoberfläche gibt es nur wenige Angaben, ob diese Pilze auch unter natürlichen Bedingungen auf dem Feld Mykotoxine bilden.

Zu den wichtigsten *Alternaria* Toxinen gehören die beiden Dibenzo- α -pyrone Alternariol (AOH) und Alternariolmonomethylether (AME) sowie das Derivat der Tetransäure Tenuazonensäure (TeA).

Es werden die Analyseverfahren zum Nachweis der drei Toxine in Winterweizen vorgestellt: Nach Extraktion mit Acetonitril/KCl wird ein Teil des Filtrats durch Flüssig/Flüssig-Verteilung weiter gereinigt auf AOH und AME. TeA wird nach Ansäuerung mit Dichlormethan extrahiert. Die Analyse erfolgt nach der Trennung an C18-Säulen mittels HPLC mit Fluoreszenz- (AOH, AME) bzw. UV-(TeA) Detektion. Eine Bestätigung erfolgt durch Dioden-Array-Detektion.

Es werden Winterweizen-Proben (n=157) aus den Jahren 2000 und 2001 untersucht, die sowohl aus Feldversuchsanlagen des ZALF Müncheberg als auch aus landwirtschaftlichen Praxisbetrieben aus verschiedenen Gebieten Brandenburgs stammen. Gleichzeitig mit der Probenahme wurden Angaben zu den durchgeführten Pflanzenschutzmaßnahmen, der Düngung, der Bodenbearbeitung, der angebauten Sorte und der Vorfrucht erhoben. Ähnlich wie die Untersuchungen zum Einfluß von agrotechnischen Maßnahmen auf die Fusariumtoxin-Bildung in landwirtschaftlichen Produkten, ist es auch hier Ziel der Untersuchungen, Ursachen und Einflussfaktoren für eine mögliche Kontamination von Winterweizen mit *Alternaria*-Toxinen aufzuzeigen mit dem Ziel, diese Risiken zu vermeiden.

Die Belastung der untersuchten Ernte-Proben mit AOH, AME und TeA war insgesamt gering, es konnte nur in wenigen Proben AME (30-100 ppb) und TeA (20-170 ppb) nachgewiesen werden. Einige mitgeführte Strohproben wiesen dagegen höhere Gehalte (vor allem bei TeA bis 400 ppb) auf.

Der Umfang der Forschungen auf diesem Gebiet ist zu gering, um eine reale Einschätzung des Kontaminierungsgrades von Getreide und Mais mit *Alternaria*-Toxinen zu geben. Da schon einfache Erhebungsuntersuchungen in größerem Umfang und über längere Zeiträume zum Vorkommen von AOH, AME und TeA fehlen, sind der Einfluß von agrotechnischen Maßnahmen wie Bodenbearbeitung, Fruchtfolge, Düngung und Pflanzenschutz völlig ungeklärt.

Vorkommen von Patulin in Früchten und Fruchtsäften in der Türkei

M. Arici, M. Demirci, T. Gümüs

Trakya Universität Fakultät für Landwirtschaft Institut für Lebensmittelingenieurwesen 59030 Tekirdag, Türkei

Mykotoxine sind Stoffwechselprodukte, die beim Wachstum von Pilzen auf Lebens- und Futtermitteln gebildet werden können und toxisch für Mensch und Tier sind. Es ist eine Tatsache, daß spontan verschimmelte Lebens- und Futtermittel wegen ihrer Toxingehalte eine immer größer werdende Gefahrenquelle für die Gesundheit darstellen.

In dieser Arbeit wurde das Vorkommen von Patulin in Früchten und Fruchtsäften in der Türkei untersucht. In Rahmen dieser Arbeit wurden 41 Früchten und 55 Fruchtsäften analysiert. Davon gehörten insgesamt 10 Kirschen, 10 Erdbeeren, 5 Himbeeren, 6 weiße Maulbeeren, 10 schwarze Maulbeeren, 30 Apfelsaft und 25 Pfirsichsaft.

In 9 aus 10 Kirsche zwischen 5,6 und 113,3 ppb; in 4 aus 6 weißen Maulbeeren zwischen 32-426 ppb; in 3 aus 5 Himbeeren 48-746 ppb; in 8 aus 10 Erdbeeren 1,23-144,68 ppb; in 7 aus 10 schwarzen Maulbeeren 6,85-157,4 ppb konnte Patulin gefunden werden.

In 12 aus 30 Apfelsaftproben zwischen 3,23 und 106,99 ppb, und 11 aus 25 Pfirsichsaftproben zwischen 4,26 und 93,17 ppb wurden Patulin gefunden.

Vorkommen und Nachweis von Fusarinsäure in Weizen

Karsten Meyer, Sibylle Wenz und Johann Bauer

Lehrstuhl für Tierhygiene, Technische Universität München, 85354 Freising-Weihenstephan

In der landwirtschaftlichen Praxis werden immer wieder Fälle beschrieben, in denen klinisch auf Mykotoxine zurückgeführte Krankheitsbilder nicht mit entsprechenden Gehalten im Futter bestätigt werden konnten. Eine Erklärung für diesen Sachverhalt kann, neben der Möglichkeit einer falschen klinischen Diagnose, nach heutigem Kenntnisstand zum einen in dem Zusammenwirken von verschiedenen die Gesundheit negativ beeinflussenden biotischen und abiotischen Faktoren gesehen werden, zum anderen aber auch in der nicht vollständigen analytischen Erfassung der auf das Tier einwirkenden Mykotoxine.

Als Beispiel für synergistische Effekte von Fusarientoxinen kann die Wirkung der toxikologisch bisher wenig beachteten Fusarinsäure angeführt werden. Fusarinsäure wird aufgrund seiner geringen Toxizität gegenüber dem tierischen Organismus als Phytotoxin klassifiziert (Porter et al., 1995; Karlovsky, 1999). Andererseits ist jedoch eine toxizitätsverstärkende Wirkung dieser in der Futtermittelanalytik selten erfassten Substanz sowohl gegenüber Deoxynivalenol (Smith et al., 1997) als auch gegenüber Fumonisin B₁ beschrieben worden.

Aus diesem Grund wurde ein Nachweisverfahren für Fusarinsäure entwickelt sowie Weizen und Weizenprodukte auf das Vorkommen dieser Substanz untersucht.

Die Extraktion und Aufreinigung des Probenmaterials erfolgte in Anlehnung an Porter et al. (1995). Die Analyse der Extrakte erfolgte mittels Gaschromatographie, wahlweise gekoppelt an einen Flammenionisationsdetektor (GC-FID) oder ein Massenspektrometer (GC-MS). Zur Derivatisierung erwies sich MBDSTFA (N-Methyl-N-tert-butyldimethylsilyl-trifluoroacetamid) gegenüber verschiedenen Trimethylsilyl-Verbindungen hinsichtlich Nachweisgrenze und Reproduzierbarkeit als weitaus besser geeignet.

Die Analyse mittels GC-FID war mit einer Nachweisgrenze von 500 µg/kg nicht empfindlich genug, um Fusarinsäure in den ausgewählten Weizenproben detektieren zu können. Wurde dagegen GC-MS als Nachweisverfahren eingesetzt, so gestattete die Selektivität und Sensitivität der Methode die Bestimmung von Fusarinsäure in 78 % der Proben (n=33). Die Konzentrationen lagen in einem Bereich von 7 bis 570 µg/kg (Mittelwert 134 µg/kg). Hierbei waren allerdings deutliche Unterschiede hinsichtlich der Probenart erkennbar: Während Feldproben (n=6) mit durchschnittlich 332 µg/kg belastet waren, wiesen gereinigte Körner aus dem Handel (n=9) lediglich 138 µg/kg im Mittel auf. Gemahlene Vollkornprodukte (n=8) enthielten durchschnittlich 68 µg/kg.

Obwohl die geringe Probenanzahl keine endgültigen Schlussfolgerungen zulässt, kann die toxikologische Relevanz der Fusarinsäure allein wohl als gering eingestuft werden. Inwieweit jedoch die Synergismen mit Deoxynivalenol und Fumonisin B₁ diese Bewertung beeinflussen, muss an dieser Stelle offen bleiben.

Karlovsky P. (1999) *Nat Toxins* **7**, 1-23

Porter J.K., Bacon, C.W., Wray, E.M., Hagler, W.M. (1995) *Nat Toxins* **3**, 91-100

Smith, T.K., McMillan, E.G., Castillo, J.B. (1997) *J Anim Sci* **75**, 2184-2191

Degradation of Aflatoxin B₁ by Non-enzymatic Browning in Fig Products

Joerg Stroka, Teri Vrabcheva and Elke Anklam

European Commission, Joint Research Centre, Food Products Unit, I-21020 Ispra

Aflatoxins are mycotoxins known to occur in various food products. Amongst these are figs which can be heavily contaminated. Aflatoxins are considered to be stable in most food processing techniques (e.g. heat). Contaminated feedingstuff can be treated with alkaline vapours such as NH₃ or ozone for decontamination with a significant effect (damage) on the material in total.

Despite the stability of aflatoxins towards heat, it was found that heat treated fig material resulted in lower recovery levels. This was initially observed during the preparation of an intercomparison study, when homogenized fig paste (the future test material) was autoclaved for sterilization and subsequently analysed for homogeneity. As a result, a correlation between the intensity of colour of the extracts and the analysed aflatoxin levels was observed.

This 'degradation effect' was further investigated with aflatoxin B₁ (main aflatoxin) in order to establish the relationship between heat indicators such as the colour of the extract and the occurrence of 5-hydroxymethylfurfural (HMF). Both parameters are indicators for the so called Maillard Reaction (heat induced non-enzymatic browning) as it can occur in food products containing proteins and reducing monosaccharides. The results are presented in this paper.

Inhaltstoffe aus Rotschimmelreis von *Monascus purpureus*

D. Wild¹, M. Gareis¹, H.-U. Humpf²

¹ Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, Bundesanstalt für Fleischforschung, D-95326 Kulmbach;

² Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Universität Würzburg

Monascus purpureus dient in ostasiatischen Ländern zur Herstellung von Rotschimmelreis, der ohne weitere Reinigung zum Färben und Konservieren von Lebensmitteln sowie als „health food“ verwendet wird. Auch in Europa wird in den letzten Jahren für Rotschimmelreis geworben. Die *Monascus*-Metaboliten sind jedoch bezüglich chemischer Struktur und möglicher toxischer Wirkungen nur lückenhaft untersucht und eine moderne Analytik des Rotschimmelreises fehlt bisher. Das Mykotoxin Citrinin wurde im Rotschimmelreis erst 1995 entdeckt, obwohl es in beträchtlichen Konzentrationen gebildet wird. Wir haben daher eine HPLC-Methode zur Bestimmung der 6 Hauptfarbstoffe und weiterer Metaboliten von *M. purpureus* entwickelt.

M. purpureus DSM1379 wurde auf verschiedenen Medien kultiviert; in den erhaltenen Rotschimmelreischargen wurden die Gehalte der gelben, orangen und roten Farbstoffe und des Citrinins bestimmt. Zusätzlich wurde ein neu identifizierter Metabolit, Monascodilon, bestimmt.

Auf allen Medien werden die gelben Farbstoffe Monascin und Ankaflavin in den größten Mengen gebildet, auf Reismehl bis 50 mg/g Rotschimmelreis. Die Bildung der orangen Farbstoffe Rubropunctatin und Monascorubrin hängt stark vom Medium ab. Citriningehalte liegen um 1 mg/g. Monascodilon entsteht bei thermischer Behandlung von Rotschimmelreis und erreicht Gehalte bis 5 mg/g. Monacoline, die als *Monascus*-Metaboliten literaturbekannt sind, werden von *M. purpureus* DSM1379 nicht gebildet. Insgesamt zeigt sich eine ausgeprägte Variabilität der Zusammensetzung von Rotschimmelreis und eine Abhängigkeit vom Stamm und Medium.

Sterigmatocystin Derivatization

Lubomir Dasko, Joerg Stroka and Elke Anklam

European Commission, Joint Research Centre, Food Products Unit, I-21020 Ispra

Sterigmatocystin is a well-known mycotoxin, which is not at the top level of interest of food market surveillance agencies. This mycotoxin is produced by *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus nidulas* and other *Aspergillus* species, as well as by *Emericella rugulosa*, variety *labra*. These fungi can be found, e.g., in maize, cheese and also in our dwellings []. Sterigmatocystin is supposed to be the precursor of aflatoxin B₁. The International Agency for Research on Cancer (IARC) of the World Health Organization (WHO) defines this substance in category 2B – possible human carcinogen. A hepatocarcinogenic effect was confirmed on rats [].

The most sensitive method currently available allows to detect sterigmatocystin up to the ppb level [] and involves LC/MS. However, it would be helpful to have more simple but sensitive methods for the detection of sterigmatocystin, such as thin layer chromatography (TLC). One of the most often applied TLC method uses an AlCl₃ derivatization, in order to induce fluorescence to detect sterigmatocystin []. However, the absolute fluorescence obtained with this method is still not comparable with that obtained for aflatoxins; therefore a more sensitive detection method is desired.

We present here the features of an analytical method that could be suitable for the detection of sterigmatocystin at ppb level. Various chemical agents for derivatization of sterigmatocystin with the aim to improve its UV or fluorescence response have been investigated in order to enhance the fluorescence response. This would improve the selectivity and also the detection level. Various acids, which are supposed to increase fluorescence [] as well as other cations instead of Al³⁺ and organic substances have been investigated. TLC was used as a preliminary screening tool for this approach while HPLC with UV and fluorescence detection was subsequently applied.

References

1. Nielsen K.F., S. Gravesen, P.A. Nielsen, B. Andersen, U. Thrane, J.C. Frisvad: *Mycopathologia* 145 (1999) 43
2. International Agency for Research on Cancer by WHO, <http://www.who.int>
3. Scudamore K.A., M.T. Hetmanski, P.A. Clarke, K.A. Barnes, J.R. Startin: *Food Additives and Contaminants* 13 (1996) 343
4. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Addition Volume II, Chapter 49, p.43
5. Maness D.D., L.W. Schneider, G. Sullivan, G.Y. Yakatan, J. Scholler: *J. Agric. Food Chem.* 24 (1976) 961

**Monitoring
und
Qualitätssicherung
Poster**

European Mycotoxin Awareness Network

R. Lawley, A. Eggington, M. Piacentini, P. Wilson and P. Patel

Leatherhead Food RA, Randalls Road, Leatherhead, Surrey KT22 7RY, UK
Tel: +44(0)1372 822386, Fax: +44(0)1372 822229, E-mail: RLawley@LFRA.co.uk

Abstract

Mycotoxins are fungal metabolites present in a large part of the world's food supply and pose a potential threat to food safety. Since their discovery, mycotoxins have attracted a great deal of interest and excellent research has been done by a number of scientific groups. Communication of the findings between the industry and other bodies is vital. Therefore, the formed Network is composed of a group of multidisciplinary experts and national contact points, responsible for alerting all interested members on the latest mycotoxin-related issues.

The objectives of this project are:

- a) to establish communication links between individuals, businesses or organisations that are interested or affected by mycotoxin-related issues,
- b) to establish web links and frequently up-date the Network members electronically and
- c) to continue the Network between the partners after the project term by running it on a self-financing basis.

Each member is responsible in several activities for the benefit of all. Such activities involve designing, setting up and maintaining the Network web site, providing information and training courses, act as national contact points for Network enquiries and generally maintain the international effectiveness of the project. The expected project outcomes are to up-date the web site as frequently as possible, to organise conferences and workshops annually, to produce and distribute newsletters biannually and fact/info sheets frequently and perform web based training courses frequently. The overall outcome would be the establishment of a European Network that can provide readily available information on many aspects of mycotoxins primarily via the web (www.mycotoxins.org).

Acknowledgements

The authors acknowledge the European Commission, Quality of Life and Management of Living Resources Programme (QoL), Key Action 1 (KA1) on Food, Nutrition and Health, QLK1-CT-2000-01248, for partially funding this project.

Erfassung qualitätssichernder Maßnahmen hinsichtlich Mykotoxinen in der Getreidemühle

G. Randel, S. Drusch, S. Schumann und K. Schwarz

Arbeitsgruppe für Lebensmittelqualität und –sicherheit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Heinrich-Hecht Platz 10, 24118 Kiel

Problemstellung: Die mikrobielle Kontamination von Speisegetreide, Mehlen u.a. Getreiderzeugnissen steht in direktem Zusammenhang mit den Bedingungen während der Ernte, der Lagerung, der Mühlenhygiene sowie der Verarbeitungstechnologie. Die jährlichen Schadstoffuntersuchungen des Verbandes deutscher Mühlen (VDM) zeigen, dass Mykotoxine eine erhebliche Rolle in der Getreidewirtschaft spielen. Da bisher keine zuverlässigen Verfahren zur Dekontamination mykotoxinhaltiger Lebensmittel existieren, sind präventive, qualitätssichernde Maßnahmen während der Produktion und Verarbeitung pflanzlicher Rohstoffe die bedeutendste Form des Verbraucherschutzes.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung lag in der Erfassung von Qualitätskontrollen hinsichtlich Mykotoxinen in der Getreideverarbeitung sowie der Informationsweiterleitung an den Schnittstellen in der Verarbeitungskette. Aus der Mitgliederliste des VDM wurden von 465 Mühlenbetrieben mit mehr als 250t Jahresumsatz (Wirtschaftsjahr 2000/01) 104 Getreidemühlen aus allen Bundesländern zufällig ausgewählt. Die Datenerfassung erfolgte schriftlich. Die Befragungselemente wurden prozessorientiert strukturiert und umfassten die Kernpunkte Lieferantenauswahl, Rohwareneingangskontrolle, Getreidelagerung, Prozessablauf und Endproduktkontrolle.

Ergebnisse: Der Rücklauf der Befragung betrug insgesamt 47% und umfasste 39 Mühlenbetriebe. Über die Hälfte der erfassten Betriebe nutzen ein nach DIN ISO 9000ff. zertifiziertes Qualitätsmanagementsystem, wobei ein deutlicher Zusammenhang zur Betriebsgröße bzw. dem Verarbeitungsvolumen erkennbar wurde.

Gängige Untersuchungen an der Schnittstelle Rohwareneingang sind die Geruchs- und visuelle Prüfung, die Untersuchung der Kornfeuchte sowie die Besatzanalyse. Zusätzliche Maßnahmen wie eine Bewertung der Lieferanten bzw. Mykotoxinuntersuchungen werden hauptsächlich in Betrieben durchgeführt, die ein zertifiziertes QM-System etabliert haben. 22 der erfassten Betriebe (56%) lassen ihre Rohstoffe in unterschiedlicher Frequenz auf Aflatoxine untersuchen. Darüber hinaus werden Desoxynivalenol, Ochratoxin A und Zearalenon analysiert, also Mykotoxine, für die noch kein gesetzlicher Grenzwert festgesetzt ist. Die Einlagerungsdauer des Getreides, als ein kritischer Punkt im Hinblick auf das Wachstum von "Lagerpilzen", beträgt in 74% der Betriebe nicht mehr als sechs Monate. Unabhängig von der Lagerungsdauer erfassen 65% der Betriebe Parameter wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit während der Lagerung. Eine Beeinflussung der Lagerungsbedingungen z. B. durch Belüftung wird dagegen nur von 16 Betrieben (45%) vorgenommen.

69% der Betriebe haben standardisierte Endproduktspezifikationen für ihre Produkte. In diesen geben jedoch nur zwei Betriebe Auskünfte über den Mykotoxingehalt der Produkte an die Kunden weiter.

Fazit: Die Ergebnisse zeigen, dass das Instrument der Lieferantenbewertung noch nicht ausreichend genutzt wird. Dies wäre ein einfaches Mittel, um im Rahmen des Rohwareneingangs das „Gefährdungspotential“ eines Rohstoffs zu erfassen. Eigene Rückstands- und Mykotoxinuntersuchungen bzw. die Nutzung bestehender Monitoringprogramme erfolgen hauptsächlich in Betrieben mit hohem Verarbeitungsvolumen. Es ist zu überlegen, in wie weit auch für kleinere getreideverarbeitende Betriebe die Teilnahme an derartigen Programmen attraktiver gemacht werden kann. Des Weiteren sollten alternative Qualitätsmanagementsysteme erarbeitet werden, die den Gegebenheiten in kleinen Unternehmen angepasst sind und einer ISO-Zertifizierung entsprechende Transparenz für die Lebensmittelüberwachung und den Verbraucher bewirken.

MYKOMON - monitoring project of toxigenic fungi in food in years 1999 - 2001

V. Ostry, J. Ruprich, J. Skarkova, I. Prochazkova, A. Kubatova¹

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

¹ CCF - Culture Collection of Fungi, Department of Botany, Faculty of Science, Charles University, Prague, The Czech Republic

The occurrence of toxigenic micromycetes (fungi), producers of aflatoxins and ochratoxin A, in selected commodities of a consumer food basket was investigated in the study ("MYKOMON"). Special mycological examinations were concentrated, in particular, on description and characterisation of a danger follows from a presence of toxigenic micromycetes in foodstuffs in order to obtain information about the degree of contamination of food with toxigenic micromycetes. At 12 places of collection in the Czech Republic were collected 25 different commodities, i.e. in total 300 food samples, on four different dates (details are introduced in our paper in *Supplement of Mycotoxin Research from 23. Mycotoxin - Workshop in Vienna*).

Results of the study MYKOMON are shown in Table 1 - 4.

Tab. 1 Frequency of toxigenic strains *Aspergillus flavus* in food in years 1999-2001

Year	1999	2000	2001
Frequency (%)	28 (20/72)	17 (8/48)	18 (13/72)
Toxigenic strains (%)	75	63	77
Food	black pepper, black tea, caraway seeds, fine flour, fruit tea, oat flakes	black pepper, black tea, caraway seeds, fine flour, fruit tea	black pepper, black tea, caraway seeds, fine flour, fruit tea, oat flakes

Tab. 2 Frequency of toxigenic strains *Aspergillus tamaris* in food in years 1999-2001

Year	1999	2000	2001
Frequency (%)	25 (3/12)	25 (6/24)	21 (5/24)
Toxigenic strains (%)	100	67	80
Food	black pepper	black pepper, black tea	black pepper, black tea

Tab. 3 Frequency of potential toxigenic strains *Aspergillus* section *Nigri* in food in years 1999-2001

Year	1999	2000	2001
Frequency (%)	67 (40/60)	85 (41/48)	32 (27/84)
Food	black pepper, black tea, fruit tea, raisins, sweet red pepper	black pepper, black tea, fruit tea, raisins	black pepper, black tea, caraway seeds, fine flour, fruit tea, raisins, sweet red pepper

Tab. 4 Frequency of potential toxigenic strains *Penicillium crustosum* in walnuts in years 1999 -2001

Year	1999	2000	2001
Frequency (%)	25 (3/12)	25 (3/12)	33 (4/12)

Aspergillus parasiticus and *Aspergillus nomius* were not isolated. *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus ochraceus* were not isolated from the tested food too.

Abschätzung der Meßunsicherheit einer analytischen Methode für die Bestimmung von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver

R. D. Josephs, S. Harbeck, A. Bernreuther und H. Schimmel

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

Im Rahmen allgemeiner Qualitätssicherungsmaßnahmen werden Laboratorien immer häufiger dazu aufgefordert an Stelle von einfachen Standardabweichungen erweiterte Meßunsicherheiten für analytische Ergebnisse anzugeben.

Am Beispiel der ‚In-house‘-Validierung einer analytischen Methode für die Bestimmung des Mykotoxins Aflatoxin M₁ (AfM₁) in Milch und Milchpulver wird die Abschätzung der erweiterten Meßunsicherheit gemäß des „Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM)“ [1] und im Einklang mit dem „EURACHEM Guide“ [2] demonstriert.

Das validierte Bestimmungsverfahren für AfM₁ basiert im Wesentlichen auf der ISO 14501 [3]. Dabei wird die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) in Verbindung mit der Fluoreszenzdetektion nach Probenvorbereitung mittels AfM₁-spezifischer Immunoaffinitätsäulen verwendet.

Zur genauen Berechnung wurde die Meßunsicherheit in einzelne Unsicherheitsbeiträge (Standardlösung, Kalibrierung, Probeneinwaage bzw. -wiederherstellung und Wiederfindung) aufgegliedert und für jeweils zwei Konzentrationsniveaus von 0.1 und 0.4 µg AfM₁/ kg Milchpulver bestimmt.

Dabei wird deutlich, dass die Unsicherheitsbeiträge für die Standardlösung und Probeneinwaage bzw. –wiederherstellung mit 0.2 % und 0.1 % vernachlässigbar sind. Die Unsicherheit der Präzision, die sich aus den Unsicherheiten der Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit zusammensetzt, beträgt 2.0 % für das geringere und 1.2 % für das höhere Konzentrationsniveau. Den größten Beitrag liefert die Kalibrierung mit 8.9 % für das geringere Konzentrationsniveau, während der Einfluss der Kalibrierung beim höheren Niveau mit 0.6 % erwartungsgemäß gering ist. Die Wiederfindung liefert mit 6.0 % den größten Beitrag zur Messunsicherheit für das höhere Konzentrationsniveau und einen Beitrag von 4.6 % für das geringere Niveau.

Aus der Kombination der Einzelbeiträge lassen sich erweiterte Meßunsicherheiten (k=2) von 20 % für das geringere und 12 % für das höhere Konzentrationsniveau berechnen. Diese sind im Vergleich zu dem nach dem optimistischeren RSD_r-Prinzip geforderten CEN-Kriterium von = 20 % bei einem Konzentrationsniveau von 0.05 µg AfM₁/ kg flüssiger Milch als realistisch anzusehen. Da für die Bestimmung der Wiederfindung neben gespiktem und natürlich AfM₁ kontaminiertem Milchpulver bekannter Konzentration auch gespikte Mager- und Vollmilch verwendet wurde, ist bei der ausschließlichen Anwendung für Milchpulver allerdings eine größere erweiterte Meßunsicherheit zu erwarten.

Ein vereinfachtes Konzept zur Bestimmung der Meßunsicherheit soll in Zukunft im Rahmen eines Projektes zur Zertifizierung von AfM₁ in verschiedenen Milchpulvern auf die teilnehmenden Laboratorien angewendet werden. Für die Ermittlung des Wiederfindungsbeitrages werden dann die zu zertifizierenden Referenzmaterialien (CRMs) verwendet, wodurch somit auch die Rückführbarkeit gewährleistet wird.

- [1] Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, International Organization for Standardization ISO, Geneva (1993, corrected and reprinted 1995).
- [2] Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Ed. S. L. R. Ellison, M. Rosslein and A. Williams, EURACHEM/CITAC, London, 2nd Ed. (2000).
- [3] ISO 14501:1998 – Milk and milk powder – Determination of aflatoxin M₁ content – Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid chromatography.

Aerogene Exposition Poster

Cytotoxicity testing and roridin A-ELISA of samples originating from water damaged dwelling pavilions on post-flood areas.

M. Twarużek¹, M. Gareis², R. Dietrich³, J. Grajewski¹

¹ Institute of Biology and Environment Protection, Bydgoszcz University of Kazimierz Wielki, ul. Chodkiewicza 30, PL-95-064 Bydgoszcz

² Institute for Microbiology and Toxicology, Federal Centre for Meat Research, E.-C.-Baumann Str. 20, D-95326 Kulmbach

³ Institute for Hygiene and Technology of Milk, University of Munich Veterinärstr. 13, D-80539 Munich

Within the last few years the interest in construction materials and the microclimate of rooms infected by different fungi and contaminated with mycotoxins has rapidly grown in Poland. This is due to several floods which occurred in Poland during the last years and the possible adverse health effects which could be caused by the presence of fungi such as *Stachybotrys sp.*, *Aspergillus sp.* or *Penicillium sp.* in these particular environments.

The study was carried out with 74 dwelling pavilions placed in 1997 at a residential area on the post-flooded areas of Wrocław, Poland. After two years of living there, the lodgers were displaced due to visible high levels of fungal contamination found in these houses. Mycological investigations and analyses of mycotoxins by use of the MTT-cell culture bioassay with swine kidney target cells and a roridin A-enzyme immune assay have been carried out since 2001 in 10 selected houses. For that purpose air and bulk samples from the cardboard-gypsum walls have been taken from the kitchen, bathroom and the bedroom of each house.

Results of the mycological investigations showed that the most popular varieties of fungi found on the walls were: *Penicillium sp.* (27%), *Aspergillus sp.* (20%), *Chaetomium sp.* (10%), *Alternaria sp.* (7%), *Paecilomyces sp.* (7%) and *Stachybotrys sp.* (7%). The remaining 14% included: *Botrytis sp.*, *Byssosclamyces sp.*, *Trichoderma sp.*, *Acremonium sp.*, *Fusarium sp.*, *Moniliella sp.* and yeasts. The average contamination of the walls were found to be $25,2 \times 10^6$ cfu/cm². Highest levels were found in kitchens ($33,4 \times 10^6$ cfu/cm²), followed by bathrooms ($24,2 \times 10^6$ cfu/cm²) and bedrooms ($18,0 \times 10^6$ cfu/cm²). Air sampling resulted in average levels of 850 cfu/m³ with highest levels found in the bathroom 1031 cfu/m³ and nearly same levels in kitchens and bedrooms (745 and 775 cfu/m³, respectively).

Different toxicities were found in 30 bulk samples originating from the problem buildings. While 33% of the gypsum boards showed no toxicity, in 67% of the samples varying degrees of cytotoxicities could be measured in the crude extracts. The samples with the highest toxicities (3%) were found to originate only from the bathrooms of the bungalows. Analyses by EIA confirmed the occurrence of macrocyclic trichothecenes in a range of <1 to 270 ng Roridin A equivalents per g of samples. The level of toxicity obtained by the MTT-bioassay in samples contaminated with or without *Stachybotrys chartarum* was found to correlate on an excellent way with the amount of macrocyclic trichothecenes detected by use of the EIA and thus underlay the usefulness of these methods for exposure assessment in problem buildings.

The results of the study altogether demonstrate the possible health risk for people living in water damaged houses such as these from the Wrocław area and which could be caused by highly toxic strains of *S. chartarum*.

Aerogene Exposition gegenüber Mykotoxinen - Zytotoxizitätsteste von Filterproben aus Falluntersuchungen

Manfred Gareis¹, Richard Dietrich², Eckardt Johanning³ und Erwin Märtlbauer²

¹ Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach

² Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Tierärztliche Fakultät, LMU-München

³ Fungal Research Group (FRG, Inc.), Occupational & Environmental Life Science, Albany, N.Y. USA

Die Belastung von Innenräumen mit Schimmelpilzen und den von ihnen gebildeten Toxinen wird seit geraumer Zeit im Zusammenhang mit den daraus entstehenden gesundheitlichen Konsequenzen intensiv diskutiert.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass toxinogene Schimmelpilzisolat wie z.B. *Stachybotrys chartarum* und Mykotoxine auf einer Reihe ganz unterschiedlicher Baumaterialien wie Gipskartonplatten, Tapeten, Teppichböden etc. vorkommen können. Für die Abklärung eines möglichen kausalen Zusammenhanges zwischen den beobachteten Symptomen bei betroffenen Patienten und einer aerogenen Exposition gegenüber Mykotoxinen ist es jedoch erforderlich Staub- bzw. Luftproben zu analysieren.

Anhand der Untersuchung von 20 *Stachybotrys*-Isolaten mit dem MTT-Zellkulturtest, dem Roridin A-ELISA, HPLC und GC-MS konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Chemotypen bei *Stachybotrys chartarum* vorkommen und nur etwa ein Drittel der Isolate zur Produktion von makrozyklischen Trichothecenen befähigt ist. Die mykologischen Analysen erlauben unter anderem deshalb also keinen Rückschluss auf die in Umweltproben vorkommenden Mykotoxine.

Für die Abschätzung einer Inhalationsexposition wurden Filter- und partiell Staubproben von 25 Falluntersuchungen einem Screening mit dem MTT-Zellkulturtest auf zytotoxische Kontaminanten unterzogen und parallel dazu mykologisch analysiert. Der weitgehend standardisierte Bioassay erfaßt mit hoher Sensitivität zytotoxische Mykotoxine (makrozyklische Trichothecene, Typ A- und B-Trichothecene sowie Gliotoxin, Patulin und Ochratoxin A) und hat sich als biologisches Indikatorsystem zur Beurteilung qualitativer Eigenschaften von unterschiedlichen Umwelt- wie Nahrungsmittelproben bewährt. Ausgewählte Proben wurden darüber hinaus mit dem Roridin A-ELISA sowie mit HPLC-DAD und GC-MS untersucht.

Hochtoxische Filterproben ($IC_{50} \leq 31$ mg/ml) wurden bei sieben Fällen detektiert, in vier Fällen erwiesen sich die Filter im Vergleich zu Kontrollen als nicht toxisch, die restlichen Filter zeigten im Zelltest moderate Toxizität ($IC_{50} > 31 - \leq 125$ mg/ml). Die Ergebnisse korrelieren mit den Resultaten der EIA und physikalisch-chemischen Analysen.

Damit konnte zweifelsfrei dokumentiert werden, dass aerogene Belastungen in Innenräumen zumindest mit makrozyklischen Trichothecenen von *Stachybotrys chartarum* möglich sind und diese Belastungen nicht an das Vorkommen von Sporen gebunden sein müssen.

Problems and approaches for the determination of indoor-relevant mycotoxins in house dust

G. Köller, U. Rolle-Kampczyk

Centre for Environmental Research Leipzig – Halle, Department of Human Exposure Research and Epidemiology, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig

Questions to potential health trouble by loads of dwellings with mould belong to the most frequent indoor problems in the immunologic / allergologic resp. environmental field doctor consultation hour. The spores and in them occurring numerous allergenes as well as the metabolites formed by moulds during their metabolism like microbial produced volatile organic compounds (MVOC) and mycotoxins are made responsible for health effects. To clarify the connection between the occurrence of a domestic load with mycotoxins and described complaints, which are non specific usually, is at present research field of international working groups.

The elucidation mould-dependent health complaints in Leipzig exists a complex investigation program (LEIPI).

One aspect of the program is the search for provable relations between mycotoxin burden and health effects.

Therefore the presented work wants to show a new approach to analyse mycotoxins from house dust samples.

Two different extraction methods were developed for the extraction of house dust. One extraction method is based on accelerated solvent extraction (ASE). The extractions were performed on an ASE 200 (Dionex) at 100°C and 14MPa pressure. For the other extraction method the house dust were ultrasonicated (Branson 190 Watt, at 40°C, extraction time 30 min). The extraction was carried out thrice.

In both extraction methods two different solvent mixtures(dichloromethane/acetic ethylester 1:1(v/v) and acetonitrile/methanol/water 2:2:1 (v/v/v)) are used.

After a preconcentration step the matrix was separated by a silica gel column. After elution with dichloromethane, the sample is evaporated to dryness and the residue is reconstituted in acetonitrile.

The analysis of the samples were performed with micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC).

In order to enhance the sensitivity a sample stacking method with polarity switching was developed. The analysis were performed using hydrodynamic injection (injection time 150 s at 50mbar), a polarity switching time 85s, a phosphate buffer (pH 12.3, 5 mM) containing 20 mM sodium dodecylsulphate as separation electrolyte and a fused silica capillary. The analysis takes about 15 minutes and linear responses over the 50 – 600 µg/L concentration range. investigated for Citrinin and Ochratoxin A. The limits of detection (S/N = 3) for Citrinin and Ochratoxin A were about 50 µg/L. In house dust a limit of detection of 25 ng/g was achieved.

Literature

1. Diez U, et al. Kooperation in der Umweltmedizin in Leipzig – Vorstellung des LEIPI-Programms zur Untersuchung von Patienten mit Schimmelpilzbelastung. Umweltmed Forsch Prax 2001; 6; 1-4.
2. Garrett NH, et al. Indoor airborne fungal spores, house dampness and associations with environmental factors and respiratory health in children. Clin Exp Allergy 1998; 28; 459-467.