ARBEITSGEMEINSCHAFT FÜR LEBENSMITTEL-, VETERINÄR- UND AGRARWESEN

MOLD-MEETING 2004

DER

ALVA-FACHGRUPPE MIKROBIOLOGIE & MOLEKULARBIOLOGIE

„AKTUELLE PROBLEME DER MYKOLOGIE UND MYKOTOXINFORSCHUNG“

ALVA-Mitteilungen Heft2/2005

ISSN 1811-7317

© 2005, Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und Agrarwesen (ALVA), Wien

ZUSAMMENGESTELLT: Dr. Andreas Adler

BEZUGSMÖGLICHKEITEN: Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und Agrarwesen (ALVA)
c/o Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH
Spargelfeldstraße 191, 1220 Wien

HERSTELLUNG : RepaCopy DigitalCenter
Triester Straße 122
1230 Wien

Vorwort

Am 25. und 26. November 2004 hat in Gars am Kamp das 8. Mold-Meeting der ALVA-Fachgruppe Mikrobiologie & Molekularbiologie mit Präsentationen und Diskussionen zum Thema „Aktuelle Probleme der Mykologie und der Mykotoxinforschung“ stattgefunden.

Dem mikrobiellen Status von landwirtschaftlichen Produkten und von Lebensmitteln wird in einer in zunehmendem Maß an Qualität orientierten Gesellschaft hoher Stellenwert eingeräumt - nicht zuletzt auf Grund der steigenden Bedeutung der Mykotoxinproblematik. Schadstoffe in Futter- und Lebensmitteln führen immer wieder zu Diskussionen über die Sicherheit von Nahrungsmittel. Die Konsumenten müssen aber davon ausgehen können, dass mit dem Genuss von Lebensmitteln das geringst mögliche Risiko verbunden ist. Gesunde, qualitativ hochwertige Nahrungsmittel sind wichtige Voraussetzungen für einen vorbeugenden Verbraucherschutz und eine hohe Lebensmittelsicherheit.

Mikrobiologische und mykotoxikologische Aspekte einer hochwertigen landwirtschaftlichen Qualitätsproduktion sowie einer maximalen Lebensmittel- und Ernährungssicherheit stellen daher zentrale Themen für das „Mold-Meeting“ der Fachgruppe Mikrobiologie dar. Im Rahmen des Fachprogramms 2004 standen unter anderem Beiträge zur Entwicklung von Biopestiziden oder der genetischen Verankerung der *Fusarium*-Resistenz, von der Biosynthese bis hin zum chemisch-analytischen Nachweis und den toxischen Effekten von Mykotoxinen im Mittelpunkt des Interesses. Weitere Berichte betrafen etwa das Vorkommen von Mykotoxinen sowie den Stand der Regelungen bezüglich Mykotoxingehalte in Futter- und Lebensmitteln.

Multidisziplinarität im Zuge der gesamten Nahrungskette prädestinierte gerade die Fachgruppe Mikrobiologie, im Rahmen des „Mold-Meetings“ Strategien und praktische Handlungs-empfehlungen zur Minimierung von Fusarienbefall und Mykotoxingehalt in Getreide und Mais in fachlich breit angelegter Diskussion umfassend aufzuarbeiten.

Die nachfolgend publizierten Arbeiten stellen einen Auszug aus dem Fachprogramm des „Mold-Meetings“ der ALVA-Fachgruppe Mikrobiologie und Molekularbiologie bei der Vortragstagung 2004 in Gars am Kamp dar, dazu kommt eine Zusammenfassung der unter Mithilfe der Teilnehmer zusammengestellten praktischen Hinweise zur Verminderung von Mykotoxinen im Getreide.

Großer Dank gebührt den Autoren der Fachbeiträge und all denen, die zum Gelingen der Tagung beigetragen haben, insbesondere Frau Mag. Dr. Sandra Brunner und Herrn Peter Kiroje. Dem Präsidenten der ALVA, Herrn Hofrat Univ. Doz. Dr. Gerhard Bedlan, sei für die Publikation dieses Bandes sehr herzlich gedankt.

Dr. Andreas Adler

Vorsitzender der ALVA-Fachgruppe
Mikrobiologie und Molekularbiologie

Vorträge und Poster

K. Brunner, Susanne Zeilinger und R. L. Mach
Ein transgener Pilz als Ersatz für chemische Fungizide 6

M. Büchter, Vitore Shala-Mayrhofer, Gertrude Langer, Claudia Zeitlhofer,
M. Lemmens und H.-P. Kaul
Auftreten und Häufigkeitsverteilung von *Fusarium*-Arten in Abhängigkeit von Vorfrucht, Bodenbearbeitung und Bewässerung beim Körnermais 10

A. Adler, Sandra Brunner, P. Kiroje und R. Öhlinger
Update zur *Fusarium*-Situation bei Getreide und Mais in Österreich 14

H. Bürstmayr, Barbara Steiner, Ch. Gladysz, A. Salameh, Nives Angerer, M. Lemmens
Molekulargenetik der Fusariumresistenz bei Weizen 18

R. Mitterbauer, Katharina Wondrasch, Michaela Peruci, F. Berthiller, R. Schuhmacher,
R. Krska, Gabriela Nagl-Neuhold, M. Lemmens, Frances Trail und G. Adam
Biosynthese und Metabolismus von Zearalenon 22

Michaela Peruci, F. Berthiller, R. Schuhmacher, R. Krska, Gabriela Nagl-Neuhold,
M. Lemmens, R. Mitterbauer und G. Adam
Identifizierung eines neuen Virulenzgenes von *Fusarium graminearum* mit einer zentralen Rolle in der Biosynthese von Sekundärmetaboliten 25

F. Berthiller, R. Schuhmacher, G. Adam, M. Lemmens und R. Krska
Isolierung und Bestimmung von maskiertem DON (DON-3-Glukosid) mittels LC-MS und dessen Vorkommen in Weizen 30

R. Schuhmacher, F. Berthiller und R. Krska
Simultane Bestimmung von A- und B-Trichothecenen und Zearalenon in Getreide durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie – Tandem Massenspektrometrie 34

Elisabeth Drs, Alexandra Parich, H. Pettersson, R. Josephs, T. Linsinger,
D. Chan, P. Brereton, R. Schothorst, H. van Egmond, R. Krska
Studie zur Produktion zertifizierter B-Trichothecen Kalibranten 38

M. Janotta und R. Krska
Entwicklung von Mykotoxin Screening Methoden mittels Protein Microarrays 42

E. Vekiru, M. Taeubel, R. Schuhmacher, G. Schatzmayr, E.M. Binder und R. Krska
Analytische Charakterisierung von Abbauprodukten von FB1 mittels LC-MS/MS 46

W. Brodacz
Zur GC-Trichothecenanalytik - Praktische Verbesserungen einer akkreditierten Methode 50

Wageha Awad, J. Böhm, E. Razzazi-Fazeli, J. Zentek
Influence of Deoxynivalenol on the Electrical Properties of the Intestinal Mucosa of Chicken and its Effect on Luminal Glucose Transport 54

M. Hafner, G. Buttinger, H. Knapp, Elisabeth Pichler, M. Freudenschuss, Eva Maria Binder und R. Krska
Entwicklung eines fluoreszenzbasierten Schnelltests zur Detektion von Deoxynivalenol 58

H. Würzner
Aktuelle Regulierungen für Mykotoxine in Futtermitteln im internationalen Vergleich 60

R. Grossgut
Aktuelle und geplante gemeinschaftliche Regelungen bezüglich Mykotoxinen in Lebensmitteln 64

R. Öhlinger
Mykotoxingehalte in Getreide, Futtermitteln und Lebensmitteln (Überblick 2004) 70

Überblick über österreichrelevante Mykotoxin-Grenz-, Richt- und Diskussionswerte (Stand 18. März 2005) 76

Diskussion

A. Adler, R. Öhlinger und Sandra Brunner
Kurzfassung der Diskussion: Mykotoxinsituation / Vermeidungsstrategien 84

Ein transgener Pilz als Ersatz für chemische Fungizide

K. BRUNNER, Susanne ZEILINGER und R. L. MACH

Biokontrolle – eine allgemeine Einführung: Moderne Landwirtschaft ist auf den Einsatz chemischer Fungizide angewiesen, um pflanzenpathogene Pilze zu bekämpfen. Fungizide werden normalerweise in wesentlich höheren Dosen eingesetzt als Herbizide und Insektizide (1), belasten dadurch die Atmosphäre und reichern sich im Boden an (2). Als eine biologische Alternative zu chemischen Mitteln werden zunehmend Isolate der Gattung *Trichoderma* zur Kontrolle von Pflanzenkrankheiten angewandt. Zahlreiche Isolate von *Trichoderma* sind Rhizosphärenkompetent und wachsen auch endophytisch in der Pflanzenwurzel. Im Laufe des letzten Jahrzehntes wurde die Wirkung von *Trichoderma* gegen ein breites Spektrum von Phytopathogenen wie z. B. *Pythium ultimum, Rhizoctonia solani, Sclerotium rolfsii, Botrytis cinerea* und *Fusarium oxysporum* nachgewiesen. Die Mechanismen der Biokontrolle wurden genauestens untersucht. *Trichoderma* produziert eine Reihe antibiotischer Substanzen und zellwandlytischer Enzyme (Glucanasen, Chitinasen) und wächst parasitisch auf anderen Pilzen (3, 4). Weiters kompetitiert *Trichoderma* mit anderen Organismen um Nährsoffe im Boden und Exudate aus Pflanzenwurzeln, baut Pektinasen und andere Enzyme ab, die essentiell für Pathogene sind um Pflanzenzellwände zu penetrieren (5). Bis vor kurzem wurden diese direkten antagonistischen Fähigkeiten als hauptverantwortlich für die Biokontrollfähigkeit von *Trichoderma* erachtet.

Mittlerweile wurde klar, dass unser Wissen über die Mechanismen der Biokontrolle unvollständig war. Zusätzlich zur Fähigkeit einen Pathogen direkt zu attackieren, kann *Trichoderma* ähnlich wie Rhizobakterien eine systemische Resistenz der Pflanze aktivieren (6). Diese neue Erkenntnis änderte unser Verständnis der Biokontrolle dramatisch und bietet neue Ansatzmöglichkeiten zur Verbesserung der Biokontrollfähigkeit.

Eine neue Möglichkeit zur Stammverbesserung: Da zahlreiche Versuche zur Stammverbesserung durch Überexpression von Chitinasen oder Proteasen zwar im Labor teilweise erfolgreich verliefen, aber nie in einer Anwendung im Feld endeten, verfolgten wir eine völlig andere Strategie, um effizientere Biokontrollstämme von *Trichoderma* zu erhalten. Wir exprimierten heterolog das Glukoseoxidase kodierende Gen aus *Aspergillus niger* unter Kontrolle des *Trichoderma* eigenen N-Acetylglucosaminidase kodierenden Genes (*nag1*) und nutzen den endophytisch wachsenden Biokontrollpilz als Vektor, um das heterolog produzierte Enzym in die Pflanze zu transportieren. Glukoseoxidase bildet mit Glukose als Substrat Wasserstoffperoxid und Glukonsäure. Durch die Firma Monsanto konnte bereits gezeigt werden, dass Glukoseoxidaseproduktion in Kartoffeln eine erhöhte Resistenz gegen pathogene Pilze und Bakterien mit sich bringt (7). Glukoseoxidaseaktivität und die daraus resultierende H_2O_2 Akkumulation hat aber nicht nur positiven Einfluss auf die systemische Resistenz von Pflanzen,

Autoren: Dr. Kurt BRUNNER, Dr. Susanne ZEILINGER und Ao. Univ. Prof. Dr. Robert L. MACH, Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften, Technische Universität Wien, Getreidemarkt 9/166/5/2, 1060 Wien

sondern zeigt auch eine direkte antifungale Wirkung. Zahlreiche pflanzenpathogene Pilze sind äußerst empfindlich gegenüber Wasserstoffperoxid, *Trichoderma* selbst toleriert aber vielfach höhere Konzentrationen. So wird ein Glukoseoxidase produzierender Pilz (*Talaromyces flavus*) zur Kontrolle von *Verticillium dahliae*, *R. solani* und *Sclerotinia sclerotiorum* eingesetzt (8).

Um die Glukoseoxidase nur unter genau definierten Bedingungen zu exprimieren und die Pflanze nicht durch unerwünschte H_2O_2 Akkumulation zu belasten, wurde das Gen unter die Kontrolle des *nag1* Promoters gestellt. Der *nag1* Promoter reagiert sehr spezifisch auf den Kontakt von *Trichoderma* mit der Hyphe eines anwesenden Wirtspilzes und ist nicht reguliert durch physiologischen Stress (9).

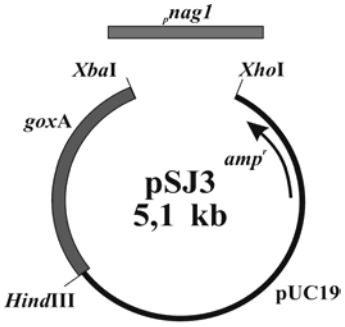


Abb. 1: Plasmid zur Transformation von *Trichoderma*: Das *A. niger goxA* Gen stet unter Kontrolle des *T. atroviride nag1* Promoters.

Durch Protoplastentransformation konnte der Stamm SJ3-4 erhalten werden, der 12 – 14 Kopien des *nag1::goxA* Konstruktes enthält. Der transgene Stamm wurde in Flüssigmedium mit kolloidalem Chitin angezüchtet und die Kulturüberstände dienten enzymatischen Messungen. Trotz gleicher Wachstumsraten war die Chitinaseproduktion von SJ3-4 durch das Einbringen zahlreicher Kopien des *nag1* Promoters um ca 30% gegenüber dem Wildtyp reduziert, dafür wurde aber eine Glukoseoxidaseaktivität von 300mU/ml gemessen.

Um die verbesserte Kontrollfähigkeit von SJ3-4 *in vivo* zu zeigen, wurden Plattenkonfrontationstests mit *R. solani, S. sclerotiorum* und *P. ultimum* gemacht. In allen Test konnte der transgene Stamm den Wildtyp deutlich übertreffen. Besonders signifikant war der Vorteil von SJ3-4 in der Kontrolle von *P. ultimum*, einem Oomycet, der kein Chitin in seiner Zellwand enthält.

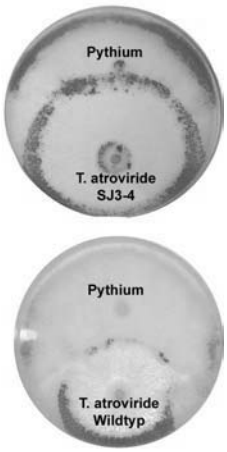


Abb. 2: Plattenkonfrontation *T. atroviride* Wildtyp (untere Petrischale) und SJ3-4 (oben) gegen *P. ultimum*. An den grünen Sporen von *Trichoderma* ist zu erkennen, dass SJ3-4 seinen Wirt bereits vollständig überwachsen hat, wogegen der Wildtyp zum selben Zeitpunkt erst die untere Hälfte der Platte bewachsen hat.

Nachdem der Glukoseoxidase produzierende Stamm auch in den Konfrontationsexperimenten überzeugte, gingen wir zu Tests *in planta* über. Bohnen wurden mit den Sporen von *Trichoderma* Wildtyp und SJ3-4 beschichtet (coating) und in *Rhizoctonia* infizierte Erde gepflanzt. Die Keimung und Wuchshöhe der Pflanzen wurde über einen Zeitraum von drei Wochen beobachtet. Als Kontrolle dienten unbeschichtete Samen, die in Pathogen infizierter Erden nicht mehr keimen konnten. Der transgene *Trichoderma* Stamm schützte die Bohnen wesentlich besser vor dem Angriff von *Rhizoctonia* als dies der Wildtyp vermochte. Der Unterschied wurde umso deutlicher, je höher die Inokulumdichte des Pathogens gewählt wurde. SJ3-4 beschichtete Bohnen konnten selbst bei 2g *Rhizoctonia* Mycelfeuchtgewicht je Liter Erde problemlos keimen und übertrafen in Wuchshöhe und Vitalität die mit dem Wildtyp behandelten Pflanzen.

Abb. 3: Pflanzenprotektionsassays, von links nach rechts: Keimungskontrolle ohne Pathogen, Bohnen beschichtet mit *Trichoderma* Wildtyp, Bohnen mit SJ3-4 und Pathogenkontrolle ohne *Trichoderma* coating.

Obwohl der Glukoseoxidase produzierende Stamm deutlich weniger Chitinasen produziert als der *Trichoderma* Wildtyp, ist die praxisrelevante Fähigkeit zur Protektion von Samen und Wurzeln wesentlich verbessert worden. Um zu zeigen, dass die überragenden Fähigkeiten dieses neuen Stammes nicht nur auf einem verbesserten direkten Antagonismus beruhen, sondern dass SJ3-4 die pflanzeneigene systemische Resistenz aktivieren kann, wurden die Blätter der Pflanzen aus den obigen Experimenten mit dem Pathogen *Botrytis cinerea* infiziert. Wurde durch den transgenen Stamm in der Rhizosphäre eine systemische Pflanzenresistenz aktiviert, so ist auch eine erhöhte Pathogenresistenz in den Blättern zu erwarten.
Tatsächlich war in diesen Experimenten die Schwere der Botrytis – Infektion in SJ3-4 behandelten Pflanzen deutlich reduziert. Die Fläche der Läsion konnte gegenüber einer Protektion durch den Wildtyp um etwa 70 % reduziert werden.

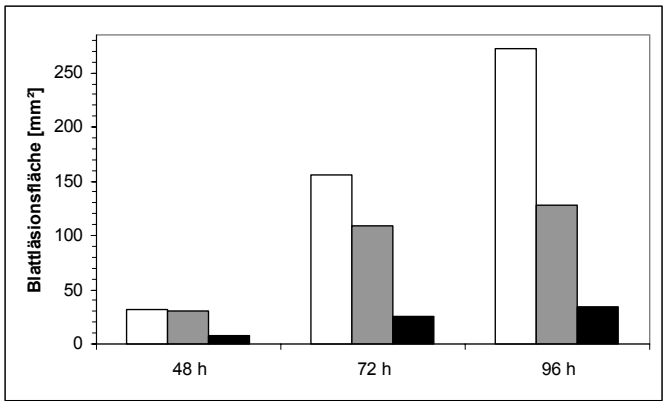


Abb. 4: Bohnen wurden in *Rhizoctonia* infizierte Erde gepflanzt und die Blätter der resultierenden Pflanzen mit *Botrytis* infiziert. Die Höhe der Balken zeigt die Größe der Läsionsfläche hervorgerufen durch die *Botrytis* Infektion: ohne *Trichoderma* in der Rhizosphäre (weiß), Wildtyp (grau) und SJ3-4 (schwarz).

Conclusio: Durch die Konstruktion eines transgenen Stammes von *T. atroviride* ist es uns gelungen einerseits die direkten antagonistischen Fähigkeiten dieses Biokontroll Stammes zu stärken und andererseits konnten wir zeigen, dass *Trichoderma* als Vektor verwendet werden kann, um bioaktive Moleküle in die Pflanze einzuschleusen. Wir exprimierten ein Glukoseoxidasegen unter Kontrolle eines Chitinase Promoters und aktivierten dadurch die systemische Resistenz der Pflanze. Nicht nur eine Initialattacke eines Pathogens aus dem Erdreich konnte so erfolgreich abgewehrt werden, sondern es wurde auch erhöhte Resistenz gegen darauf folgende Infektionen der Blätter vermittelt.

1. **Fraser, P. M.** 1994. The impact of soil and crop management practices on soil macrofauna. *In* C. E. Pankhurst (ed.), Soil Biota - Management in Sustainable Farming Systems, Australia.

2. **Nannipieri, P.** 1994. The potential use of soil enzymes as indicators of productivity,sustainability and pollution. *In* P. C.E. (ed.), Soil Biota - Management in Sustainable Farming Systems, Australia.

3. **Lorito, M., V. Farkas, S. Rebuffat, B. Bodo, and C. P. Kubicek.** 1996. Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. J Bacteriol **178:**6382-5.

4. **Wilhite, S. E., R. D. Lumsden, and D. C. Straney.** 2001. Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*. Appl Environ Microbiol **67:**5055-62.

5. **Elad Y.** 2000. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. Crop Protection **19:**709-714.

6. **Harman, G. E., C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet, and M. Lorito.** 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol **2:**43-56.

7. **Wu, G., B. J. Shortt, E. B. Lawrence, E. B. Levine, K. C. Fitzsimmons, and D. M. Shah.** 1995. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H2O2-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. Plant Cell **7:**1357-68.

8. **Marois J. J., J. S. A., Dunn M. T., Papavizas G. C.** 1982. Biological Control of Verticillium wilt of eggplant in the field. Plant Dis. **66:**1166-1168.

9. **Zeilinger, S., C. Galhaup, K. Payer, S. L. Woo, R. L. Mach, C. Fekete, M. Lorito, and C. P. Kubicek.** 1999. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. Fungal Genet Biol **26:**131-40.

Auftreten und Häufigkeitsverteilung von *Fusarium*-Arten in Abhängigkeit von Vorfrucht, Bodenbearbeitung und Bewässerung beim Körnermais

M. BÜCHTER, Vitore SHALA-MAYRHOFER, Gertrude LANGER,
Claudia ZEITLHOFER, M. LEMMENS und H.-P. KAUL

Einleitung

In der Vergangenheit wurden in diversen Studien zur Kolbenfusariose beim Mais als Erreger *Fusarium graminearum, F. culmorum, F. profileratum, F. verticillioides, F. moniliforme* und *F. subglutinans* genannt (ADLER et al. 1990; DOOHAN et al. 2003; MUNKVOLD 1997,2003). Die Sporen der Pilze, die an der Bodenoberfäche auf Ernterückständen produziert werden, gelten als Befallspotential für das nachfolgend wachsende Getreide (PARRY et al. 1995). Die Krankheitsintensität ist abhängig von den Umwelteinflüssen. Besonders die klimatischen Faktoren spielen eine bedeutende Rolle (DOOHAN et al. 2003). Inwieweit befallsfördernde Maßnahmen, wie z. B. die Minimalbodenbearbeitung und Bewässerung, einzelne *Fusarium*-Arten begünstigen und vor allem, welcher relative Stellenwert diesen Faktoren beizumessen ist, ist noch ungenügend geklärt. Forschungsschwerpunkt des Instituts für Pfanzenbau und Pflanzenzüchtung an der Universität für Bodenkultur (BOKU) Wien ist es, Beziehungen zwischen diesen Bewirtschaftungsfaktoren und der Populationsstruktur von *Fusarium* spp. zu ermitteln. In der hier dargestellten Untersuchung werden die Einflüsse von Vorfrucht (Zwischenfrucht), Bodenbearbeitung und Bewässerung auf die Befallsintensität (% befallene Körner mit *Fusarium* spp.) bzw. das Artenvorkommen von *Fusarium* spp. untersucht. Hintergrund bildet die Hypothese, dass aufgrund des pannonischen Klimas in der Untersuchungsregion keine hohen *Fusarium*-Dichten zu erwarten sind und sich dieser Standort demnach für Forschungsarbeiten zur Populationsstruktur und -dynamik von *Fusarium* spp. eignet (BÜCHTER et al. 2003).

Material und Methoden

Der zugrunde liegende Feldversuch wird auf den Versuchsflächen Raasdorf der Versuchswirtschaft Groß-Enzersdorf (Marchfeld, Niederösterreich, 156 m NN, ∅-Jahrestemperatur 9,8 °C, ∅-Jahresniederschlag 546 mm, Parabraunerde-Tschernosem, schluffiger Lehm (uL)) durchgeführt. Der Versuch (4,8 ha) wurde in einer mehrfaktoriellen Spaltanlage in drei Wiederholungen im August 2002 angelegt. Diese Studie beschränkt sich allerdings aufgrund der frühzeitigen Erhebungen auf die Faktoren Zwischenfrucht vor Mais (Winterraps, Gelbsenf), Bodenbearbeitung (Pflug, Grubber) und Bewässerung (0 mm, Σ 100 mm in drei Gaben: Mitte Juni, Anfang und Mitte Juli). Die Düngung und Pflanzenschutzmaßnahmen erfolgten gemäß den

Autoren: Dipl.-Ing. Dr. Manfred BÜCHTER, Dr. Vitore SHALA-MAYRHOFER, Gertrude LANGER, Claudia ZEITLHOFER und Univ. Prof. Dr. Hans-Peter KAUL, Department für Angewandte Pflanzenwissenschaften und Pflanzenbiotechnologie, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Universität für Bodenkultur Wien, Gregor Mendel-Straße 33, A-1180 Wien;
Ao. Univ. Prof. Dr. Marc LEMMENS, Interuniversitäres Forschungsinstitut für Agrarbiotechnologie, Abteilung Biotechnologie in der Pflanzenproduktion, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln

„Richtlinien für die sachgerechte Düngung“ (BMLF). Zur Ermittlung des *Fusarium*-Befalls wurde die Befallsintensität (% befallene Körner mit *Fusarium* spp.) und der Befallsanteil der verschiedenen *Fusarium*-Arten (% der Fläche vom infizierten Kolben) von den Maiskolben mit sichtbarer Infektion zur Ernte bestimmt (NIRENBERG 1981; NELSON et al. 1983).

Ergebnisse

Am Untersuchungsstandort Raasdorf wurden in Voruntersuchungen von Mineralboden (< 2 mm) und pflanzlichem Rückstand (> 2 mm) substratspezifische Besatzdichten nachgewiesen (BÜCHTER et al. 2003). Insgesamt wurden äußerst niedrige Besatzdichten festgestellt. Die Keimzahlen lagen zwischen 10 und 17 g^{-1} Boden bzw. zwischen 4 und 50 g^{-1} pflanzlicher Rückstand. Insbesondere die Variante der Minimalbodenbearbeitung, die mit dem Grubber auf 15 cm Bodentiefe durchgeführt wurde, wies eine hohe Besatzdichte auf. Beim Vergleich der *Fusarium*-Arten in Abhängigkeit vom Untersuchungssubstrat traten Differenzen in der Häufigkeitsverteilung auf. Im Mineralboden bildeten *F. solani* und *F. oxysporum* 70 - 80 % der gesamt vorkommenden *Fusarium*-Pilze. Im pflanzlichen Rückstand traten Arten wie *F. graminearum*, *F. culmorum* und *F. equiseti* häufiger auf.

Tab. 1: Ergebnisse der Varianzanalyse für die Befallsintensität (% befallene Körner mit *Fusarium* spp.) der Jahre 2003 und 2004

Effekt	F-Wert	Pr>F*
Jahr (J)	85,00	<0,001
Bodenbearbeitung (BB)	0,01	0,9032
Bewässerung (BW)	9,89	0,0026
Zwischenfrucht (ZF)	4,70	0,0341
J x BB	2,55	0,1153
J x BW	1,26	0,2660
J x ZF	3,14	0,0816
BB x BW	6,71	0,0120
BB x ZF	0,06	0,8079
BW x ZF	0,01	0,9273

*Pr>F: Überschreitungswahrscheinlichkeit

Tabelle 1 belegt den hoch signifikanten Einfluss der jährlichen Witterung auf die Befallsintensität von *Fusarium* spp. beim Körnermais (2003 > 2004). Im ersten Jahr konnte eine Wirkung der Zwischenfrüchte auf die Befallsintensität bzw. auf die Besatzdichte von *Fusarium* spp. im Bodensubstrat nicht beobachtet werden (BÜCHTER et al. 2003). Hingegen wurde nach dem zweiten Untersuchungsjahr ein Effekt der Zwischenfrüchte abgesichert (Winterraps > Gelbsenf). Zwischen den Faktoren Bodenbearbeitung und Bewässerung wurde eine hohe Interaktion auf die Befallsintensität von *Fusarium* spp. am Maiskorn nachgewiesen (Abb. 1).

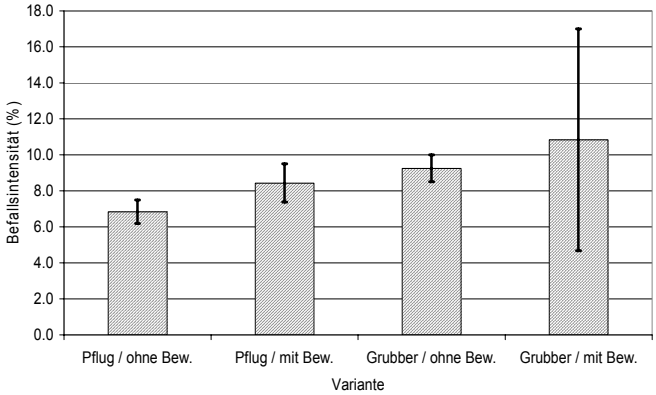


Abb 1: Befallsintensität (% befallene Körner mit *Fusarium* spp.) beim Körnermais in Abhängigkeit von Bodenbearbeitung und Bewässerung im Mittel der Jahre 2003 und 2004.

Diskussion

Die Krankheitsintensität ist abhängig von den jährlichen Umwelteinflüssen (Tab. 1). Des Weiteren wird das Vorkommen von *Fusarium*-Arten durch Weizen- und Maisanbau gefördert (DOOHAN et al. 2003). Die Infektion der *Fusarium*-Pilze verläuft über am Boden vorhandenes Inokulum, welches als saprophytisches Myzel oder als dickwandige Dauersporen (Chlamydosporen) auf Pflanzenrückständen, wie z. B. Stoppelresten, überdauert (MEIER et al. 2001).

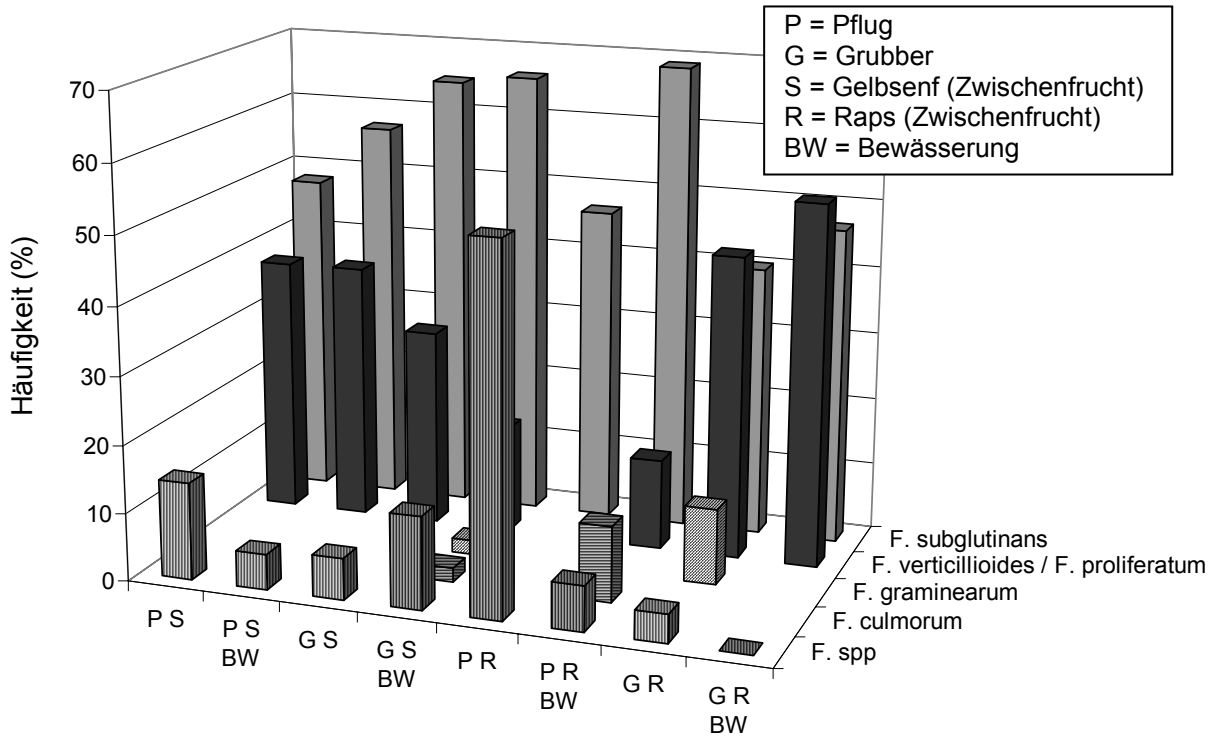


Abb. 2: *Fusarium*-Arten an den Maiskörnern im Untersuchungsjahr 2003.

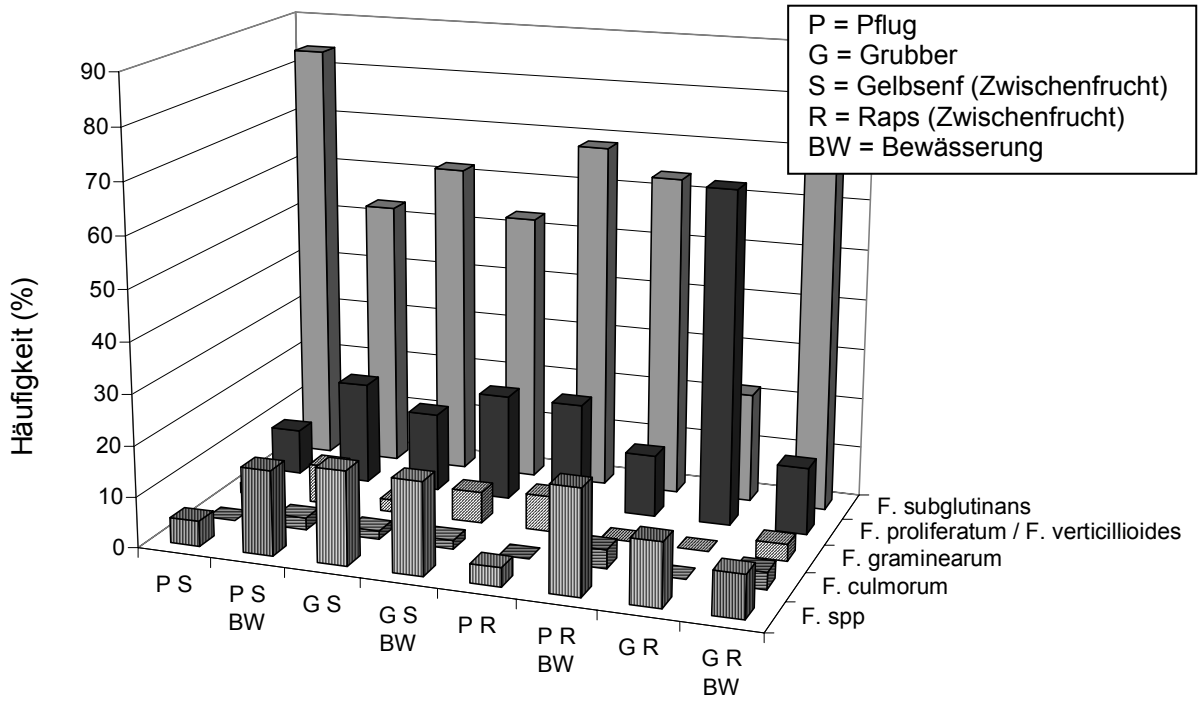


Abb. 3: *Fusarium*-Arten an den Maiskörnern im Untersuchungsjahr 2004.

Beim Vergleich der vorgefundenen *Fusarium*-Arten war auffallend, dass die im Boden nachgewiesenen *Fusarium*-Arten nur in Spuren an den Maiskörnern wieder gefunden wurden (Abb. 2, 3). Befallsintensitäten von 60 - 85 % konnten vor allem für die *Liseola*-Sektion nachgewiesen werden, insbesondere *F. subglutinans* und *F. verticillioides / F. proliferatum*. Diese Beobachtung wurde in beiden Untersuchungsjahren gemacht und spricht für ein Dominieren von Spätinfektionen, vor allem nach Maiszünslerbefall (LEW et al. 2001), welcher auch im Feldversuch zu beobachten war. Ein direkter Zusammenhang zwischen Auftreten und Häufigkeitsverteilung der *Fusarium*-Arten im Boden und an den Maiskörnern konnte nicht nachgewiesen werden. Die vor dem Mais angebaute Zwischenfrucht Winterraps wirkte befallsfördernd im Vergleich zur Zwischenfrucht Gelbsenf. Des Weiteren wirkten sich die Minimalbodenbearbeitung mit Grubber und die Bewässerung begünstigend auf die Befallsintensität von *Fusarium* spp. aus.

Schlussfolgerung

Die Untersuchung ergab einen Einfluss der Vorfrucht auf die Kolbenfusariose. In der Untersuchung zeigte sich aber keine deutliche Beziehung zwischen *Fusarium*-Befall und Infektionspotential des Bodens. Vor allem Bodenbearbeitung und Bewässerung stellten in Interaktion signifikante Einflussgrößen dar. Hinsichtlich des Einflusses von Bewirtschaftungsfaktoren auf Populationsstruktur und –dynamik von *Fusarium* spp. sind weitere und langfristigere Untersuchungen notwendig. Des Weiteren erscheint es hilfreich, definiert ausgebrachte *Fusarium*-Stämme zu untersuchen.

Literatur

ADLER, A., H. LEW & W. EDINGER, 1990: Vorkommen und Toxigenität von *Fusarium* auf Getreide und Mais. Bodenkultur, 41(2), 145-152.

BÜCHTER, M., M. LEMMENS & H.-P. KAUL, 2003: Standortkartierung von Getreidefusariosen im Trockengebiet Ostösterreichs. Mitt. Ges. Pflanzenbauwiss., **15**, 358-359

COOKE, 2003: Influence of climatic factors on Fusarium species pathologic to cereals. Eur. J Plant Pathology, 109, 755-768.

DOOHAN, F. M., J. BRENNAN & B. M. COOKE, 2003: Influence of climatic factors on Fusarium species pathologic to cereals. European J. of Plant Pathology, 109, 755-768.

LEW, H., A. ADLER, W. EDINGER, W. BRODACZ, E. KIENDLER & J. HINTERHOLZER, 1991: Fusarien und ihre Toxine bei Mais in Österreich. Bodenkultur, 52(3), 199-207.

MEIER, A., B. BIRZELE, E. C. OERKE, U. STEINER, J. KRÄMER & H. W. DEHNE, 2001: Significance of different inoculum sources for *Fusarium* infection of wheat ears. Mycotoxin Research 17A(1), 71-75.

MUNKVOLD, G. P., R. L. HELLMICH & W. B. SHOWES, 1997: Reduced *Fusarium* ear rot and symptomeless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. Phytopathology 87, 1071-1077.

MUNKVOLD, G. P., 2003: Epidemiology of Fusarium diseases and their mycotoxins in maize ears. Eur. J. Plant Pathology, 109, 705-713.

NELSON, P. E., T. A. TOUSSOUN & W. F. O. MARASAS, 1983 : Fusarium species. The Pensylvania State University Press.

NIRENBERG, H. I., 1981: A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. Can. J. Bot., 59, 1599-1609.

PARRY, D. W., P. JENKINSON & L. MCLEOD, 1995: Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals – a review. Plant Pathology, 44, 207-238.

SINGLETON, L. L., J. D. MIHAIL & C. M. RUSH. 1992: Methods for research on soil-borne phytopathogenic fungi. American Phytopathological Society Press, St Paul, MN, USA.

Update zur *Fusarium*-Situation bei Getreide und Mais in Österreich

A. ADLER, Sandra BRUNNER, P. KIROJE und R. ÖHLINGER

Einleitung

Seit den 80er Jahren werden Fusarienbefall und Toxinkontamination österreichischer Cerealien im Zuge repräsentativer Studien erhoben [1, 2, 3]. Dieses ständige Monitoring gilt der Abschätzung des potentiellen Ernährungs- und Fütterungsrisikos durch Mykotoxine, wobei auch die jeweils aktuellen Veränderungen der Häufigkeitsverteilung und im Spektrum der auftretenden *Fusarium*-Arten dokumentiert werden.

Bereits in den letzten Jahren konnte etwa bei Mais eine Verschiebung im Artenspektrum beobachtet werden, die sich nicht nur einfach auf jahrgangsbedingte klimatische Schwankungen oder ein unterschiedlich starkes Auftreten des Maiszünslers, zurückführen ließ [4].

Material und Methoden

Grundlage der Untersuchungen stellten jeweils Proben von Getreide- und Maissorten dar, die als Standard- bzw. Vergleichssorten im Rahmen der laufenden Sortenwertprüfungen in den wichtigsten Produktionsgebieten als Bezugsgrößen für den Ernteertrag dienen. Die Bestimmung des Fusarienbefalls erfolgte durch Auslegen oberflächendesinfizierter Körner auf PCNB-Selektivnährmedium, von Maiskolben mit sichtbarem Fusarienbefall wurde direkt auf PDA isoliert. Anschließend wurden die Fusarienisolate zur Ermittlung des auftretenden Artenspektrums subkultiviert (PDA, SNA) und nach morphologischen Kriterien [5, 6] identifiziert.

Ausgesuchte Fusarienisolate wurden auf ihre Toxinproduktion in vitro auf sterilisierten Maiskörnern geprüft. In Getreide- und Maisproben, sowie in den Pilzkulturen wurden Trichothecene der A- und B-Gruppe mittels Kapillargaschromatographie mit ECD nach Mycosep-Säulen-Clean-up und Halogenierung bzw. Silylierung bestimmt. Die Analytik der Fumonisine erfolgte mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion nach Immunaffinitätssäulen-Clean-up.

Ergebnisse und Diskussion

Das Spektrum toxinrelevanter *Fusarium*-Arten unterscheidet sich bei den verschiedenen Körnerfrüchten sehr wesentlich und erscheint, wie auch in vergleichbaren früheren Studien festgestellt [7, 8], deutlich in Erregerkomplexe gegeliedert: Die wichtigsten Getreide- und Maisfusarien befallen kaum Körnerleguminosen und *F. subglutinans* sowie *F. proliferatum* (beide Sektion *Liseola*) treten in Österreich bisher ausschließlich im Zusammenhang mit der Wirtspflanze Mais in Erscheinung (vergl. Tab. 1).

Abgesehen vom Befall mit Fusarien der Sektion *Liseola* sind Mais-Kolbenfusariosen in den letzten Jahren zu einem ganz wesentlichen Teil auf *F. graminearum* zurückzuführen. *F. culmorum*, obwohl nach wie vor ein bedeutender Toxinbildner auf Getreide, ist dagegen als Pathogen an Maiskolben

Autoren: Dr. Andreas ADLER, Mag. Dr. Sandra BRUNNER und Peter KIROJE, Inst. für Landwirtschaftliche Analytik; Dr. Richard ÖHLINGER, Kompetenzzentrum „Cluster Chemie Linz“; Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Wieningerstraße 8, A-4021 Linz

im Vergleich zu früheren Beobachtungen [2, 3] mehr oder weniger vollständig verdrängt und in den letzten Jahren nicht mehr festgestellt worden.

Tabelle 1: Häufigkeitsverteilung der *Fusarium*-Arten auf Körnerfrüchten, Ernte 2000 - 2002

***Fusarium*-Arten**	**Mais**	**Weizen**	**Hafer**	**Gerste**	**Soja**
F. subglutinans	21,6	-	-	-	-
F. proliferatum	12,4	-	-	-	-
F. graminearum	29,8	4,3	0,8	1,9	8,6
F. avenaceum	13,6	16,3	1,9	29,1	5,6
F. poae	11,7	59,3	84,8	19,0	0,7
F. equiseti	1,0	3,1	3,2	14,2	47,9
F. tricinctum	2,2	7,8	3,2	27,8	26,0
F. culmorum	-	4,1	0,4	1,4	1,8
F. langsethiae	-	2,0	3,5	2,2	-
Sonstige *Fusarium* sp.*	10,9	3,3	2,3	4,6	9,5

* einschließlich *F. acuminatum*, *F. cerealis*, *F. merismoides*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. solani, F. sporotrichioides*, *F. verticillioides*

Zudem hat sich die bereits im Verlauf der 80er und 90er Jahre festgestellte tendezielle Entwicklung, dass sich *F. proliferatum* als ein wesentlicher Toxinbildner und eine wärmeliebende Spezies in österreichischem Mais etabliert, bestätigt und noch weiter verstärkt.

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

Erntejahr:	**1986-89**	**1996-98**	**2000-01**	**2002-03**
Kolben mit sichtbarem Befall (%)				
F. proliferatum	**0**	**0,4**	**0,5**	**2,1**
Fumonisin (FB_1):				
Anteil positiver Proben (%)*	**n.e.**	**6**	**28**	**34**
Bereich der Toxingehalte (mg/kg)		0,09 - 1,75	0,15 - 1,09	0,11 - 1,64

* Nachweisgrenze 0,05 mg/kg

So stieg bei den Maiskolben der Anteil von *F. proliferatum*-Infektionen an der Gesamtzahl der Infektionen von noch unter 1% in den 80er Jahren im Durchschnitt der Erntejahre 2000/01 auf 12,4% und in den Erntjahren 2002/03 wurde bereits ein Anteil von mehr als 33% festgestellt. Dieser hohe Wert entspricht bereits einem Anteil von 2,1% *F. proliferatum*-infizierten Maiskolben an der Gesamtzahl aller untersuchten Kolben und wirkte sich auch auf den Toxingehalt der Maisernte aus [3], wo erhöhte Fumonisin-Werte nachgewiesen werden konnten (vergl. Tab. 2).

Die Verschiebung in der Artenzusammensetzung hin zum verstärkten Aufkommen dieser wärmeliebenden *Fusarium*-Art führt längerfristig gesehen auch zu einer Veränderung des auftretenden Mykotoxinspektrums. Die kanzerogenen Fumonisine, die bisher in Österreich nur eine untergeordnete Rolle gespielt haben, könnten dadurch mehr an Bedeutung gewinnen und durch ihr häufigeres Vorkommen bei Mais in Österreich auch verstärkte Auswirkungen auf die Tierproduktion haben.

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

Erntejahr:	1996	1997-98	2000-01	2002 u. 2004
Kolben mit sichtbarem Befall (%)				
F. graminearum	**3,7**	**1,4**	**1,1**	**3,9**
Desoxynivalenol (DON):				
Anteil positiver Proben (%)*	87	69	61	86
Bereich der Toxingehalte (mg/kg)	0,08 - **2,89**	0,05 - 0,74	0,05 - 0,86	0,05 - **6,03**

* Nachweisgrenze 0,05 mg/kg

Im Gegensatz zu der bei *F. proliferatum* über etliche Vegetationsperioden hinweg beobachteten tendenziellen Zunahme der Befallshäufigkeit können hinsichtlich einer Infektion der Maiskolben mit *F. graminearum* im gleichen Zeitraum ausgesprochene Befallsjahre (wie etwa 1996, 2002 oder 2004) und Erntejahre mit vergleichsweise geringer Infektionsrate (wie etwa 1997, 2000 oder 2001) unterschieden werden. Während sich bei - für den Erreger - ungünstigen Witterungsbedingungen kaum eine umfangreiche *Fusarium*-Infektion etabliert, können günstige Infektions- und Wachstumsbedingungen (wie etwa warmfeuchte Witterung während der Blühphase oder eine bei hoher Feuchtigkeit und kühlen Temperaturen verzögerte Abreife und Ernte) zu einem problematischen *Fusarium*-Befall und entsprechender Toxinkontamination führen (vergl. Tab. 3).

Tabelle 4: *F. langsethiae* und *F. sporotrichioides,* Befall an Getreide und Mais

Anteil befallener Körner (%)	Ernte	Mais	Hafer	Gerste	Weizen
	Proben (n)	32	22	20	40
F. langsethiae	2000	0	2,42	0	0,10
	2001	0	2,10	0,29	0,22
F. sporotrichioides	2000	0	0,17	0,13	0,15
	2001	0,05	0,70	0,14	0

Bei Getreide gewinnt *F. langsethiae*, eine erst jüngst beschriebene und nach morphologischen bzw. chemotaxonomischen Gesichtspunkten zwischen *F. poae* und *F. sporotrichioides* zu klassifizierende *Fusarium*-Art in zunehmendem Maß bei Getreide an Bedeutung (vergl. Tab. 4).

F. langsethiae übertrifft dabei etwa bei Hafer *F. sporotrichioides* hinsichtlich der Häufigkeit des Vorkommens und erweist sich im Kulturversuch ebenso wie dieser Pilz auch als ein starker Toxinbildner [9]. Bei Isolaten von *F. langsethiae* wurde dabei im Vergleich zu *F. sporotrichioides* in Kulturversuchen eine tendenziell stärkere Produktion von T-2 Toxin festgestellt (vergl. Tab. 5).

Tabelle 5: *F. langsethiae* und *F. sporotrichioides,* Toxinbildungsfähigkeit

Toxinbildungsfähigkeit in vitro		**T-2 Toxin**	**HT-2 Toxin**
F. langsethiae	Bereich der Toxingehalte (mg/kg)	36 - 1.300	21 - 720
	Mittelwert,18 Isolate (mg/kg)	**211**	**243**
F. sporotrichioides	Bereich der Toxingehalte (mg/kg)	13 - 120	91 - 984
	Mittelwert,15 Isolate (mg/kg)	**51**	**390**

Fazit

Ein fortgesetztes Monitoring der in Österreich auftretenden Fusarienarten und dabei nicht zuletzt auch Beobachtungen zur Epidemiologie von *F. langsethiae* sowie weitere Erhebungen zur Mykotoxinbelastung in Getreide und Mais erscheinen als notwendige Voraussetzung für eine Quantifizierung des entsprechenden Gefahrenpotentials und somit unverzichtbar für ein späteres Risikomanagement bezüglich Mykotoxine im Interesse aller Konsumenten.

Literatur

(1) ADLER, A., H. LEW and W. EDINGER (1990): Incidence and toxigenicity of *Fusarium* species in cereals from Austria. Die Bodenkultur 41, 145 - 152.

(2) LEW, H., A. ADLER and W. EDINGER (1991): Moniliformin and the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). Mycotoxin Research 7A, 71 – 76.

(3) ÖHLINGER, R., A. ADLER, O. KRÄUTLER and H. LEW (2004): Occurrence of toxigenic fungi and related mykotoxins in cereals, feeds and foods in Austria. In: LOGRIECO, A. and A. VISCONTI (eds.): An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe. Kluwer Academ. Publ., Dordrecht, The Netherlands, 1-10.

(4) LEW, H., A. ADLER, W. EDINGER, W. BRODACZ, E. KIENDLER und J. HINTERHOLZER (2001): Fusarien und Fusarientoxine bei Mais in Österreich. Die Bodenkultur 52, 199-207.

(5) BURGESS, L.W., C.M. LIDDELL and B. SUMMERELL (1988): Laboratory manual for *Fusarium* research. Department of Plant Pathology and Agricultural Entomology, University of Sidney.

(6) NIRENBERG, H.I. and K. O'DONNEL (1998): New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella Fujikuroi* species complex. Mycologia 90: 434-458.

(7) LEW, H., A. ADLER, N. THIMM, R. KRSKA, G. WIEDNER and M. SCHUH (2001): Occurrence of toxigenic fungi and related mycotoxins in plants, food and feed in Austria.- in: LOGRIECO, A. (ed.): Occurrence of toxigenic fungi and mykotoxins in plants, food and feed in Europe. COST Action 835, Bari, Italy, 3-12.

(8) BRUNNER, S. und A. ADLER: Verschiebung im *Fusarium*-Artenspektrum bei österreichischen Körnerfrüchten. ALVA-Tagung 2004, 135-137.

(9) THRANE, U., A. ADLER, P.-E. CLASEN, F. GALVANO, W. LANGSETH, H. LEW, A. LOGRIECO, K. F. NIELSEN and A. RITIENI (2004): Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. Int. J. Food Microbiol. 95, 257-266.

Molekulargenetik der Fusariumresistenz bei Weizen

H. BÜRSTMAYR, Barbara STEINER, Ch. GLADYSZ,
A. SALAMEH, Nives ANGERER, M. LEMMENS

Der Anbau von Weizensorten mit ausreichend hoher Resistenz gegenüber Ährenfusariosen kann einen wichtigen Beitrag zur integrierten Bekämpfung dieser Pilzkrankheit und der damit einhergehenden Myktoxinbelastung des Getreides leisten. In mehreren europäischen Ländern ist das Merkmal Fusariumresistenz inzwischen ein wichtiges Kriterium für den Erfolg oder Misserfolg einer Sorte geworden. In der BRD werden Sorten mit überdurchschnittlicher Anfälligkeit gegenüber Ährenfusariose nicht mehr in die Landessortenversuche aufgenommen, und haben somit kaum eine Chance auf Vermarktung.

Für den Züchter stellt sich die schwierige Aufgabe, geeignete Resistenzquellen aufzufinden und die Resistenzeigenschaft in regional angepasste Sorten durch Kreuzungszüchtung einzulagern. Die Züchtung auf Fusariumresistenz ist aus mehreren Gründen aufwändig, wie z.B. 1) die Vererbung der Resistenz ist quantitativ (oligogen bis polygen), 2) die Resistenzprüfungen sind aufwändig und daher teuer, 3) die Ausprägung der Resistenz unterliegt beträchtlichen Genotyp-Umwelt Interaktionen.

Einerseits konnten mehr oder weniger an heutige Produktionsbedingungen angepasste Winterweizenlinien oder -sorten mit geringer Anfälligkeit gegen Ährenfusariose identifiziert werden, wie beispielsweise die Sorten Arina aus der Schweiz, Renan aus Frankreich, Dream und Petrus, aus Deutschland, usw. In den Nachkommenschaften aus Kreuzungen regional angepasster Linien mit diesen Sorten besteht eine gute Chance, Sortenkandidaten mit geeigneter agronomischer Anpassung und zufriedenstellender Fusariumresistenz zu selektieren. Zahlreiche Züchter nutzen für die Selektion auf Resistenz Provokationsversuche wobei mittels künstlicher Inokulation ein hoher Fusarium-Infektionsdruck im Versuchsfeld erzeugt wird. In der Praxis erwies es sich bisher als schwierig, mittel- bis kurzstrohige Linien mit ausreichender Resistenz zu finden.

Ein alternativer Weg zur Entwicklung fusariumresistenter Sorten ist die Nutzung von wenig angepassten genetischen Ressourcen mit sehr hoher Resistenz, wie z.B. Sumai-3 und verwandte Linien aus China. Die Nutzung dieser Ressourcen durch Kreuzungszüchtung ist langwierig, da nur über mehrere Rückkreuzungen und Selektionszyklen regional angepasste Sortenkandidaten zu erwarten sind. Alternative Selektionsverfahren würden allerdings die Nutzung der exotischen Ressourcen beschleunigen.

Autoren: Ao. Univ. Prof. Dr. Hermann BÜRSTMAYR, Dr. Barbara STEINER, Dipl.-Ing. Christian GLADYSZ, MSc. Aziz SALAMEH, Dipl.-Ing. Nives ANGERER und Ao. Univ. Prof. Dr. Marc LEMMENS, Universität für Bodenkultur Wien, Department IFA-Tulln, Institut für Biotechnologie in der Pflanzenproduktion, Konrad Lorenz Str. 20, A-3430 Tulln

Ein alternativer Weg zur Entwicklung fusariumresistenter Sorten ist die Nutzung von wenig angepassten genetischen Ressourcen mit sehr hoher Resistenz, wie z.B. Sumai-3 und verwandte Linien aus China. Die Nutzung dieser Ressourcen durch Kreuzungszüchtung ist langwierig, da nur über mehrere Rückkreuzungen und Selektionszyklen regional angepasste Sortenkandidaten zu erwarten sind. Alternative Selektionsverfahren würden allerdings die Nutzung der exotischen Ressourcen beschleunigen.

Mittels molekularer Marker könnte eine indirekte Selektion auf die Anwesenheit von Resistenzgenen erfolgen, die Selektion wäre schon in frühen Generationen möglich und könnte die Einlagerung von Resistengenen wesentlich beschleunigen. Zahlreiche internationale Arbeiten zur molekulargenetischen Analyse der Fusariumresistenz wurden in den vergangen Jahren veröffentlicht (z.B. Waldron et al. 1999, Bai et al. 1999, Anderson et al. 2001, Zhou et al. 2002). Wir am IFA führten einige Projekte zur molekularen Kartierung der Fusariumresistenz in exotischen Resistenzquellen durch, mit dem Ziel molekulare Marker zu entwickeln, die in der Sortenzüchtung genutzt werden können. Zu diesem Zweck erstellen wir aus Kreuzungen von anfälligen Sorten mit Resistenzträgern rekombinante Linien. Diese Linien wurden einerseits in wiederholten Feldversuchen auf Resistenz geprüft und parallel dazu mittels molekularer Marker genetisch charakterisiert. Die gemeinsame Analyse der Markerdaten mit den Felddaten erlaubte die Identifizierung von Genomabschnitten, welche Resistenzgene tragen.

Am IFA-Tulln arbeiteten wir an molekularen Kartierungen mit der Zuchtlinie CM-82036 (= Sumai3/Thornbird), der brasilianischen Sorte Frontana und der chinesischen Landsorte Wangshuibai.
In der Kreuzungspopulation CM-82036/Remus konnten wir zwei wichtige QTL identifizieren, welche auf den Chromsomen 3BS und 5A liegen. Der QTL (quantitative trait locus) auf 3BS bedingt überwiegend Resistenz gegenüber Ausbreitung des Pilzes in der Ähre, während der QTL auf 5A überwiegend Eindringungsresistenz vermittelt (Buerstmayr et al. 2002, 2003). In der brasilianischen Sorte Frontana scheinen mehrere Gene mit jeweils kleinen Einzeleffekten an der Resistenzausprägung beteiligt zu sein. Die QTL mit den relativ größten Effekten fanden wir auf den Chromsomen 3A und 5A und bedingten Eindringungsresistenz (Steiner et al. 2004). In der Landsorte Wangshuibai fanden wir zwei QTL, und zwar auf den Chromomen 3BS und 2DL, wobei die Position des 3BS QTL mit der aus CM-82036 übereinstimmt.

QTL Analysen mit europäischen Winterweizen wurden inzwischen ebenfalls durchgeführt (z.B. Gervais et al. 2003, Paillard et al. 2004, Schmolke et al. 2004). Es scheint dass europäischen Winterweizen (z.B. Arina, Renan, Dream) voneinander und von den exotischen Sommerweizen unterschiedliche Resistenzgene tragen.

Eine Kombination dieser unterschiedlichen Ressourcen wäre daher prinzipiell möglich und sollte die Entwicklung von Sorten mit einem sehr hohen Resistenzgrad erlauben. Die schwierigste Herausforderung für die praktische Züchtung bleibt allerdings auch in Zukunft die Entwicklung von Sorten mit optimaler Kombination von Resistenz, Ertrag und Qualität.

Danksagung

Wir danken für die Projektfinanzierungen: FWF P9190-BIO, EU-Projekt FUCOMYR, BM:BWK Projekt GZ 309.006/3-VIII/B/8/2000.

Literatur

Anderson, J.A., R.W. Stack, S. Liu, B.L. Waldron, A.D. Fjeld, C. Coyne, B.R. Moreno-Sevilla, J. Mitchell, Q.J. Song, P.B. Cregan, and R.C. Frohberg, 2001. DNA markers for a *Fusarium* head blight QTL in two wheat populations. Theor. Appl. Genet. **102,** 1164-1168.

Bai, G., F.L. Kolb, G. Shaner, and L.L. Domier, 1999. Amplified fragment length polymorphism markers linked to a major quantitative trait locus controlling scab resistance in wheat. Phytopathology **89,** 343-348.

Buerstmayr, H., B. Steiner, M. Lemmens, and P. Ruckenbauer, 2000. Resistance to *Fusarium* head blight in two winter wheat crosses: heritability and trait associations. Crop Sci. **40,** 1012-1018.

Buerstmayr, H., M. Lemmens, L. Hartl, L. Doldi, B. Steiner, M. Stierschneider, and P. Ruckenbauer, 2002. Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (type II resistance). Theor. Appl. Genet. **104,** 84-91.

Gervais, L., F. Dedryver J.Y. Morlais, V. Bodusseu, S. Negre, M. Bilous, C. Groos, M. Trottet, 2003. Mapping of quantitative trait loci for field resistance to Fusarium head blight in anEuropean winter wheat Theor. Appl. Genet. **106**, 961-970

Mardi M., H. Buerstmayr, B. Ghareyazie, M. Lemmens, S.A. Mohammadi, R. Nolz, and P. Ruckenbauer 2004. QTL analysis of resistance to Fusarium head blight in wheat using a 'Wangshuibai' derived population. Plant Breeding (accepted)

Paillard S., T. Schnurbusch, R. Tiwari, M. Messmer, M. Winzeler, B. Keller, G. Schachermayr, 2004. QTL analysis of resistance to Fusarium head blight in Swiss winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Appl. Genet. **109**, 323–332.

Steiner, B., M. Lemmens, M. Griesser, U. Scholz, J. Schondelmaier, and H. Buerstmayr, 2004. Molecular mapping of resistance to Fusarium head blight in the spring wheat cultivar Frontana. Theor. Appl. Genet. **109**, 215-224

Waldron, B.L., B. Moreno-Sevilla, J.A. Anderson, R.W. Stack, and R.C. Frohberg, 1999. RFLP mapping of QTL for *Fusarium* head blight in wheat. Crop Sci. **39,** 805-811.

Zhou, W.C., F.L. Kolb, G.H. Bai, G. Shaner and L.L. Domier, 2002. Genetic analysis of scab resistance QTL in wheat with microsatellite and AFLP markers. Genome **45,** 719-727.

Schmolke, M., G. Zimmermann, H. Buerstmayr, G. Schweizer, T. Miedaner, V. Korzun, E. Ebmeyer and L. Hartl, 2004. Molecular mapping of Fusarium head blight resistance in the winter wheat population Dream/Lynx. Theor. Appl. Genet. (accepted)

Biosynthese und Metabolismus von Zearalenon

R. MITTERBAUER, Katharina WONDRASCH, Michaela PERUCI, F. BERTHILLER,
R. SCHUHMACHER, R. KRSKA, Gabriela NAGL-NEUHOLD, M. LEMMENS,
Frances TRAIL und G. ADAM

Einleitung

Fusarium graminearum bildet im Zuge des Befalls von Weizen, Mais und anderen Getreiden nicht nur akut toxische Trichothecene wie Deoxynivalenol (DON) sondern auch das östrogen aktive Zearalenon (ZON). Während bei der Ährenfusariose des Weizens die Bildung von DON ein wesentlicher Virulenzfaktor ist (d.h. die DON-Bildung ist zumindest für das Ausmaß der Symptome beziehungsweise für die Dynamik der Symptomausprägung bestimmend), ist die Bedeutung von ZON für die Pathogenese noch weitgehend unklar. Dies hauptsächlich, weil bisher weder gesicherte Erkenntnisse zur Biosynthese von ZON im Pilz noch zum ZON-Metabolismus in der Wirtspflanze vorliegen. Die vollständige Sequenzierung und Annotation des Genoms von *Fusarium graminearum* (Adam, 2004) erlaubt uns nun vor allem einen besseren Einblick in die Physiologie des Pathogens, sollte aber davon ausgehend auch zum Verständnis der Antwort der Wirtspflanze beitragen.

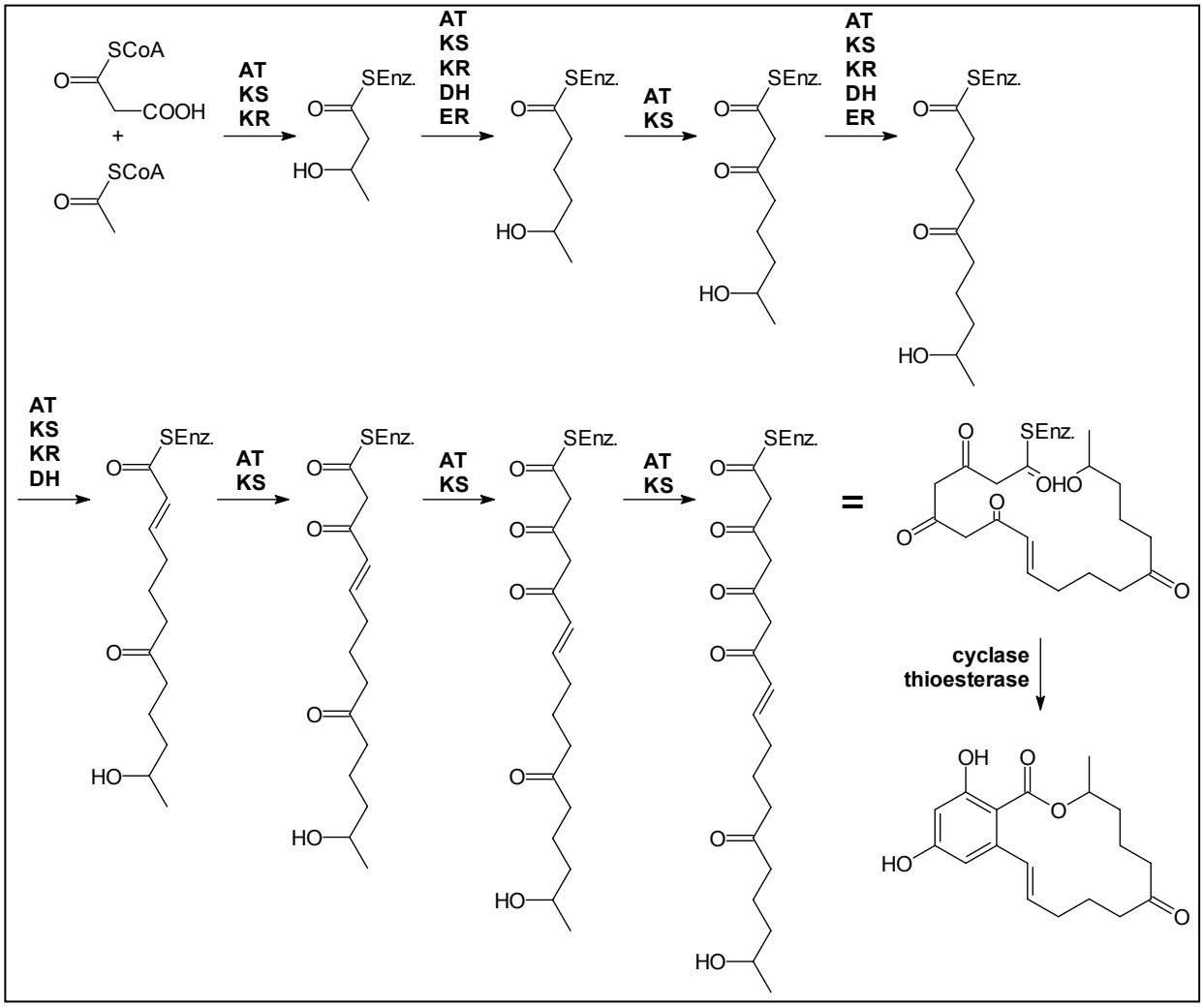
Biosynthese von Zearalenon und Zearalenon-Sulfat: Ergebnisse und Diskussion

Zearalenon, ein Resorcylsäure-Lacton, wird von *Fusarium* spp. durch sogenannte Polyketidsynthasen (PKSs) synthetisiert. Diese Multienzymkomplexe katalysieren in Analogie zur Fettsäure-Biosynthese die Synthese komplexer Sekundärmetaboliten (siehe Schwarzer & Marahiel, 2001). An die Startereinheit Acetyl-CoA werden dabei schrittweise unter Decarboxylierung Bausteine wie Malonyl-CoA angelagert. Im Unterschied zur Fettsäure-Biosynthese müssen aber die Reaktions-Intermediate vor der nächsten Kondensation nicht vollständig reduziert werden: in Abhängigkeit von der zu synthetisierenden Verbindung kommen Ketoreduktase- (KR), Dehydrogenase- (DH) bzw. Enoylreduktase- (ER) Aktivität vor bestimmten Stufen der Kettenverlängerung zur Anwendung. Im Genom von *F. graminearum* finden sich zumindest 16 Gene (Kroken *et al.*, 2003), die für putative PKSs kodieren.

Autoren: Dr. Rudolf MITTERBAUER, Katharina WONDRASCH, DI Michaela PERUCI, Ao.Univ. Prof. Dr. Gerhard ADAM, Institut für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Department für Angewandte Pflanzenwissenschaften und Pflanzenbiotechnologie, Universität für Bodenkultur Wien, Muthgasse 18, A-1190 Wien
Mag. Franz BERTHILLER, Dr. Rainer SCHUHMACHER, Ao. Univ. Prof. Dr. Rudolf KRSKA Analytikzentrum und Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung, Department IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien; Ing. Gabriela NAGL-NEUHOLD, Ao. Univ. Prof. DDr. Marc LEMMENS Abteilung Biotechnologie in der Pflanzenproduktion, Department IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln
Assoc. Prof. Frances TRAIL, Department of Plant Biology, Michigan State University, East Lansing, MI, USA

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Frances Trail wurden PKS-Gendisruptionsmutanten hergestellt und diese auf Verlust der Fähigkeit zur Zearalenonbildung untersucht. Zwei verschiedene PKS Gene erwiesen sich als notwendig für die ZON-Biosynthese. Ein Schema des vermutlichen Biosyntheseweges ist in Abbildung 1 ersichtlich.

Abbildung 1: Modell der Biosynthese von Zearalenon



AT (Acyltransferase), KS (Ketosynthase), (KR) Ketoreduktase, (DH) Dehydrogenase, (ER) Enoylreduktase

Um eine mögliche Rolle von ZON als Virulenzfaktor zu testen, wurden Inokulations-Experimente mit Weizen durchgeführt. Dabei ergab sich eine geringe, aber signifikante Veminderung der Ausbreitung der Mutanten vom Inokulationspunkt. Da die ZON-defizienten Stämme jedoch anderere Metaboliten (wie z.B. Deoxynivalenol) bilden können und aufgrund der möglichen Redundanz von Virulenzfaktoren, sind keine allzu dramatischen Effekte zu erwarten. Noch unveröffentlichte Ergebnisse zum Effekt von ZON auf die Genexpression in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (Werner *et al.*, in Vorbereitung) deuten darauf hin, dass ZON spezifisch die Expression von Genen unterdrückt, die überwiegend für Proteine kodieren, denen eine Rolle in der Zellwandmodifikation zugeschrieben wird (Zellwandverstärkung während der Pathogenabwehr).

Allerdings ist dieser Effekt transient, da ZON in *Arabidopsis* rasch metabolisiert und vorwiegend in ZON-4-Glucosid übergeführt wird. Zu einem geringeren Teil entsteht auch ZON-4-Sulfat. Im *Arabidopsis* Genom gibt es 18 putative Sulfotransferasen. Durch heterologe Überexpression der einzelnen Sulfotransferasen in *Escherichia coli* und die nachfolgende Charakterisierung der Substratspezifität, sollte es möglich sein die ZON-Sulfotransferase(n) innerhalb dieser Genfamilie zu identifizieren.

Aus der Literatur (Plasencia & Mirocha, 1991) ist bekannt, dass *F. graminearum* selbst ebenfalls ZON-4-Sulfat bilden kann. Welche Bedeutung diese Sulfatierung für den Pilz hat ist momentan noch ungeklärt, eine Selbstschutz-Funktion wäre denkbar. Nach Zugabe von Zearalenon zu Disruptionsmutanten, die dieses selbst nicht herstellen können, wird ZON rasch in ZON-4-Sulfat umgewandelt. Im Genom von *F. graminearum* konnte eine putative Sulfotransferase identifiziert und auch bereits durch Transformation inaktiviert werden. Die Disruptionsmutanten werden nun phänotypisch charakterisiert.

Danksagung:

Die Autoren bedanken sich beim österreichischen Genomforschungsprogramm GEN-AU und bei der Christian Doppler Forschungsgesellschaft für die finanzielle Unterstützung.

Literatur:

Adam G (2004): *Fusarium graminearum* Genomsequenz: was nun? ALVA-Mitteilungen (Aktuelle Probleme der Mykologie und der Mykotoxinforschung) 1: 14-16

Kroken S, Glass NL, Taylor JW, Yoder OC, Turgeon BG (2003) Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. Proc Natl Acad Sci USA. 100: 15670-15675.

Plasencia J, Mirocha CJ. (1991) Isolation and characterization of zearalenone sulfate produced by Fusarium spp. Appl. Environ. Microbiol. 57: 146-150

Schwarzer D, Marahiel MA. (2001) Multimodular biocatalysts for natural product assembly. Naturwissenschaften: 93-101.

Identifizierung eines neuen Virulenzgenes von *Fusarium graminearum* mit einer zentralen Rolle in der Biosynthese von Sekundärmetaboliten

Michaela PERUCI, F. BERTHILLER, R. SCHUHMACHER, R. KRSKA,
Gabriela NAGL-NEUHOLD, M. LEMMENS, R. MITTERBAUER und G. ADAM

Einleitung

Pflanzenpathogene Pilze können häufig Sekundärmetaboliten produzieren, die für die Befähigung die jeweilige Pflanzenkrankheit hervorzurufen entweder absolut essentiell sind (= Pathogenizitätsfaktor) oder zumindest für das Ausmaß der Symptome beziehungsweise für die Dynamik der Symptomausprägung bestimmend sind (= Virulenzfaktor). Besonders augenfällig ist dies bei den sogenannten wirts-spezifisch wirksamen Toxinen. In mehreren Fällen konnte mit den Mitteln der modernen Molekularbiologie eindeutig die Relevanz der jeweiligen Toxine bzw. der Toxinresistenz der Pflanzen gezeigt werden. Ein Beispiel hierfür ist die Bildung des HC-toxins durch den Mais-Pathogen *Cochliobolus carbonum* (*Helminthosporium maydis*). Gendisruptionsmutanten des Pilzes, die das HC-Toxin nicht mehr bilden können, sind nicht mehr pathogen (Panaccione *et al.*, 1992). Andererseits konnte gezeigt werden, dass das gegen den Pilz wirksame Resistenzgen *Hm1* von Mais für ein Detoxifikationsenzym kodiert, welches das HC-toxin chemisch inaktiviert (Johal & Briggs, 1992). Wirts-spezifisch wirksame Toxine sind insbesonders bei *Alternaria* und *Cochliobolus*-Arten beschrieben (zusammengefaßt in Walton, 1996). In vielen Fällen ist die Rolle von Pilzmetaboliten zwar naheliegend, jedoch schwierig zu beweisen, beispielsweise wenn Korrelationen zwischen Toxinbildung und Virulenz des Pilzes vorliegen, bzw. Korrelationen zwischen Toxinresistenz und Pilzresistenz der Wirtspflanze. Häufig ist die Toxinresistenz jedoch nur quantitativ und polygen vererbt. Der Mangel an Wissen über die molekularen Mechanismen der Toxinresistenz erschweren die pflanzenzüchterische Nutzung (Buiatti & Ingram, 1991).

Eine alternative Bekämpfungsstrategie basiert auf der Blockade der Biosynthese von Sekundärmetaboliten, die Virulenzfaktoren des Pilzes sind. Für den *Magnaporthe grisea* ist beispielsweise die Fähigkeit melanisierte Appressorien herzustellen essentiell für den Befall von Reis. Verschiedene Melaninbiosynthese-Inhibitoren sind daher effektive Pflanzenschutzmittel (siehe Kurahashi, 2001), obwohl sie nicht generell fungizid wirken. Verantwortlich für die enorme Vielfalt der Pilz-Toxine sind relative wenige Biosynthesemechanismen, sodass die Herausforderung eigentlich darin besteht, geeignete Angriffspunkte für Inhibitoren zu identifizieren.

Autoren: DI Michaela PERUCI, Dr. Rudolf MITTERBAUER, Ao. Univ. Prof. Dr. Gerhard ADAM, Institut für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Department für Angewandte Pflanzenwissenschaften und Pflanzenbiotechnologie, Universität für Bodenkultur Wien, Muthgasse 18, A-1190 Wien
Mag. Franz BERTHILLER, Dr. Rainer SCHUHMACHER, Ao. Univ. Prof. Dr. Rudolf KRSKA, Analytikzentrum und Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung, Department IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien; Ing. Gabriela NAGL-NEUHOLD, Ao. Univ. Prof. DDr. Marc LEMMENS, Abteilung Biotechnologie in der Pflanzenproduktion, Department IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln

Abgesehen von Isoprenoiden (z.B. Trichothecene wie Deoxynivalenol) werden Mykotoxine meist von sogenannten Polyketid-Synthasen (PKS) oder Nichtribosomalen-Peptidsynthasen (NRPS) hergestellt. Beispiele für Polyketide die von *Fusarium* gebildet werden sind Zearalenon oder Fumonisine. Im Gegensatz dazu sind Beauvericin, Enniatine und Siderophore wie Fusarinine typische NRPS-Produkte.

PKS- und NRPS-Module können auch zusammenwirken, wie dies für die Biosynthese von Fusarin C beschrieben wurde (Song *et al.*, 2004). Die Analyse von vollständig sequenzierten Genomen filamentöser Pilze deutet darauf hin, dass Pathogene eine Vielzahl (jeweils mehr als ein Dutzend) von putativen PKS und NRPS Genen aufweisen. Nur in den wenigsten Fällen ist jedoch bekannt, welche Genprodukte für die Synthese welcher Metaboliten verantwortlich sind, und ob diese weitgehend unbekannten Substanzen einen Einfluss auf die Pathogenizität des Pilzes haben.

Ergebnisse und Diskussion

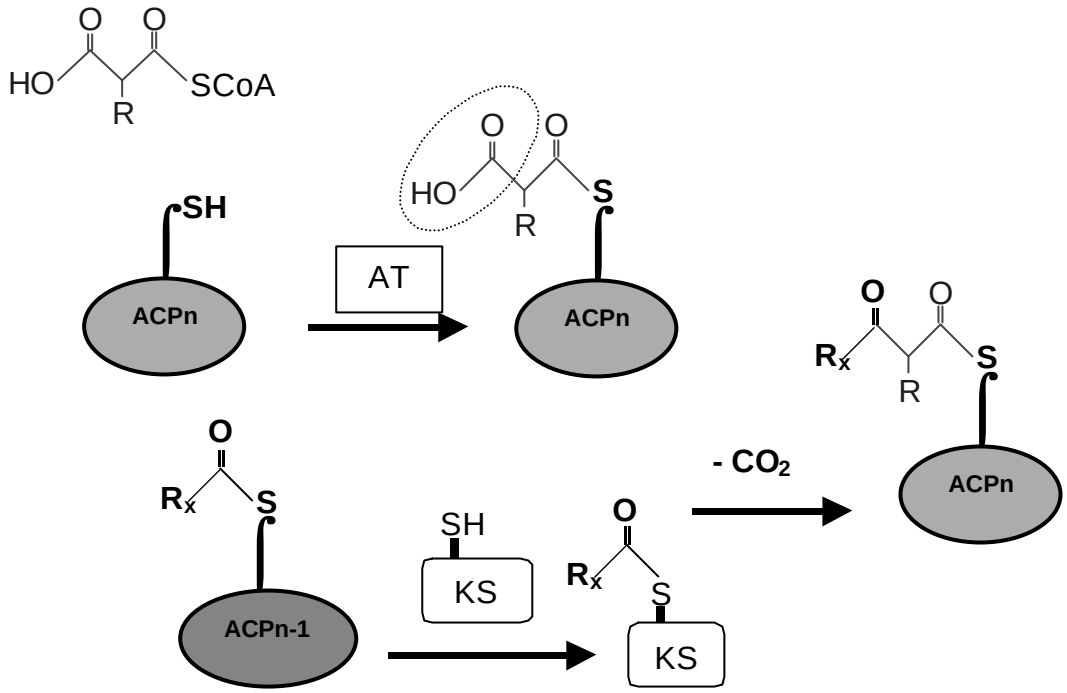
Nichtribosomale-Peptidsynthasen und Polyketidsynthasen sind befähigt Kettenverlängerungen zwischen aktivierten Vorstufen durchzuführen. Im Fall der Polyketidsynthasen werden zur Verlängerung der Kette normalerweise Malonyl-CoA Einheiten verwendet (Abbildung 1). Bei den Nichtribosomalen Peptidsynthasen werden zuerst Aminosäurederivate mit ATP aktiviert (Abbildung 2). Die Acylgruppe wird auf eine ACP-Domäne (Acyl-Carrier-Protein) der PKS übertragen, die aktivierte Aminosäure auf eine PCP-Domäne (Peptidyl-Carrier-Protein) der NRPS.

Die jeweiligen Bausteine werden an die Thiol-Gruppe der kovalent an das ACP bzw. PCP gekoppelten prostethischen Gruppe 4'-Phosphopantethein gebunden, welche einen flexiblen Arm darstellt, an dem die Bausteine an die enzymatisch aktiven Domänen weitergereicht werden können. Die prostethische Gruppe 4'-Phosphopantethein ist daher essentiell für die Funktion von PKS und NRPS Proteinen. Unser Ziel war es herauszufinden, welches Gen in *Fusarium graminearum* für das Enzym kodiert, welches post-translational PKS und NRPS Apo-Proteine in die aktive Form überführen kann.

Die Analyse des vollständig sequenzierten *Fusarium graminearum* Genoms ergab, dass ein vorhergesagtes *Fusarium* Genprodukt erkennbare Ähnlichkeit mit einem *Bacillis subtilis* Protein aufweist, das 4'-Phosphopantetheine-Transferase (PPT) Aktivität hat (Mootz *et al.*, 2001). Eine weitere putative PPT-Domäne im Fusarium-Genom ist Teil einer putativen Fettsäuresynthase, die für die Autoaktivierung dieses Enzymes zuständig sein dürfte.

Um die Funktionalität des *PPT1* genannten Kandidatengens zu testen, wurde ein Disruptionsplasmid hergestellt. Dabei wurde der offene Leserahmen durch Einfügen eines Hygromycinresistenz vermittelnden Markergens zerstört.

Abbildung 1: Funktion der Acylcarrier-Domäne (ACP) in Polyketidsynthasen

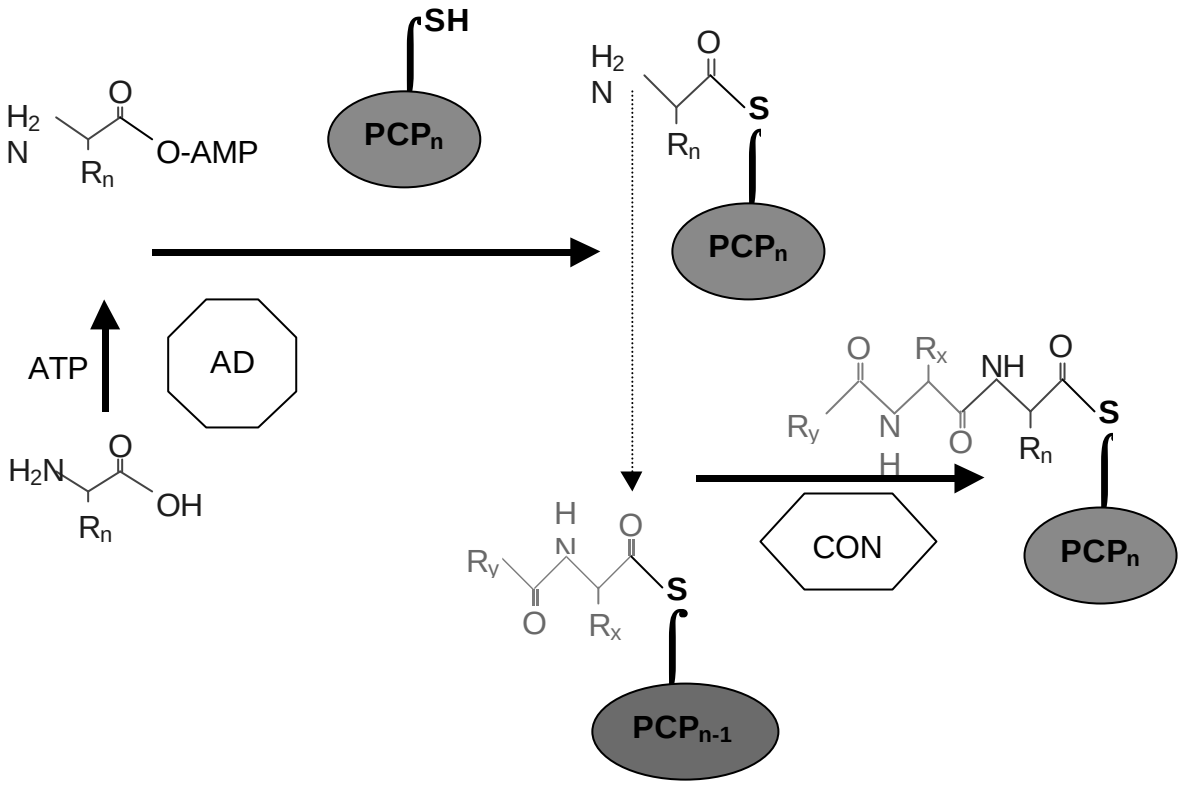


Legende:
Der an das Acyl-Carrier Protein (ACP) gebundene flexible Phosphopantetheinyl-Arm (symbolisiert durch Haken) wird zuerst durch eine Acyltransferase-Domäne (AT) mit einer Extender-Einheit (üblicherweise Malonyl-CoA (R=H), selten auch Methylmalonyl-CoA ($R=CH_3$) beladen. Der Acyl-Rest der Startereinheit oder der in der vorangegangen Synthese-Runde entstandene Acylrest (Polyketid) wird auf ein Cystein im aktiven Zentrum der Keto-Synthase Domäne (KS) übertragen. Dieses Enzym katalysiert auch die Decarboxylierung der Extender-Einheit am ACP und den Transfer der wachsenden Acyl-Kette auf die nächste ACP-Domäne.

Protoplasten von *F. graminearum* wurden mit diesem Plasmidkonstrukt transformiert und Hygromycin-resistente Transformanten selektiert. In mehreren unabhängigen Transformanten konnte der durch homologe Rekombination erfolgte Einbau der HygR-Kassette in die chromosomale DNA nicht nur mittels PCR verifiziert werden, sondern war bereits phänotypisch durch vollständigen Verlust der Pigmentierung erkennbar. Untransformierte Zellkerne wurden durch mehrfache Passage durch das Konidien-Stadium entfernt. Diese Transformanten wurden dann auf verändertes Metabolitenspektrum mittels LC-MS und veränderte Virulenz durch Inokulation von Weizen in der Klimakammer getestet. In den Mutanten wurden die Polyketide Aurofusarin (Pigment) und Zearalenon nicht mehr gebildet. Weitere komplexe Änderungen im Metabolitenspektrum sind Gegenstand laufender Untersuchungen.

Besonders relevant ist jedoch das Ergebnis der Virulenztests. Die *ppt1*-Defektmutanten, die auf PDA-Medium kaum weniger rasch als der Wildtyp wuchsen, waren im Gegensatz zu diesem nicht imstande sich von der Infektionsstelle auszubreiten. Krankheitssymptome waren auf das inokulierte Ährchen beschränkt.

Abbildung 2: Funktion of the Peptidyl-Carrier (PCP) Domänen in NRPSs



Legende:

Der erste Schritt in der Ausbildung der Peptidbindung durch Nichtribosomale-Peptidsynthasen (NRPSs) ist die Aktivierung von (häufig nicht-standard) Aminosäuren mittels ATP durch eine Adenylierungs-Domäne (AD), die auch den Transfer auf den Phosphopantetheinyl-Arm katalysiert, der an das Peptidyl-Carrierer Protein (PCP) gebunden ist. Eine Kondensationsdomäne (CON) katalysiert dann die nucleophile Attacke (strichlierte Linie) des Amino-Stickstoff des Aminoacyl-S-PCP (R_n) auf das elektrophile Carbonyl-Kohlenstoffatom des Donors (R_x Peptidyl-PCP).

Daraus ist zu schließen, dass eines oder mehrere der Substrate der Phosphopantetheinyl-Transferase für die Biosynthese eines Pathogenizitätsfaktors von *Fusarium graminearum* entscheidend ist. Die Inaktivierung von *PPT1* sollte equivalent zu einem simultanen Verlust aller PKS und NRPS Gene sein. *PPT1* stellt daher einen möglicherweise idealen Angriffspunkt zur Bekämpfung pathogener Pilze dar. Gegenwärtig wird an der Entwicklung von Bioassays gearbeitet, die zur Identifizierung von PPT-Inhibitoren geeignet sind.

Danksagung:

Die Autoren bedanken sich beim österreichischen Genomforschungsprogramm GEN-AU und bei der Christian Doppler Forschungsgesellschaft für die finanzielle Unterstützung.

Literatur:

Buiatti M, Ingram DS (1991) Phytotoxins as tools in breeding and selection of disease-resistant plants. Experientia 47: 811-819

Johal GS, Briggs SP (1992) Reductase activity encoded by the HM1 disease resistance gene in maize. Science 258: 985-987.

Kurahashi Y (2001) Melanin biosynthesis inhibitors (MBIs) for conrol of rice blast. Pesticide Outlook 12: 32-35

Mootz HD, Finking R, Marahiel MA (2001) 4'-phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism of *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. 276: 37289-37298

Panaccione DG, Scott-Craig JS, Pocard JA, Walton JD. (1992) A cyclic peptide synthetase gene required for pathogenicity of the fungus Cochliobolus carbonum on maize. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6590-6594.

Song Z, Cox RJ, Lazarus CM, Simpson TJ (2004) Fusarin C biosynthesis in *Fusarium moniliforme* and *Fusarium venenatum*. ChemBioChem 5: 1196-1203.

Walton JD (1996) Host-selective toxins: agents of compatibility. Plant Cell 8: 1723-1733.

Isolierung und Bestimmung von maskiertem DON (DON-3-Glukosid) mittels LC-MS und dessen Vorkommen in Weizen

F. BERTHILLER, R. SCHUHMACHER, G. ADAM, M. LEMMENS und R. KRSKA

Einleitung:

Pflanzen können die Wirkung von Schadstoffen, entweder durch chemische Modifikationen und/oder Einbau in die Zellwand, mindern (Engelhardt et al., 1999). Dieser Entgiftungsprozess beinhaltet u.a. die Konjugation der Schadstoffe, z.B. Mykotoxine, an polare Substanzen wie Glukose. Diese „maskierten Mykotoxine" besitzen gegenüber unkonjugierten Mykotoxinen wesentlich niedrigere Toxizität und werden in Pflanzenvakuolen gespeichert. Im Verdauungstrakt von Säugetieren kann durch Hydrolyse das unkonjugierte Mykotoxin freigesetzt werden (Gareis, 1994). Seit Young et. al (1984) zeigten, dass der Deoxynivalenol (DON) Gehalt von fermentierten Nahrungsmitteln höher sein kann als der DON Gehalt im verwendeten, kontaminierten, Mehl, wurde über ein DON-Konjugat spekuliert, welches dem Pflanzenmetabolismus entstammt. Savard (1991) konnte erstmals Glukose und Fettsäure-Derivate von DON chemisch synthetisieren, während Sewald et al. (1992) Deoxynivalenol-3-β-D-glucopyranoside (DON-3-Glukosid) als DON Metaboliten in Maiszell-Suspensionskulturen identifizieren konnten. Poppenberger et. al (2003) fanden eine Glukosyltransferase im Genom der Acker-Schmalwand die in der Lage ist DON zu DON-3-Glukosid umzusetzen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit von DON-3-Glukosid die eukaryotische Proteinbiosynthese zu inhibieren weit geringer ist als die von DON. Dennoch fehlen bis heute Daten über das Auftreten und die Stabilität von DON-3-Glukosid in Getreide.

Aufgabenstellung:

DON-3-Glukosid wurde bereits in DON behandelter Acker-Schmalwand und in DON behandelter Hefe, welche die entsprechende Glukosyltransferase exprimiert, nachgewiesen. Hier stellte sich für uns die Frage, ob man DON-3-Glukosid auch in DON behandeltem oder in *Fusarium* inokuliertem Weizen nachweisen kann.

Autoren: Mag. Franz BERTHILLER, Dr. Rainer Schuhmacher, Ao. Univ. Prof. Dr. Rudolf Krska und Ao. Univ. Prof. Dr. Marc LEMMENS, Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung und Institut für Biotechnologie in der Pflanzenproduktion, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie, IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln
Ao. Univ. Prof. Dr. Gerhard ADAM, Institut für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Department für Angewandte Pflanzenwissenschaften und Pflanzenbiotechnologie, Universität für Bodenkultur Wien, Muthgasse 18, A-1190 Wien

Durchführung:

DON-3-Glukosid-Standard:

Nach der chemischen Synthese des DON-3-Glukosids (Berthiller et al., 2003), wurde es durch HPLC bei 25°C mit Methanol/Wasser (10/90, v/v) auf einer 100mm x 4.6mm i.d., 3 µm RP-18 Aquasil® Säule (Thermo-Keystone, Waltham, USA) weiter aufgereinigt. Die Konzentration des Standards wurde nach Messung der UV-Absorption bei 220nm bestimmt und dabei gleiche molare Extinktionskoeffizienten von DON-3-Glukosid und von DON angenommen.

Behandlung von Weizen:

Weizenähren von unterschiedlichen Linien wurden mit DON (1 mg pro Ähre) zum Zeitpunkt der Blüte behandelt. Alternativ wurden Weizenähren mit *Fusarium graminearum* oder *Fusarium culmorum* bei einsetzender Blüte besprüht. Die Ährenfusariose wurde über 26 Tage optisch beurteilt und die Anfälligkeit der Linien als Fläche unter der Krankheitsverlaufskurve (AUDPC) ausgewertet.

Nachweis von DON und DON-3-Glucosid in Weizenähren:

Ganze Ähren wurden gesammelt, getrocknet, gemahlen, 5g eingewogen und mit 40ml Acetonitril/Wasser (84/16, v/v) für 90min bei 180rpm auf einem Rotationsschüttler extrahiert. Die Extrakte wurden filtriert und mit neuartigen MycoSep® 230 Säulen (Romer Labs Diagnostic GmbH, Herzogenburg, Ö) aufgereinigt. Nach dem Trocknen im N_2-Strom wurden die Extrakte in Methanol/Wasser (10/90, v/v) aufgenommen, durch 0.45µm Membranfilter gepresst und analysiert. Die Analysen erfolgten auf einem QTrap-LC-MS/MS System (Applied Biosystems, Foster City, USA), mit einer Turbo Ion Spray (ESI) Quelle und einem 1100 Series HPLC System (Agilent, Waldbronn, Germany) samt eines 1100 Series Diode Array Detektor (DAD). Die chromatographische Trennung wurde bei 22°C mit Methanol/Wasser (15/85, v/v) auf einer 100mm x 4.6mm i.d., 3µm RP-18 Aquasil® Säule (Thermo-Keystone, Waltham, USA) durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 20µl bei einer Flussrate von 0.8ml/min. Die ESI Quelle wurde bei 400°C im negativen Ionisationsmodus gefahren. Weitere MS Parameter waren: curtain gas 20psi (138 kPa), nebulizer gas 30psi (207 kPa), auxiliary gas 65psi (448 kPa), ionization voltage -4200V, collision-activated dissociation gas 6, multiple reaction monitoring (MRM) dwell time 25ms. Produktionen-Spektren wurden mit einer Kollisionsenergie (CE) von –30eV and einem declustering potential (DP) von –46V aufgezeichnet. Der MRM-Modus und das UV-Signal bei 220nm wurden zur quantitativen Auswertung herangezogen, während der Produktionen (EPI) Scan zur Identifizierung der Moleküle verwendet wurde.

Ergebnisse und Diskussion:

Erstmals konnte DON-3-Glukosid in Weizen nachgewiesen werden (Berthiller et al., 2004). Einige Tage bis Wochen nach der Behandlung des Weizens mit DON bildete der Weizen typische Krankheitssymptome der Ährenfusariose aus. Abhängig vom Resistenzniveaus des behandelten Weizen variierte der Gehalt an DON-3-Glukosid.

Weiters bewirkte Sprüh-Inokulation von Weizenähren mit *Fusarium graminearum* oder *Fusarium culmorum* zur Blüte und unter natürlichen Umweltbedingungen neben der Bildung von DON ebenso die Bildung des DON-3-Glukosids. Auch konnten die Entstehung von 3-Acetyl-DON und 15-Acetyl-DON, sowie - in geringem Ausmaß - auch von 15-Acetyl-DON-3-Glukosid beobachtet werden.

Ein EPI Chromatogramm von *Fusarium* inokuliertem Weizen mit der Precursor Masse von 457.1amu (entspricht $[DON\text{-}3\text{-}Glukosid\text{-}H]^-$) zeigt einen einzelnen Peak bei der selben Retentionszeit wie der synthetisch hergestellte Standard (Abbildung 1). Ebenso zeigen die MS/MS Spektren dieses Peaks komplett identische Fragmente. Die Konzentration von DON-3-Glukosid in den Ähren wurde in unterschiedlichen Weizenlinien bestimmt. Der DON-3-Glukosid Gehalt betrug hier zwischen 14 und 29% des gesamten DONs, wiederum abhängig vom Resistenzniveaus des Weizens.

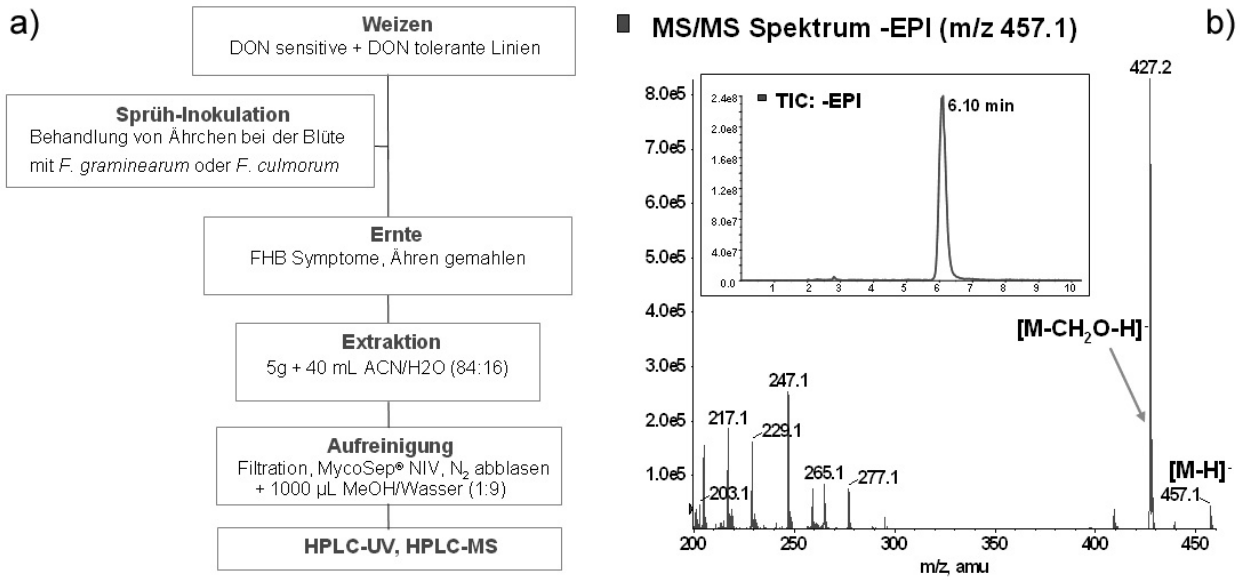


Abbildung 1

Auftreten von DON-3-Glukosid in *Fusarium sp.* inokuliertem Weizen. Links (a) ist ein Behandlungs- und Analysenschema dargestellt, rechts (b) ein HPLC Chromatogramm zusammen mit dem dazu gehörigem MS/MS Spektrum.

Zusammenfassung:

Pflanzen sind in der Lage Phytotoxine in konjugierte Derivate umzuwandeln. Erstmals konnte DON-3-Glukosid in DON kontaminiertem Weizen nachgewiesen werden. Weizensorten die hohe Resistenz gegenüber *Fusarien* zeigten, zeichneten sich nach Behandlung mit DON durch einen geringeren Gehalt an DON und einen erhöhen Gehalt an DON-3-Glukosid in den Ähren, verglichen mit anfälligeren Sorten, aus.

Danksagung:

Die Autoren bedanken sich bei Dr. Chiara Dall´Asta (Universität Parma, Italien) für die hervorragende Zusammenarbeit, sowie beim Österreichischen Genomforschungsprogramm (GEN-AU) des BM:BWK und der Christian Doppler Forschungsgesellschaft für die finanzielle Unterstützung.

Literatur:

Berthiller F., Schuhmacher R., Buttinger G., Freudenschuss G., Adam G. & Krska R., 2003. Synthesis of Deoxynivalenol-glucosides and their Characterization using a QTrap LC-MS/MS. *Mycotoxin Research* **19**(1): 47-50.

Berthiller F., Dall´Asta C., Lemmens M., Adam G., Krska R. & Schuhmacher R., 2004. Occurrence of a Deoxynivalenol Glucoside in Wheat. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (submitted).

Engelhardt G., Ruhland M. & Wallnöfer P.R., 1999. Metabolism of mycotoxins in plants. *Advanced Food Science* **21**(3/4): 71-78.

Gareis M., 1994. Maskierte Mykotoxine. *Übersichten zur Tierernährung* **22**: 104-113.

Poppenberger B., Berthiller F., Lucyshyn D., Sieberer T., Schuhmacher R., Krska R., Kuchler K., Glössl J., Luschnig C. & Adam G., 2003. Detoxification of the Fusarium Mycotoxin Deoxynivalenol by an UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 47905-47914.

Savard M.E., 1991. Deoxynivalenol fatty acid and glucoside conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **39**: 570-574.

Sewald N., Lepschy von Gleissenthall J., Schuster M., Müller G. & Aplin R.T., 1992. Structure elucidation of a plant metabolite of 4-desoxynivalenol. *Tetrahedron* **3**(7): 953-960.

Young J.C., Fulcher R.G., Hayhoe J.H., Scott P.M. & Dexter J.E., 1984. Effect of milling and baking on deoxynivalenol (vomitoxin) content of Eastern Canadian wheats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **32**: 659-664.

Simultane Bestimmung von A- und B-Trichothecenen und Zearalenon in Getreide durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie – Tandem Massenspektrometrie

R. SCHUHMACHER, F. BERTHILLER und R. KRSKA

Einleitung:

Schimmelpilze der Gattung *Fusarium* können eine Vielzahl giftiger Verbindungen, wie Fumonisine, Moniliformin, Fusarinsäure, Trichothecene und Zearalenon produzieren. In gemäßigten Zonen zählen die Trichothecene und Zearalenon zu den häufigsten *Fusarium* Myktotoxinen. Die Überprüfung der Einhaltung von Richt- und Grenzwerten in Lebens- und Futtermitteln erfordert den Einsatz sensitiver, selektiver und schneller analytischer Methoden. Die meisten analytischen Verfahren zur Bestimmung von Trichothecenen beruhen auf Gaschromatographie mit Elektroneneinfangdetektion, während Zearalenon meist durch HPLC mit Fluoreszenzdetektion bestimmt wird. In den letzten Jahren wird die Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie immer häufiger zum leistungsfähigen Nachweis von Mykotoxinen verwendet [1-3].

Aufgabenstellung:

Wir stellen eine neue LC-MS/MS Methode zur gleichzeitigen, sensitiven und quantitativen Bestimmung von Nivalenol (NIV), Deoxynivalenol (DON), Fusarenon-X (FUS-X), 3-Acetyl-DON (3ADON), 15-Acetyl-DON (15ADON), Diacetoxyscirpenol (DAS), HT-2 Toxin (HT-2), T-2 Toxin (T-2) und Zearalenon (ZON) in Weizen und Mais vor.

Durchführung:

Probenaufarbeitung:

10g gemahlene Getreideprobe wurden mit 5µg Zearalanon (ZAN) als internem Standard (IS) versetzt und mit 40mL Acetonitril/Wasser (84/16, v/v) für 90min auf einem Rotationsschüttler extrahiert. 8mL des filtrierten Rohextrakts wurden mit MycoSep® #226 Säulchen aufgereinigt und 4mL davon bei 50°C mit Stickstoff zur Trockene abgeblasen. Der Rückstand wurde in 1mL Methanol/ wässrige Ammoniumacetatlösung (5 mmol/L) (20/80, v/v) aufgelöst. Vor der Endbestimmung mit HPLC-MS/MS wurde die Probenlösung noch durch 0.22µm Membranfilter filtriert.

HPLC- und MS-Parameter:

Die Analysen wurden auf einer Agilent 1100 HPLC (Waldbronn, Deutschland) ausgeführt. Die Trennung des Probengemischs erfolgte mit einer Aquasil® RP-18, 3 µm, 100 x 4.6 mm HPLC-Säule von Thermo Electron (Woburn, MA, USA). Mobile Phase A: Methanol/Wasser, 20/80 (v/v) mit 5mM NH_4OCOCH_3; mobile Phase B: Methanol/Wasser, 90/10 (v/v) mit 5mM NH_4OCOCH_3

Autoren: Univ. Ass. Dr. Rainer SCHUHMACHER, Mag. Franz BERTHILLER, Ao. Univ. Prof. Dr. Rudolf KRSKA, Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie, IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln

Gradient: mobile Phase A 0.5min halten → 100% B in 4min; 2.5min halten → 100% A nach7.1 min, halten für 2.9min. LC Fluss 1.0mL/min, Injektionsvolumen: 25µL, Temperatur 25°C.
Das Q Trap® Tandem-Massenspektrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) wurde mit einer Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) Ionenquelle ausgestattet und im Multiple Reaction Monitoring (MRM) Modus verwendet. Die APCI Quelle wurde bei 450°C mit folgenden Einstellungen betrieben: Curtain Gas (CUR) 35p.s.i. (241kPa), Nebulizer Gas (GS1) 60p.s.i. (414kPa), Auxiliary Gas (GS2) 15p.s.i. (103kPa), Corona Discharge Needle Current (NC), -2 oder +2µA, Collision Activated Dissociation Gas (CAD) 6, MRM Dauer 25ms. Tabelle 1 zeigt die verwendeten MS/MS Parameter.

Tabelle 1. MS/MS Parameter, Nachweis der Mykotoxine und des Internen Standards MRM Modus

Substanz	Gewähltes Vorläufer-Ion	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (eV)
NIV	[NIV+CH3COO]-	371.1	59.1	-26	-48
NIV, qualifier	[NIV+CH3COO]-	371.1	281.1	-26	-32
DON	[DON+ CH3COO] -	355.1	59.1	-16	-30
DON, qualifier	[DON+ CH3COO] -	355.1	265.0	-16	-12
FUS-X	[FUS-X+CH3COO] -	413.1	59.1	-16	-40
FUS-X, qualifier	[FUS-X+CH3COO] -	413.1	187.0	-16	-34
3ADON	[ADONs+CH3COO] -	397.1	307.1	-11	-14
15+3ADONs	[ADONs+CH3COO] -	397.1	59.1	-11	-34
ADONs, qualifier	[ADONs+CH3COO] -	397.1	337.1	-11	-10
DAS	[DAS+NH4]+	384.2	307.3	21	15
HT-2	[HT-2+NH4]+	442.2	263.1	16	17
T-2	[T-2+NH4]+	484.2	185.2	21	25
ZAN (IS)	[ZAN-H] -	319.2	275.2	-56	-16
ZON	[ZON-H] -	317.2	131.2	-51	-38

Abschätzung der Validier-Kenndaten:

Eine Standardlösung aus NIV, DON, FUS-X, 3ADON, 15ADON, DAS, HT-2, T-2 und ZON in Acetonitril wurde zu Mykotoxin-freien Getreideproben dotiert. Nach Einstellen von 0, 10, 30, 50, 100, 300, 500 und 1000 µg/kg pro Toxin wurden 5 Analysen je Dotierniveau durchgeführt. Zusätzlich wurden für DON natürlich kontaminierte Weizen- und Maisproben analysiert und die Ergebnisse mit denen einer validierten „in-house“ GC-ECD Methode [4] verglichen. Insgesamt wurden 27 Proben mit DON Konzentrationen zwischen 30 und 1000µg/kg mit beiden Methoden analysiert. Nachweis- (NG) bzw. Bestimmungsgrenzen (BG) wurden aus dem Signal zu Rausch-Verhältnis (S/N) abgeschätzt (NG: S/N = 3, BG: S/N = 10).

Ergebnisse und Diskussion:

Abb. 1 zeigt ein Totalionenstrom-Chromatogramm nach Aufarbeitung einer mit Mykotoxinen versetzen Maisprobe (100µg/kg pro Toxin). Während der HPLC-Trennung wurde die Ionisationspolarität von negativ (B-Trichothecene) auf positiv (A-Trichothecene) und wieder zurück

auf negativ (ZON) umgeschaltet. Mit Ausnahme von 3ADON und 15ADON, die unter den verwendeten Bedingungen nicht voneinander getrennt werden, sind alle anderen Analyten basisliniengetrennt.

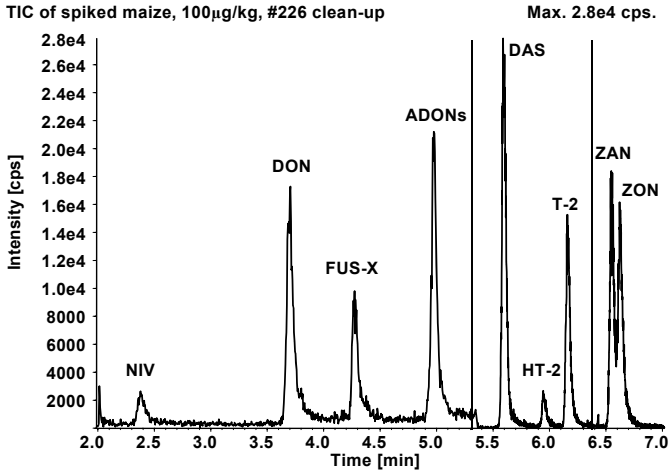


Abb 1. Totalionenstrom-Chromatogramm einer dotierten Maisprobe (100µg/kg je Mykotoxin) nach Aufreinigung durch MycoSep® #226 Säulchen und LC-MS/MS Analyse

Mit Ausnahme von NIV und ZON, lagen die Wiederfindungen (WF) aus den Dotier-Versuchen im Bereich von 74% bis 108% (Tabelle 2). Die niedrigen WF für NIV (50% bei Mais, 73% bei Weizen) kommen durch Adsorptionsverluste während der Aufreinigung mit den MycoSep Säulchen zu Stande. Bei den Maisproben zeigte die Intensität des MS Signals für ZON einen deutlichen Matrixeffekt durch Ionen-Suppression (Abnahme der Intensität auf 1/3). Durch Verwendung von ZAN als IS für ZON, konnte jedoch um die veränderte Signalintensität korrigiert werden.

Tabelle 2. Wiederfindungen und Variationskoeffizienten (CV) für dotierte Mais- und Weizenproben.

	Mais (n=40)		Weizen (n=40)	
Substanz	WF (%)	CV (%)	WF (%)	CV (%)
NIV	50	8.6	73	7.6
DON	79	7.2	89	7.4
FUS-X	89	7.4	97	6.7
ADONs	84	16	92	6.6
3ADON	85	10.3	95	6.5
HT-2	77	12.7	105	3.2
T-2	73	14.2	108	5.6
DAS	80	10.8	106	4.1
ZON (-IS)	30	23	74	5.7
ZON (+IS)	99	9.6	91	5.5

Bei den natürlich kontaminierten Weizen- und Maisproben wurden die Ergebnisse der LC-MS/MS Messungen mit denen der GC-ECD Messungen für DON verglichen (Abb. 2). Die Steigung der Regressionslinie entspricht einer durchschnittlichen Wiederfindung von 98%. Der Achsenabschnitt

von 40 µg/kg liegt unter der BG der GC-ECD Methode (50µg/kg). Messungen der Zertifizierten Referenzmaterialien BCR 378, BCR 717 zeigten für DON und ZON gute Übereinstimmungen mit den zertifizierten Gehalten (DON: 447± 2 µg/kg, zertifiziert: 430±40 µg/kg; ZON: 78±1.3 µg/kg, zertifiziert: 83.0±9.0 µg/kg).

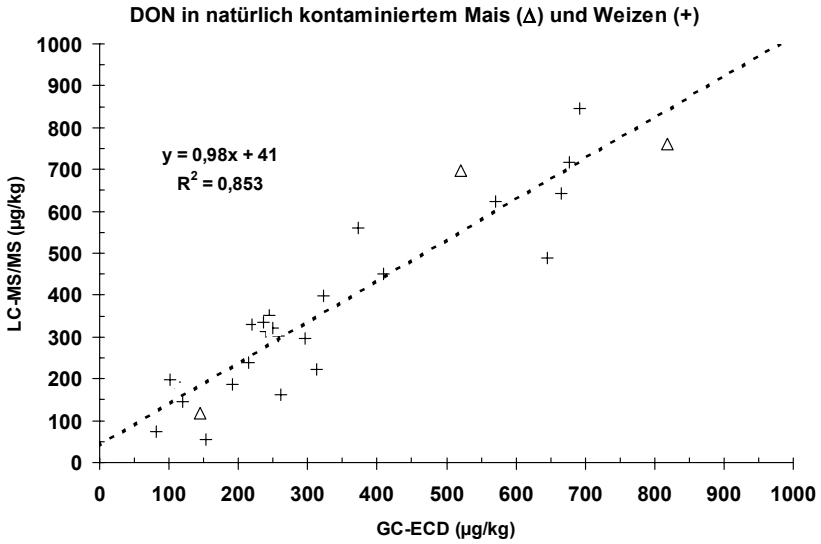


Abb. 2. Vergleich der DON Messergebnisse für natürlich kontaminierte Getreideproben. Mais- und Weizenproben wurden mittels GC-ECD und LC-MS/MS analysiert.

Zusammenfassung:

Es wurde eine schnelle quantitative Methode zur gleichzeitigen Bestimmung der *Fusarium* Mykotoxine Nivalenol, Deoxynivalenol, Fusarenon-X, 3-Acetyl-deoxynivalenol, 15-Acetyl-deoxynivalenol, Diacetoxyscirpenol, HT-2 toxin, T-2 toxin und Zearalenon in Mais und Weizen entwickelt. Die Rohextrakte (Acetonitril/Wasser 84/16) werden mit MycoSep® 226 Säulchen aufgereinigt. Die Endbestimmung erfolgt mittels HPLC-APCI-MS/MS. Der Einsatz eines Tandem Massenspektrometers ermöglicht die selektive Bestimmung der Mykotoxine und deren Quantifizierung im niedrigen µg/kg-Bereich.

Danksagung:

Die Autoren bedanken sich beim Österreichischen Genomforschungsprogramm (GEN-AU) des BM:BWK und der Christian Doppler Forschungsgesellschaft für die finanzielle Unterstützung.

Literatur:

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

[2] Razzazi-Fazeli E., Böhm J., Jarukamjorn K., Zentek J., 2003, *J. Chrom. B* **796**: 21-33.

[3] Zöllner P., Jodlbauer J., Lindner W., 1999. *J. Chrom. A* **858**: 167-174.

[4] Krska R., Baumgartner S., Josephs R., 2001. *Fres. J. Anal. Chem.* **371**: 285-299.

[5] Schuhmacher, R., Krska, R., Grasserbauer, M., Edinger, W., Lew, H., 1998. *Fres. J. Anal. Chem.* **360**: 241-245.

Studie zur Produktion zertifizierter B-Trichothecen Kalibranten

Elisabeth DRS, Alexandra PARICH, H. PETTERSSON, R. JOSEPHS, T. LINSINGER,
D. CHAN, P. BRERETON, R. SCHOTHORST, H. van EGMOND, R. KRSKA

Einleitung

Das Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), der wissenschaftliche Ausschuss für Lebensmittel der Europäischen Kommission und die nordische Arbeitsgruppe für Toxikologie werteten die Auswirkungen häufig vorkommender Mykotoxine aus der Gruppe der Typ B Trichothecene auf den Menschen aus. DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON und NIV wurden dabei als Giftstoffe erkannt, die zu akuten Krankheitssymptomen beim Menschen führen können. Bessere analytische Leistungsfähigkeit und analytische Qualitätssicherung - wie durch den Gebrauch von zertifizierten Standards - könnten zu zuverlässigeren analytischen Resultaten führen und damit die Gefahr des Verzehrs von kontaminierter Nahrung verringern.

Ziel eines von der Europäischen Kommission finanzierten Projektes (Proj. N° GRD1-2002-70018, DONCalibrant, koordiniert durch das IFA-Tulln) ist es daher, Möglichkeiten aufzuzeigen, wie entsprechende Referenzmaterialien produziert und zertifiziert werden können.

Zertifizierte Referenzmaterialien (CRMs) sind erforderlich, um die Vergleichbarkeit und die Rückführbarkeit von Messwerten analytischer Labors sicherzustellen. Der Gebrauch von zertifizierten Standards wäre dabei ein wichtiges Element im Qualitätssicherungssystem jener Labors die B-Trichothecene analysieren. Systematische Fehler die aus Kalibrierung mit falschen Standards resultieren, könnten in der Zukunft durch eine regelmäßige Überprüfung mittels der zertifizierten Referenzmaterialien vermieden werden. Folglich forciert das Europäisches Komitee für Normung, Arbeitsgruppe für Mykotoxine (CEN/TC 275/WG5) der europäischen Union die Bemühungen bezüglich deren Produktion [1].

Das Projekt führt zu umfassenden Informationen über Produktion, Transport und Lagerungsbedingungen, zu zuverlässigen molaren Absorptionskoeffizienten der B-Trichothecene sowie zu Empfehlungen bezüglich der Beschaffenheit von zukünftigen CRMs. Durch die große Anzahl von nationalen und internationalen Kontakten der Hauptpartner zu Labors die auf dem Gebiet der Mykotoxinanalyse arbeiten wird ein hohes Niveau an Verbreitung und Kommunikation gewährleistet. Zudem ist, wegen des Interesses der Nahrungsmittel- und Futtermittelfirmen das Gesundheitsrisiko für Verbraucher zu verringern, mit einer großen Nachfrage nach diesen zukünftigen CRM's zu rechnen.

Autoren: Elisabeth DRS, Alexandra PARICH, R. KRSKA, Analytikzentrum, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie (IFA-Tulln), Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Str. 20, 3430 Tulln; H. PETTERSSON, SLU Sveriges Lantbruksuniversitet SE; R. JOSEPHS, T. LINSINGER, IRMM European Commission - Joint Research Centre Institute for Reference Materials and Measurements), Geel BE; D. CHAN, P. BRERETON, CSL (Central Science Laboratory), York UK; R. SCHOTHORST, H. van EGMOND, RIVM (National Institute of Public Health and the Environment), Bilthoven NL

Beschreibung der Arbeitsschritte

Die Tabelle 1 veranschaulicht die 7 innerhalb des Projekts (2003-2004) durchzuführenden Arbeitsschritte. Im ersten Jahr des Projektes sollte eine ausreichende Menge an festen B-Trichothecenen (100 mg pro Mykotoxin) mit hohen Reinheitsgrad produziert werden. Um Informationen über mögliche Verunreinigungen zu erhalten, wurden die so erhaltenen festen Mykotoxinstandards und das in weiterer Folge benutzte Acetonitril mittels unterschiedlicher sich ergänzender analytische Methoden auf ihre Identität und Quantität überprüft.

Danach wurden „common calibrant“ Losungen die jeweils DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON oder NIV enthalten sowie eine „common calibrant“ Lösung die eine Mischung diese Toxine enthält produziert. Diese „common calibrant“ Lösungen, die als Testreihe für zukünftige CRMs dienen, wurden auf ihre Homogenität und Stabilität geprüft. Zusätzlich wurden ihre molaren Absorptionskoeffizienten ermittelt und die Massenkonzentrationen dieser gravimetrisch vorbereiteten „common calibrant“ Lösungen wurden mittels individuell hergestellter Standards von unterschiedlichen Labors überprüft.

Im Zuge einer Vergleichstudie wurde die Verwendbarkeit der gravimetrisch vorbereiteten „common calibrant“ Lösungen untersucht. Die Implementierung des „traceability“ Konzeptes einschließlich die Berechnung der Messunsicherheiten durch alle betroffenen Labors stellt einen weiteren wichtigen Aspekt dieses Projekts dar.

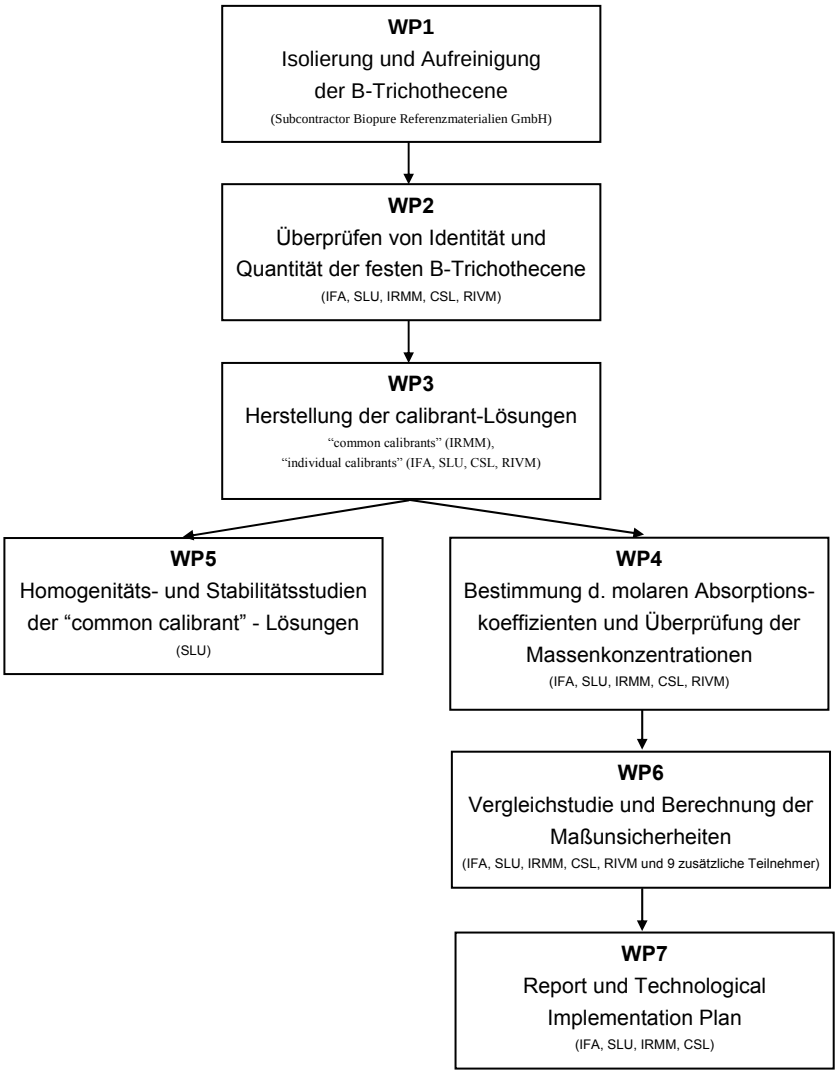


Abbildung 1: Überblick über die Projektziele für einen Zeitraum von 2 Jahren

Derzeitiger Projekt Stand und zukünftige Aufgaben

WP1 + WP2: Das Projekt hat bereits zu optimierten Parametern für die Isolierung und Aufreinigung von DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON und NIV aus Fusariumpilzkulturen geführt. Die Reinheitskontrolle ergab, dass die produzierten Standards im allgemeinen einen höheren Reinheitsgrad als kommerziell erbwerbliche Vergleichsprodukte aufwiesen [2, 3].

WP3: Am IRMM wurden je 500 Ampullen von „common calibrant" Lösungen die DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON oder NIV im Acetonitril als einzel Komponenten oder als Mischung von DON, 3-Ac-DON und NIV enthalten produziert (c=20 µg/ml jedes Mykotoxins). Für DON und NIV als mögliche zukünftige CRMs wurden zusätzliche 1000 Ampullen produziert.

WP4: Wegen der sehr niedrigen Gefahr von Inhomogenitäten in den „common calibrant" Lösungen wurde entschieden WP4 zu starten bevor die Resultate der Homogenitätsstudien vorlagen. Entsprechend einer ausführlichen Arbeitsanweisung wurden die molaren Absorptionskoeffizienten der „common calibrant" Lösungen mit einer Schlitzweite von 1 nm für UV-Scanning und die Messungen, Halbmikroküverten und Temperierung auf 25°C ermittelt. Die durchschnittlichen molaren Absorptionskoeffizienten betrugen 6805 ± 126, 6983 ± 141, 6935 ± 142 und 6955 ± 205 (mit Vertrauensbereich 95%) für DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON beziehungsweise NIV.

Die relative Standardabweichung der molaren Absorptionskoeffizienten für die vier Trichothecene reichte von 1,2 bis 1,9%.

Die Massenkonzentration der „common calibrant" Lösungen (DON, 3-Ac-DON und NIV) wurde mittels HPLC-UV überprüft. Dabei würden für die Kalibrierung (ungefähr 5 bis 50 mg/ml) Standardlösungen verwendet die in jedem Labor selbst produziert wurden.

Die Resultate sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Dabei betrugen die Abweichungen von der Zielkonzentration 1,97 bis 7,63%.

Trichothecene	Durchschnittliche Konzentration (ng/ml)	RSD (%)	Target (µg/ml)	*t* Wert (n=4)	t_{Krit} (0.05,	Prozentelle Abweichung
DON	20,34	1,77	19,72	3,42	3,18	3,14
3-AcDON	21,17	4,11	19,67	3,45	3,18	7,63
NIV	18,64	2,31	18,28	1,66	3,18	1,97

Table 2: Zusammenfassung der Ergebnisse der Massenkonzentrationsbestimmungen der „common calibrant" Lösungen mit HPLC-UV

WP5: Für jene „common calibrant" Lösungen für die 500 Ampullen produziert worden waren (3-Ac-DON, 15-Ac-DON und die DON+3-Ac-DON+NIV Mischung) wurden 15 zufällig ausgewählte Ampullen für die Homogenitätsstudie herangezogen, während von den DON und NIV „common calibrant" Lösungen 31 zufällig ausgewählte Ampullen analysiert wurden. Jene „common calibrant" Lösungen die nur ein Mykotoxin enthalten wurden mittels UV-Spektroskopie ausgetestet, während

jene die aus einer Mischung von Mykotoxinen bestehen mittels HPLC-UV überprüft wurden. Für die Stabilitätsstudie wurden weitere 4 Ampullen, bei jeweils -18°C, +4°C, +25°C oder +40°C gelagert. -30°C wurde als Bezugstemperatur verwendet. Für die Kurzzeitstabilitätsstudie wurden die Konzentrationen der „common calibrant" Lösungen nach Lagerzeiten von 0, wurden 1, 2 und 4 Wochen überprüft. Für eine langfristige Stabilitätsstudie werden Messungen mit HPLC-UV nach 0, 3, 6 und 12 Monaten herangezogen.

WP6: Da eine Kalibrierung mit allen „common calibrant" Lösungen als zu zeitaufwendig betrachtet wurde war 15-Ac-DON nicht in die Vergleichsstudie eingeschlossen und wurde nur von den Hauptpartnern miteinbezogen.
5 Kalibrierungen (Kalibrierungen mit 4 Punkten, je 1 Messungen) wurden mit einem von jedem Labor individuell hergestellten Mischstandard (DON+3-Ac-DON+NIV) sowie mit den 4 „common calibrant" Lösungen vorgenommen. Diese Kalibrierungen wurden verwendet, um 4 unbekannte Lösungen (= DON, 3-Ac-DON und NIV sowie eine Mischung aus DON+3-Ac-DON+NIV in Acetonitril) an zwei unterschiedlichen Tagen (2 Messungen pro Tag) quantitativ zu bestimmen.
Der Vergleich der Resultate von den Kalibrierungen mit den „common calibrant" Lösungen die einzelne Mykotoxine enthalten mit den Resultaten der Kalibrierungen mit den „common calibrant" Lösung die eine Mykotoxinmischung enthalten werden eine Empfehlungen ermöglichen, ob einzel Mykotoxinlösungen und/oder -mischungen für zukünftige zugelassene B-Trichothecen CRMs produziert werden sollen. Außerdem kann auch gezeigt werden, ob eine Zertitizierung auf der Basis einer Vergleichstudie durchführbar ist, oder ob eine Zertitizierung auf der Basis von gravimetrischen Daten empfohlen werden sollte. Die folgenden Techniken wurden von den 13 Teilnehmern eingesetzt: GC-MS (2), GC-ECD (2) und HPLC-UV (10). Die Auswertung der Daten wird innerhalb der nächsten Wochen abgeschlossen sein.

Referenzen:

[1] Draft Commission Recommendation of (… on the reduction of the presence of DON in cereals and cereal products). SANCO/1925/00-Rev.1. July 17, 2000, Brussels.
[2] A. Parich, H. Pettersson, R. D. Josephs, H. P. van Egmond, R. Schothorst, P. Brereton, D. Chan, R. Krska DON Calibrant: "Towards the production of certified B-trichothecene calibrants" Mycotoxin Research, Artikel eingereicht und akzeptiert
[3] Hedman R. et Pettersson H., 1996, "Purification and quantification of nivalenol", Mycotoxin Research, 12, 79

Danksagung:

Die Autoren möchten der Europäischen Kommission für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes Proj. (N° GRD1-2002-70018) danken.

Entwicklung von Mykotoxin Screening Methoden mittels Protein Microarrays

M. JANOTTA und R. KRSKA

Einleitung

In den letzten Jahren hat die Protein Microarray Technologie einen rasanten Aufschwung erlebt, weil unter anderem der expandierende Biotechnologiemarkt vermehrt auf miniaturisierte bioanalytische Methoden setzt, die neben einer großen Anzahl von Parallelanalysen zusätzlich eine Reduktion in Analysezeit und in Probenvolumen ermöglichen. Mit Hilfe von automatischen Array Printern können mehr als 10.000 Protein Spots auf Chipsubstraten erzeugt werden[1], und anschließend können die spezifischen Wechselwirkungen mit anderen Proteinsystemen detektiert werden. Die daraus resultierenden Anwendungen reichen von Proteom-Analyse, Medikamentenforschung, klinischer Diagnostik bis hin zur Miniaturisierung der bereits etablierten Immunoassay Tests und deren vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten[2]. Im Folgenden wird die Technologie der Protein Chips kurz dargestellt und über die ersten Resultate bezüglich der Entwicklung eines Mykotoxin Protein Chips berichtet, der in Parallelanalysen die Detektion mehrerer Mykotoxine simultan ermöglichen soll.

Prinzip der Protein Microarrays und miniaturisierten Immunoassays

Wie in Abbildung 1 ersichtlich kann die Produktion von Protein Microarrays in mehrere experimentelle Schritte unterteilt werden: (i) mittels manueller oder automatischer Microarray Spottern werden auf chemisch modifizierten Substraten Protein Spots (Durchmesser: ungefähr 100 - 500 µm) geprintet, (ii) ähnlich wie bei Immunoassays wird die restliche Substratoberfläche mit einem unspezifischen Albuminprotein abgeblockt, anschließend der Chip mit einem fluoreszenz-markierten Antigen oder Antikörper inkubiert, (iii) ein Fluoreszenz Microarray Scanner ermöglicht das laterale optische Auslesen der Wechselwirkungen und (iv) die Fluoreszenzsignale können schließlich mit Hilfe einer Software sowohl qualitative als auch quantitative ausgewertet werden. Da der hier beschriebene Protein Chip auf der Miniaturisierung eines Immunoassays basiert, kann jeglich+es Format einer ELISA Applikation angewendet werden, darunter fallen vor allem direkte Immunoassays, Sandwich Assays, oder kompetitive Assays. Dies hat zur Folge, dass für bestimmte experimentelle Anwendungen anstelle der Antikörper Mykotoxin Konjungate aufgespottet werden.

Autoren: Dr. Markus JANOTTA, Fachhochschule Wr. Neustadt für Wirtschaft und Technik, Standort Tulln, Konrad Lorenz Str. 10 A-3430 Tulln; Ao. Univ. Prof. Dr. Rudolf KRSKA, Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung, Interuniversitäres Department für Agrarbiotechnologie, IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur Wien, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln

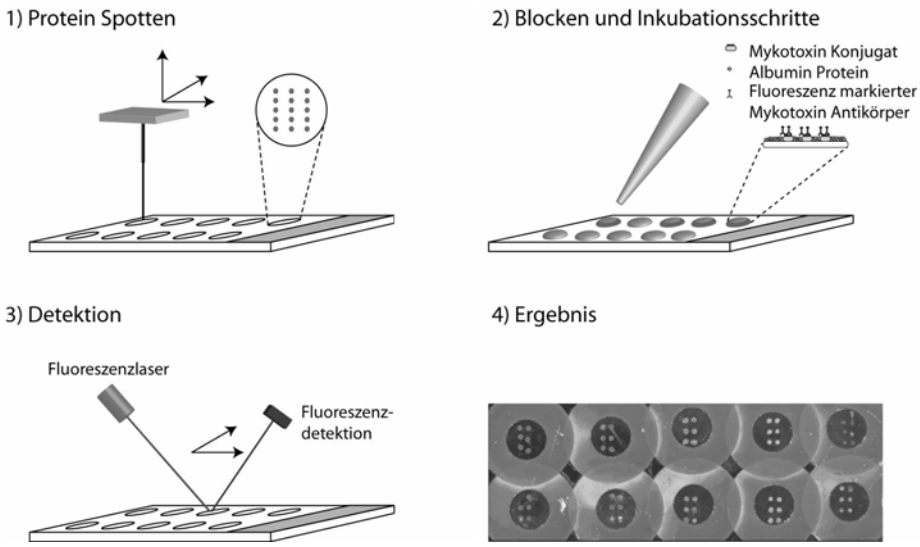


Abbildung 1: *Herstellungsschritte eines Mykotoxin Microarrays basierend auf dem Prinzip eines miniaturisierten direkten Fluoreszenz-Mykotoxinassays*

Durch den Einsatz von 10 kreisrunden Reaktionskammern auf einem Chip wird sowohl eine Reduktion der eingesetzten Flüssigkeitsvolumsmengen als auch eine Erhöhung der Anzahl an Parallelanalysen erzielt (siehe Abbildung 1; Ergebnis)

Als besonders geeignet hat sich folgender Ansatz für den Modelchip bezüglich Mykotoxin Detektion herausgestellt:

1. Spotten von Mykotoxin Trägerproteinen (Konzentration: 1-5 mg Mykotoxin Konjungat / ml Bufferlösung) auf Aldehyd modifizierte Slides (Inkubation in einer Feuchtigkeitskammer von mind. 1 Stunde).
2. Blocken mit einer 1% BSA Bicarbonat Bufferlösung (pH=9,5; Inkubation in einer Feuchtigkeitskammer über Nacht)
3. Die Mykotoxin spezifischen monoklonale Antikörper werden mittels Amin-reaktiven Farbstoffen (Alexa Fluor ® Farbstoffe) fluoreszenz-markiert.
4. Inkubation (mindestens 2 Stunden) mit einer der folgenden Lösungen:
   - Markierte monoklonale Mykotoxin Antikörper Lösungen in verschiedenen Konzentrationen (0,1 – 0,0001 mg/ml)
   - Markierte monoklonale Mykotoxin Antikörper Lösungen, die zusätzlich ungebundenes Mykotoxin enthalten (kompetitiver Ansatz)
5. Anwendung eines Waschprotokolls: Chip 10 min in 0,1% Tween/PBS Buffer Lösung und jeweils 30 sec in einer PBS Bufferlösung und destilliertem Wasser waschen
6. Fluoreszenzdetektion der Wechselwirkungen (Axon GenePix Personal 4100A Scanner)

Entwicklung eines Mykotoxin Protein Chips zur simultanen Detektion von Deoxynivalenol und Aflatoxin B1

Ein entscheidender Schritt in der Entwicklung und Produktion von Protein Chips ist sowohl die gleichmäßige Immobilisierung der Mykotoxin Konjungate auf der Chipoberfläche als auch die Qualität des Blocking Prozedur. Abbildung 2 stellt die Ergebnisse (a) der unterschiedlichen Haftung der gespotteten Konjungate mittels Detektion der Ankoppelung von fluoreszenz-markierten Antikörpern und (b) der Optimierung des Blockingschrittes dar.

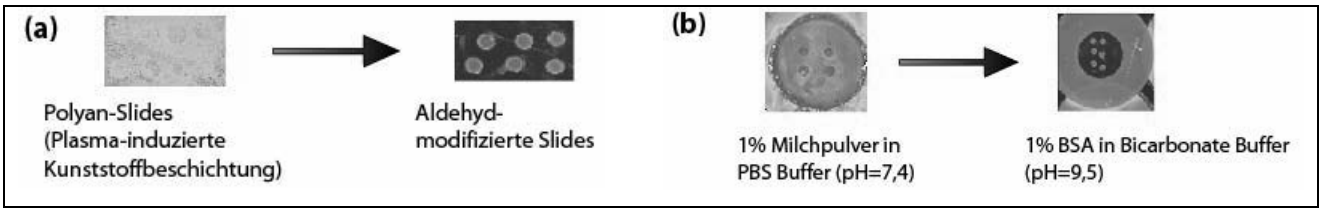


Abbildung 2: *Optimierung der Immobilisierungs- und Blocking Protokolle*

Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass die Spotform und Stärke der Ankoppelung von zusätzlichen Faktoren wie verwendete Bufferlösungen, Art des Waschprotokolls und Typ des eingesetzten Antikörpers abhängt. Nichtsdestotrotz zeigen Aldehyd-modifzierte Objektträger aufgrund der Anbindung der Proteine über eine Schiff'sche Basen Reaktion sehr gute Immobilisierungseigenschaften. Des Weiteren ist ersichtlich, dass sowohl Art des eingesetzten Blocking Proteins als auch der pH-Wert der Bufferlösung entscheidend dazu beitragen, damit die markierten Antikörper nur an die aufgetragenen Spots bindet. Dadurch kann die Fluoreszenzintensität des Hintergrundes entscheidend minimiert und infolgedessen ein besseres Signal-Rausch Verhältnis erzielt werden kann.

Im Folgenden wurden Experimente auf einem Protein Chip durchgeführt, die die gleichzeitige Detektion von Deoxynivalenol und Aflatoxin B1 zum Ziel haben. Dazu wurden sowohl DON- als Aflatoxin-Konjungate auf einem Chip gespottet, die Oberfläche abgeblockt und anschließend mit den zugehörigen Antikörpern (DON-AK und Afla-AK in verschiedenen Verdünnungen) inkubiert. In einigen Reaktionskammern wurde zusätzlich ungebundenes Mykotoxin zugesetzt um einen kompetitiven Immunoassay zu simulieren. Der fluoreszenz-markierte Antikörper kann nun sowohl an das gespottete Mykotoxin Konjungat als auch an das ungebundene Mykotoxin binden, was bei ansteigender Konzentration des ungebundenen Mykotoxin zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität führt.

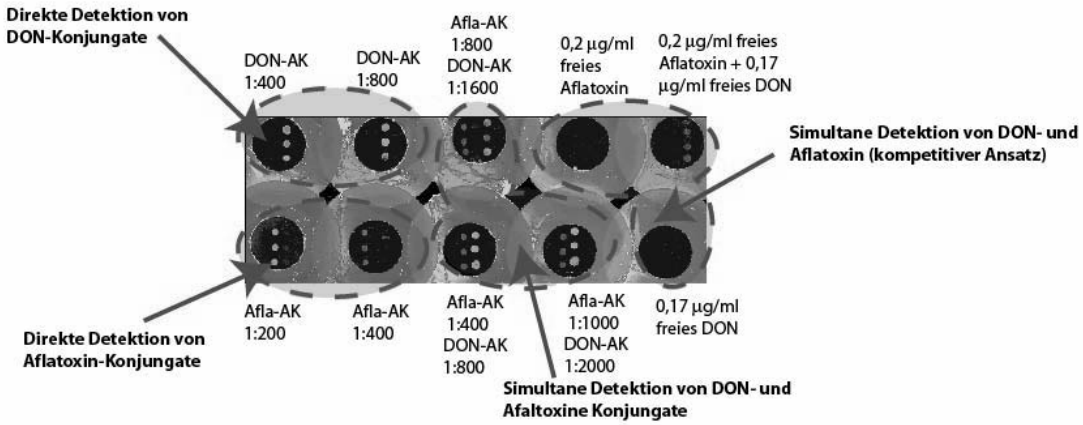


Abbildung 3: *Protein Chip mit 10 Reaktionskammern, in jeder Kammer sind 6 Spots der Mykotoxin-Konjungate aufgetragen.*

Die Ergebnisse in Abbildung 3 zeigen deutlich, dass sowohl die direkte als auch simultane Detektion der gespotteten Mykotoxin Konjungate mit DON und Aflatoxin monoklonalen Antikörpern möglich ist (ersten sieben Reaktionskammern; von links nach rechts). Außerdem weist die Reduktion bzw. die gänzliche Abnahme des Fluoreszenzsignales in den letzten drei Reaktionskammern auf die Anwesenheit von ungebundenem Mykotoxin hin. Jedoch zeigen die Resultate noch relativ geringe Wiederholbarkeit, da gleiche Konzentrationen von ungebundenem Mykotoxin zu unterschiedlichem Fluoreszenzintensitäten führen. Grund dieser Schwankungen kann die zurzeit manuelle Spotting Methode sein.

Ausblick

Die präsentierten Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Detektion von verschiedenen Mykotoxinen mittels der Microarray Technologie möglich ist. Obwohl das Prinzip nur anhand der Bestimmung von 2 Analyten dargestellt wurde, ist die Erweiterung dieser Methode für zusätzliche Mykotoxine vor allem eine Frage der Verfügbarkeit und Qualität der eingesetzten Antikörper. Gegenwärtig wird an der simultanen Detektion von Deoxynivalenol, Aflatoxin B1 und Zearalanone gearbeitet. Außerdem wird die Anschaffung eines automatischen Microarray Printers die Reproduzierbarkeit der Immobilisierungsreaktion der Mykotoxin Konjungate an die Chipoberfläche und somit auch die Wiederholbarkeit der gesamten Methode erhöhen.

Literatur

1 G. MacBeath, S.L. Schreiber, *Science*, 289, 1760-1763, 2000

2 R. Krska, M. Janotta, Anal. Bioanal. Chem., 379, 338-340, 2004

Analytische Charakterisierung von Abbauprodukten von FB1 mittels LC-MS/MS

E. VEKIRU, M. TAEUBEL, R. SCHUHMACHER, G. SCHATZMAYR,
E.M. BINDER und R. KRSKA

Einleitung:

Fumonisine (B1, B2, B3) sind toxische Stoffwechselprodukte von *Fusarien*, wobei *Fusarium moniliforme* und *F. proliferatum* die Hauptproduzenten sind. Fumonisin B1 (FB1) wurde 1988 in Südafrika entdeckt. Es kommt vorwiegend in Mais und Mais-Produkten vor, aber auch in anderen Lebensmitteln, wie Getreide und Bier.

FB1 wird als das giftigste Toxin innerhalb der Gruppe der Fumonisine angesehen. Es kann Leukoencephalomalazie (LEM) in Pferden, Lungenödeme in Schweinen und Leberkrebs in Ratten verursachen. Für den Menschen ist es karzinogen, da es als Auslöser von Speiseröhrenkrebs angesehen wird. Als Grund für diese negativen Auswirkungen wird die Inhibierung der Sphingolipidsynthese vermutet, welche auf der strukturellen Ähnlichkeit von FB1 zu Sphingosin beruht.

Die Dekontamination von Lebens- und Futtermitteln durch ausgesuchte mykotoxinabbauende bzw. mykotoxinumwandelnde Mikroorganismen hat viele Vorteile. Das Toxin kann auf schonende Art und Weise, ohne Anwendung von eventuell schädlichen Lösungsmitteln und ohne Verlust des ernährungsphysiologischen Wertes und der technologischen Eigenschaften von Lebens-mitteln und Futtermitteln entfernt werden.

Durch Hydrolyse unter alkalischen Bedingungen wie auch durch mikrobiologische Metabolisierung kann aus FB1 hydrolysiertes FB1 (HFB1) gebildet werden. HFB1 ist genau so toxisch wie das ursprüngliche Toxin FB1. Das häufige Vorkommen und die toxische Wirkung von FB1 und HFB1 unterstreichen die Wichtigkeit der Entwicklung einer Methode zur Inaktivierung dieser Toxine. Biomin sucht eine neue technische Applikation zur Detoxifizierung von FB1 und HFB1. Zu diesem Zweck wird nach einem neuen Mikroorganismus mit dieser Fähigkeit geforscht.

1998 haben Duvick *et al*. [1] die Hefe *Exophiala spinifera*, mit der Fähigkeit FB1 zu detoxifizieren, isoliert und ein Jahr später beschrieben Blackwell *et al*. [2] den Abbauweg von FB1 (Abbildung 1).

Ziel der vorliegenden Versuche war es, den von Blackwell *et al*. [2] beschriebenen Metabolisierungsweg von FB1 via LC-MS/MS nachzuvollziehen und die dadurch gewonnene Erfahrung und das erlangte Know-how, für die Untersuchung von FB1-und HFB1-Metabolisierungsprodukten anderer FB1- und HFB1-abbauender Mikroorganismen einzusetzen.

Autoren: DI Vekiru Elisavet, Univ. Ass. Dr. Rainer SCHUHMACHER und Ao. Univ. Prof. Dr. Rudolf KRSKA, Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung, Department IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln
Mag. Martin Taeubel, Dr. Gerd Schatzmayr und Dr. Eva Maria Binder, Biomin GmbH, Industrie Strasse 21, A-3130 Herzogenburg, Austria, http://www.biomin.net

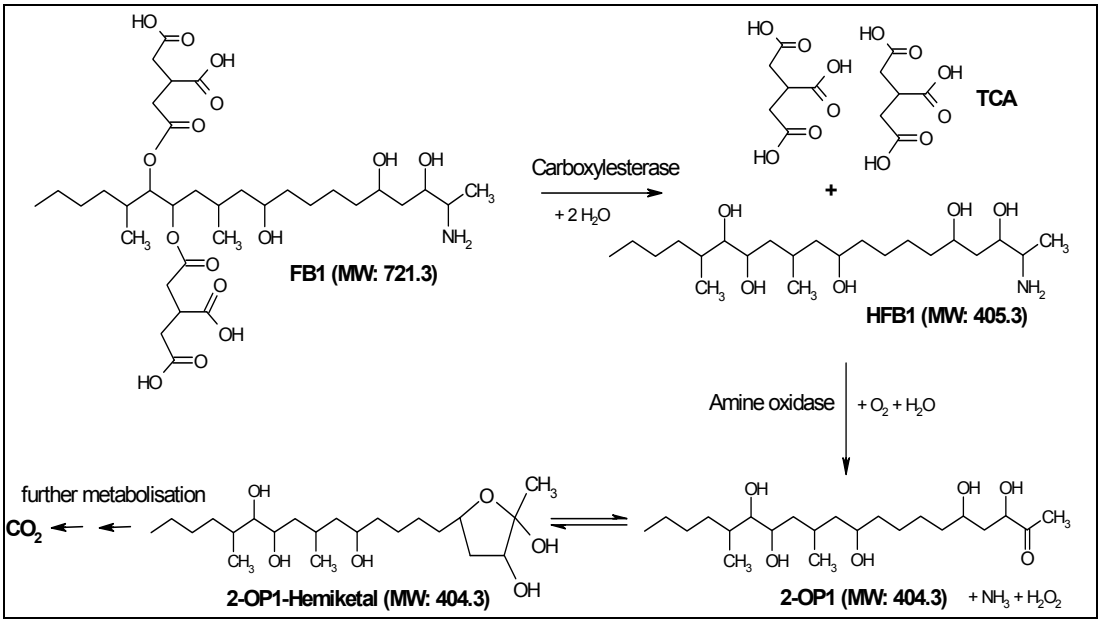


Abbildung 1: Metabolisierungsweg von FB1 durch *Exophiala spinifera* wie beschrieben von Blackwell *et al*. [2]. TCA: tricarballylic acid.

Material und Methoden:

- **Inkubationsexperimente mit der Hefe *Exophiala spinifera* DSM 1217:**

Die Hefezellen wurden in einem flüssigen Hefemedium unter induktiven Bedingungen (25mg/mL FB1) kultiviert. Der Abbauversuch wurde nach dem Ernten der Zellen in einer Minerallösung (MSL: 1 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 1 g/L K_2HPO_4, 1 g/L NaCl, 0.2 g/L $MgSO_4x7H_2O$) mit zugesetzten 25mg/mL reinem FB1 (Biopure Referenz-Substanzen GmbH) durchgeführt. Gleichzeitig wurde unter den gleichen Bedingungen ein zweiter Versuch gestartet mit dem einzigen Unterschied, dass dem Kultivierungsmedium kein FB1 zugesetzt wurde („Fermentations-Blank"). Die Inkubation der Proben wurde bei 25°C durchgeführt und nach Inkubationszeit von 0, 3, 6, 20, 24, 31, 52, 72 und 96 Stunden wurden von beiden Ansätzen Proben gezogen und durch kurzes Erhitzen bei 95°C inaktiviert. Durch Vergleich der Abbau-Proben mit den Proben aus dem Fermetations-Blank war es möglich zwischen neuen Matrixprodukten und FB1-Abbauprodukten zu unterscheiden.

- **Analytische Charakterisierung:**

Die hitzeinaktivierten Proben wurden bei –20°C bis zum Analysezeitpunkt aufbewahrt. Nach Zentrifugation zur Entfernung der Zellen von den Proben, erfolgte die Analyse dieser durch ein QTrap/LC/MS/MS System (Applied Biosystems, Foster City, USA), ausgestattet mit einer Turbo Ion Spray (ESI) Quelle und einem 1100 Series HPLC System (Agilent, Waldbronn, Germany).

Dieses System basiert auf ein Dreifach-Quadrupol-Massenspektrometer und bietet neben der Aufnahme von sogenannten Tandemmassenspektren (MS/MS) auch die Möglichkeit das dritte Quadrupol im „enhanced Modus" als Ionenfalle zu benutzen und dadurch eine verbesserte Sensitivität der Messungen zu erreichen.

Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer Zorbax XDB-C8 (4.6 mm x 150mm, 5µm; Agilent Technologies, USA) Säule unter Anwendung eines Gradienten von Methanol/Wasser und Zusatz von 50µL/L konzentrierter (98%) Ameisensäure.

Für die Identifizierung der Metaboliten wurden Fullscan-Spektren (EMS-Mode; enhanced mass scans) und MS/MS-Spektren (EPI-Mode; enhanced product ion scans) nach positiver und negativer Ionisierung aufgenommen.

Ergebnisse und Diskussion:

Mit Hilfe von LC-MS/MS zur Charakterisierung der Proben war es möglich die Transformation von FB1 über hydrolisiertes FB1 zu vollständig hydrolisiertem FB1 (durch Hydrolyse der Tricarbonsäureester-Einheiten) nachzuvollziehen. Die anschließende oxidative Deaminierung von HFB1 führte zu Bildung von 2-OP1 (2-oxo-12,16-dimethyl-3,5,10,14,15-icosanpentol), welches laut Blackwell *et.al.* [2] spontan zu dem entsprechenden Hemiketal umgesetzt wird. In den eigenen Versuchen wurde die Molmasse von 2-OP1 nur im negativen Modus durch Detektion des deprotonierten Molekülions $[M-H]^-$ (403.3 amu), bestätigt. Eine bevorzugte Ionisierung dieser Verbindung im negativen Modus ist eventuell durch das Fehlen der Aminogruppe, welche bekanntlich bei Fumonisinen im positiven Modus leicht protoniert werden kann, zu erklären.

Im positiven Modus konnten die Adduktionen mit den Signalen $[M+Na]^+$ (427.3 amu), $[M+Na-H_2O]^+$ (409.3 amu) und $[M+K]^+$ (443.3 amu) registriert werden. Ein Vergleich der +EPI Spektren von $[HFB1+H]^+$ (406.3 amu) und $[2\text{-}OP1\text{-}H_2O+H]^+$ (387.3 amu) zeigte bei beiden Spektren eine Reihe von m/z Signalen entsprechend nacheinander erfolgender Verluste von OH-Gruppen in Form von Wasserabspaltungen (-18 amu) (Abb. 2). Das gleiche Muster wurde auch in den +EPI Spektrum von $[2\text{-}OP1\text{-}2H_2O+H]^+$ (369.3 amu) beobachtet. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Blackwell *et.al.* [2] überein, wonach der Verlust von Wasser in der Hemiketal-Form von 2-OP1 ein sehr gewöhnlicher Vorgang ist, wodurch als Hauptpeak das Fragmention mit m/z 387 amu erscheint und nicht das Molekülion selbst.
Weiters wurde in den Proben die Bildung von N-acetyliertem FB1 und HFB1 beobachtet (Daten sind hier nicht gezeigt).

Die Detoxifizierung des FB1 in den abgebauten Proben wurde in einem Bioassay (OSTRACODTOXKIT F™, MicroBioTests Inc.) demonstriert. *Herterocypris incongruens*, eine Muschelkrebsspezies, zeigte ab einer Konzentration von 5 mg/L Sensitivität gegenüber FB1. Die Durchschnittliche Sterblichkeit (ausgedrückt in %) dieser Ostracoden in Anwesenheit von FB1 (Probe bei Inkubationszeit gleich Null Stunden) lag bei 100%. Im Gegensatz betrug diese in der Probe nach 96 Stunden Inkubationszeit und 98% FB1 Abbau, nur noch 28%. In einer Probe mit MSL und der Hefe *Exophiala spinifera* lag die Durchschnittliche Sterblichkeit bei 15%.

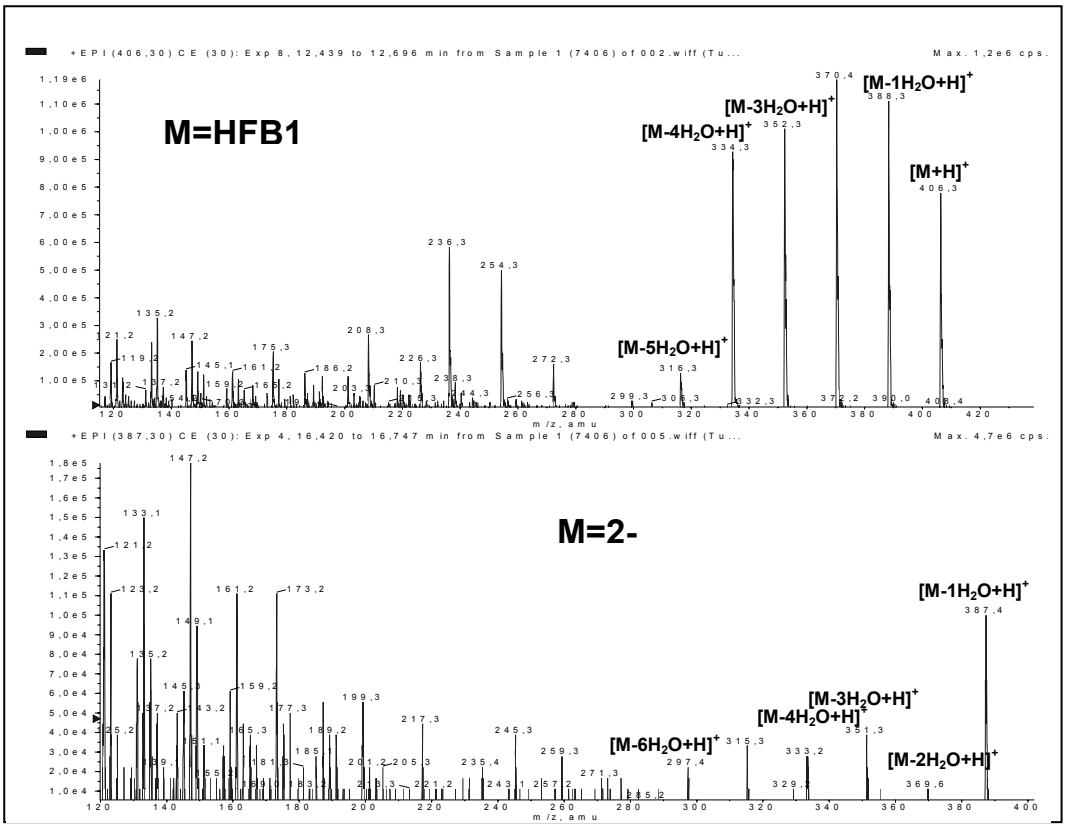


Abbildung 2: Vergleich der +EPI (MS/MS) Spektren von HFB1 und 2-OP1.

Zusammenfassung und Ausblick:

Der von Blackwell *et. al.* [2] postulierte Abbauweg von FB1 durch die Hefe *Exophiala spinifera* konnte nach eigenen Abbauversuchen mittels LC-MS/MS Messungen erfolgreich nachvollzogen werden. Die Ergebnisse dieser Messungen sollen in weiteren Versuchen durch komplementäre analytische Untersuchungen verifiziert werden. Diese erzielten Ergebnisse bilden eine solide Grundlage für die weitere Untersuchung von FB1 mit unterschiedlichen Fumonisin - abbauenden Mikroorganismen.

Danksagung:

Die Autoren bedanken sich bei der Christian Doppler Forschungsgesellschaft für die finanzielle Unterstützung.

Literatur:

[1] Duvick J., Rood T., Maddox J. & Gilliam J., 1998. Detoxification of mycotoxins in plants as a strategy for improving grain quality and disease resistance: identification of fumonisin-degrading microbes from maize. In: K. Kohmoto and O. Yoder (eds.): Molecular Genetics of Host-Specific Toxins in Plant Disease, vol., Kluwer Academic Publishers, 369-381.

[2] Blackwell B. A., Gilliam J. T., Savard M. E., Miller J. D. & Duvick J. P., 1999. Oxidative Deamination of Hydrolysed Fumonisin B1 (AP1) by Cultures of Exophiala Spinifera. Natural Toxins, 7, 31-38.

Zur GC-Trichothecenanalytik

Praktische Verbesserungen einer akkreditierten Methode

W. BRODACZ

Die Probenaufarbeitung einer GC-Methode gliedert sich in Extraktion, Clean up (MycoSep® 227) und Derivatisierung mit HFBI bzw. TRI-Sil TBT® für A- bzw. B-Trichothecene. Einige Aspekte der Detailverbesserungen der akkreditierten Methode sind exemplarisch dargestellt.

Extraktion und Silylierung

Die garantiert hohe Homogenität und der gut abgesicherte „wahre Wert" von zertifizierten Referenzmaterialien (CRM) erlauben einen zuverlässigen Vergleich von Extraktionsverfahren. So ist es z.B. üblich, Trichothecene mit Acetonitril/Wasser (84/16) am Horizontalschüttler zu extrahieren. Eine Versuchsserie mit CRM-378 (DON in Maismehl) sollte zeigen, ob die jeweilige zweistündige Durchmischung der 25 g Einwaage mit den 100 ml Extraktionsmittel am Magnetrührer höhere Extraktionsausbeuten im Vergleich zum Horizontalschüttler bringt.

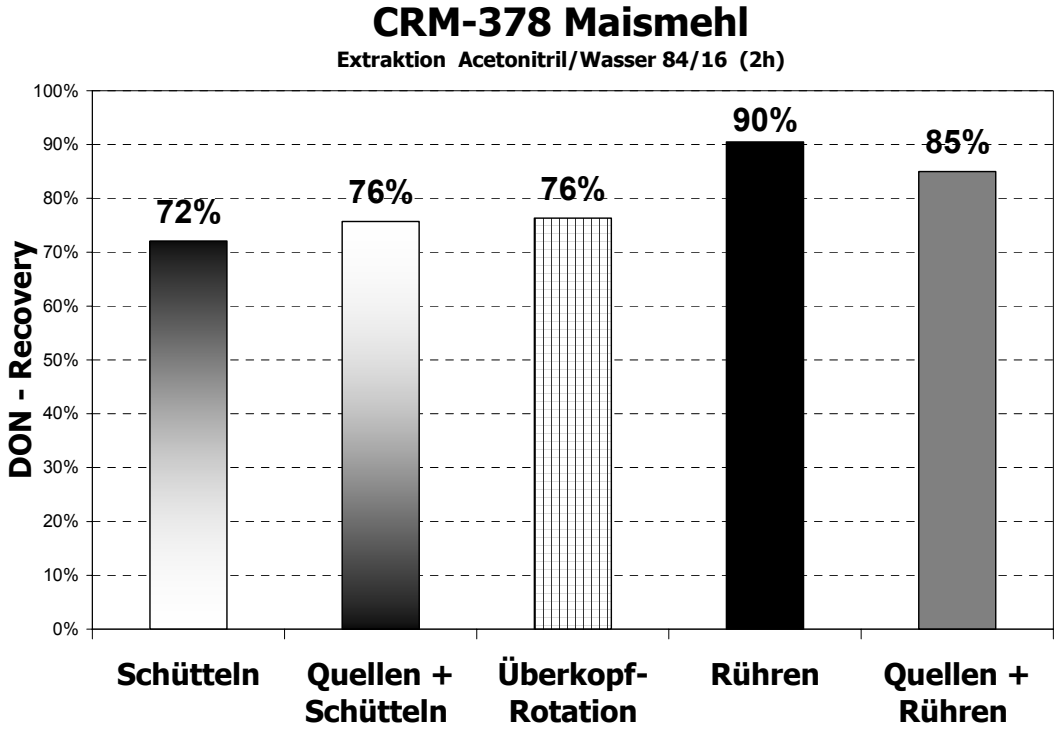


Abb. 1: Vergleich der Effizienz verschiedener Extraktionsverfahren anhand der Rückgewinnung von Deoxynivalenol aus zertifiziertem Referenzmaterial.

Autoren: Dipl.-HTL-Ing. Wolfgang BRODACZ, Kompetenzzentrum „Cluster Chemie Linz"; Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Wieningerstraße 8, A-4021 Linz

Beide Varianten wurden noch mit und ohne vorheriges Quellen im Lösungsmittel (über Nacht) durchgeführt. Auch die aufwendigere Überkopfrotation wurde in den Vergleich miteinbezogen. Abb. 1 zeigt, dass das Horizontalschütteln mit und ohne Quellen, ebenso wie die Überkopfrotation, der Rührtechnik unterlegen ist. Das Quellen über Nacht trägt nicht zur Verbesserung der Ausbeuten bei.

Durch die intensive Durchmischung am Magnetrührer konnten 90% des zertifizierten DON-Gehaltes extrahiert werden. Im Rahmen der umfangreichen Methodenvalidierung wurden bei Mais (n=16) durchschnittlich 95% und bei Weizen (n=16) im Schnitt 100% der zugesetzten DON-Masse wieder gefunden. Dabei wurden allerdings toxinfreie Matrizes künstlich dotiert (Spike-Problematik). Die Differenz zur 90%-Rückgewinnung beim CRM scheint aus dem stärkeren Bindungsverhalten natürlicher Kontaminationen zu resultieren.

Zur Überprüfung der Robustheit der Silylierung hinsichtlich Derivatisierungsdauer wurde die Kontaktzeit mit jeweils 50µl Tri-Sil TBT® variiert. Im Bereich von 10 - 60 Minuten konnte kein Unterschied bei der Derivatisierungsausbeute festgestellt werden (Abb. 2).

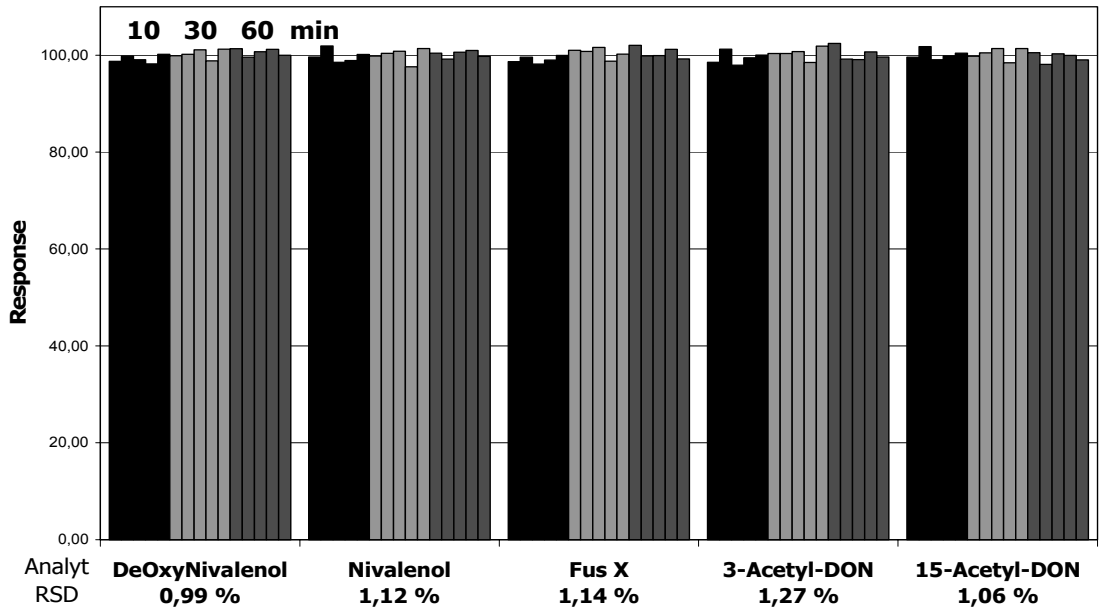


Abb. 2: Keine Abhängigkeit der Derivatisierungssausbeute von der Silylierungsdauer (10-30-60 Minuten). Der angeführte Variationskoeffizient bezieht sich auf alle 15 Derivatisierungen.

Gaschromatographie

Durch die Verwendung der GC-Referenzsubstanz Mirex wird mittels Retentionszeit-Feinanpassung die Peakerkennung wesentlich verbessert und das gesamte gaschromatographische System bei jedem einzelnen Lauf auf Reproduzierbarkeit überprüft. Der parallele Einsatz von zwei Kapillaren unterschiedlicher Säulenpolarität und computergestützt optimierter Trennparameter gewährleistet höchste Identifizierungssicherheit (1). Bei der

Trennungsoptimierung und insbesondere bei der Auswahl der am besten geeigneten Phasenkombination stand die vollständige Auftrennung aller Zielanalyten und möglichst unterschiedliche Elutionsmuster der beiden Säulen im Vordergrund. Nur mit zwei eigenständigen GC-Systemen kann kompromisslos das jeweils optimale Temperaturprogramm eingesetzt und voneinander unabhängige Säulendimensionen verwendet werden (Abb. 3 u. 4).

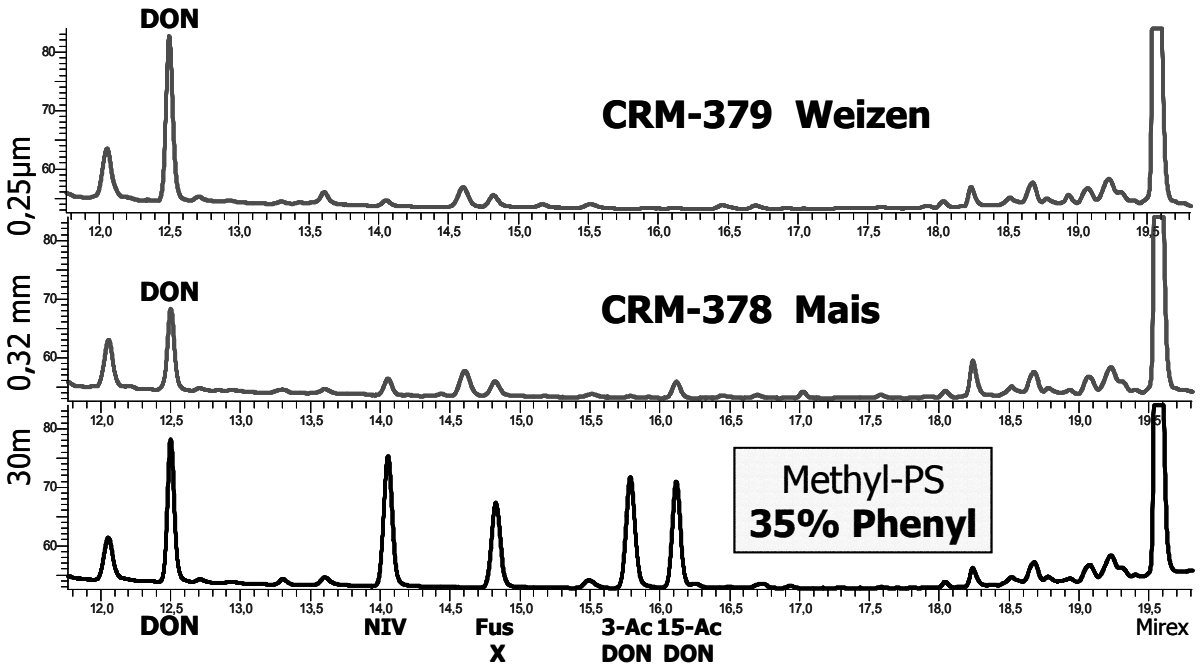


Abb. 3: ECD-Chromatogramme auf der polaren GC-Phase (Agilent DB-35ms)

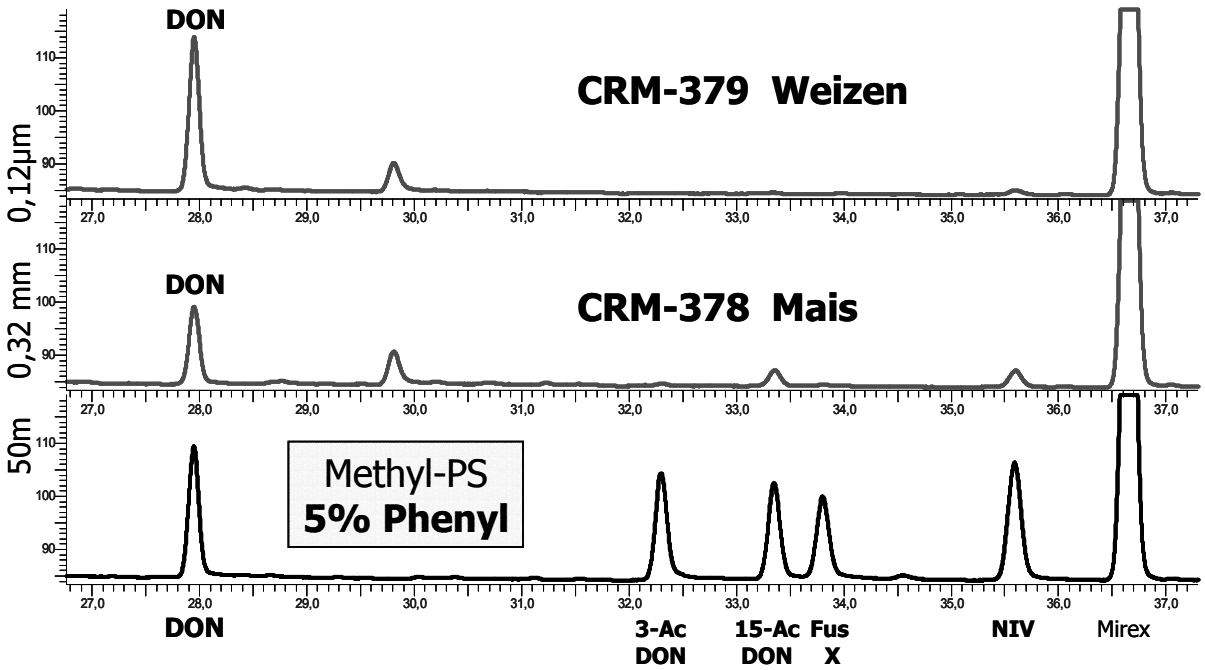


Abb. 4: ECD-Chromatogramme auf der unpolaren GC-Phase (MPS mit 5% Phenylanteil)

Zusätzlich wird auch eine wesentlich verbesserte u. abgesicherte Quantifizierung erzielt. Eventuell auftretende GC-Probleme können sofort erkannt werden. Bei erhöhtem Absicherungsbedarf (extrem hohe bzw. rechtsrelevante Belastungen etc.) werden die Ergebnisse durch GC/MS (Scan od. „Selected Ion Monitoring“) verifiziert.

Zur Vermeidung des sog. „Matrix Induced Response Enhancement“ (2) sind möglichst inerte Oberflächen im Injektor notwendig. Deshalb sollten metallische Kontaktflächen soweit als möglich minimiert werden („Single Tapered“ Liner) u./od. zumindest vergoldet sein („Gold Plated Seal“). Die Verwendung silanisierter Glaswolle u. hochinerter Kapillaren, sowie die Steigerung des Injektionsvolumens auf 3µl tragen ebenfalls zur Reduktion des Matrixeffekts bei. Darüber hinaus hat sich zu Beginn jeder Sequenz die „Konditionierung“ des Systems mit gebrauchten Standards bewährt (schnelles Temperaturprogramm). Eine Response-Trendkontrolle erfolgt durch Reinjektion der aktuellen Kalibrierstandards (vom Sequenzbeginn) am Ende der Sequenz.

Validierung und zertifizierte Referenzmaterialien

Die Validierung der 5 B-Trichothecene wurde unter praxisgerecht variierenden Bedingungen („worst case“) mit 32 Vollanalysen durchgeführt. Vier Personen haben abwechselnd an 8 Tagen 2 Lebensmittel (Weizengries) u. 2 Futtermittel (Mais) mit unterschiedlichen Konzentrationsniveaus aufgearbeitet. Jeweils parallel dazu wurden für jede Sequenz eigene Kalibrierstandards derivatisiert, sodass die Gesamtauswertung auf 8 verschiedenen Kalibrierungen beruht. Ein wichtiges Standbein der analytischen Qualitätssicherung ist die regelmäßige Verwendung von zertifizierten Referenzmaterialien. CRMs haben den Vorteil, dass neben dem gesamten Prüfverfahren auch die aktuellen Kalibrierstandards kontrolliert werden. Bei Übereinstimmung der Ergebnisse mit dem zertifizierten Gehaltsbereich wird das Gesamtsystem bestätigt. In Abb. 3 und 4 sind die Chromatogramme der derzeit für Trichothecene verfügbaren CRMs (CRM-378: Mais mit 0.43mg DON /kg und CRM-379: Weizen mit 0.67mg DON /kg) im Vergleich zum Kalibrierstandard der silylierten B-Trichothecene dargestellt. Zur Verifizierung aller Ergebnisse werden grundsätzlich zwei unterschiedliche polare Kapillarsäulen eingesetzt.

Rückgewinnungen	Weizen n=16	Mais n=16	**MW n=32**
DeOxyNivalenol	95%	100%	**97%**
Nivalenol	68%	64%	**66%**
3-Acetyl-DON	100%	106%	**103%**
15-Acetyl-DON	108%	106%	**107%**
Fus X	101%	104%	**102%**

Literatur:

(1) Brodacz W., „Entwicklung optimierter GC-Trennungen in der Mykotoxinanalytik“
LaborPraxis LP 6, S 26 – 28; Juni 2004

(2) Pettersson H., Langseth W. “Intercomparison of Trichothecene Analysis and Feasibility to Produce Certified Calibrants and Reference Material - Method Studies”, European Commission EUR20285/1 EN, BCR Information, 2002

Influence of Deoxynivalenol on the Electrical Properties of the Intestinal Mucosa of Chicken and its Effect on Luminal Glucose Transport

Wageha AWAD, J. BÖHM, E. RAZZAZI-FAZELI, J. ZENTEK

Abstract

An experiment was conducted to study the effects of diets contaminated with deoxynivalenol (DON) on the electrophysiological parameters of the gut. The control group was fed diets without addition of DON. The DON group of broilers was fed diets with 10 mg/kg DON. The diets were provided ad libitum for a period of 6 weeks. The effect of DON on the electrophysiological parameters of the jejunum was studied in vitro using isolated gut mucosa in Ussing chambers. At the end of the feeding period, 7 birds from each group were killed and the basal and glucose stimulated transmural potential difference (PD), short-circuit current (Isc), and electrical resistance (R) were measured in the isolated gut mucosa. The transmural PD did not differ ($P > 0.05$) between the groups. The tissue resistance was higher ($P < 0.1$) in birds receiving DON compared to controls. The addition of D-glucose on the luminal side of the isolated mucosa increased ($P < 0.05$) Isc in the control while it decreased ($P < 0.05$) in the DON group indicating that the glucose induced Isc was altered by DON. It can be concluded that 10 mg/kg DON in the diet impaired the Na+-D-glucose co-transport in the jejunum of broilers. Without impairing the performance, DON appeared to alter the gut function of broilers.

Introduction

Deoxynivalenol (DON) is common in European cereal grains, and of a trichothecenes, poses the greatest problems to animal health. Toxic effects of DON on animals have been well documented and concern mainly the immune system and the gastrointestinal tract (Rotter et al., 1996).

In general, poultry have a tolerant nature to the presence of dietary DON, and in fact appear to prefer feeds containing low concentrations (1-5 ppm) of the toxin (Hamilton et al.,1985). Reasons for poultry´s tolerance to trichothecenes probably include poor toxin bioavailability and rapid clearance from the body. It is possible, however, that DON undergoes more extensive absorption from Gasterointestinal tract, but highly efficient hepatic or renal first-pass effect removes the toxines before it reaches the systemic blood circulation and metabolism/elimination pathways.

There is a little information available regarding the effects of DON on gut physiology and the electrical properties of the intestine of the chicken. A study carried out by Grubb et al. (1987)

Autoren: Dr. Wageha AWAD, Univ. Prof. Ing. Dr. Josef BÖHM, Univ. Prof. Dr. Ebrahim RAZZAZI-FAZELI und J. ZENTEK, Institute of Nutrition, Department of Veterinary Public Health and Food Science, University of Veterinary Medicine, Veterinärplatz 1, A-1210 Vienna, Austria

showed that the avian intestine has a regional electrical profile different from that of mammals. Powell (1987) found in the chicken, the region with the highest electrical resistance is the duodenum, whereas in the rat and the rabbit the region of highest resistance is the colon.

The Ussing chamber is used for electrophysiological studies of all epithelial tissues (Kosik-Bogacka et al., 2002). Transepithelial electrical potential (PD), short circuit current (Isc) are induced as a result of the absorption of sodium and the secretion of chloride ions (Boucher, 1994).

A study carried out by Amat et al. (1999) showed that the addition of 5 mmol/l D-glucose on the mucosal side produced an increase in Isc in different parts of small and large intestines of chickens relative to basal values. Lerner et al. (1976), in studies comparing the jejunum and the ileum of chicken, demonstrated that the jejunum is characterized by relatively higher transport rates of several nutrients.

DON reduced ($P < 0.05$) the intestinal absorption of D-glucose in mice (Hunder et al., 1991). DON selectively modulated the activities of intestinal transporters. The D-glucose/ D-galactose sodium-dependent transporter (SGLT1) was strongly inhibited by DON (50 % inhibition at 10 µmol/l). On the other hand, passive transporters of D-glucose (GLUT) were only slightly inhibited by DON (15 % inhibition at 1 µmol /l), (Maresca et al., 2002).

The objective of the present study was to investigate the influence of 10 mg/kg DON on the electrical properties of isolated jejunum mucosa. The electrogenic effect of adding D-glucose on the intestinal mucosal side, as an indicator of nutrient-stimulated Na^+ absorption across apical Na^+-D-glucose co-transporter, was also investigated.

Materials and methods

One hundred and eighty six, 1-d-old broiler chicks were divided into two groups [control group (n= 91), DON group (n= 95)]. The chicks were fed the starter diets from days 1–13 and the grower diets from day 14–42. At the end of experiment, seven birds of each group were kept after the growth trial (42 days) for the in vitro experiments. The electrophysiological parameters of the jejunum was studied in vitro using isolated gut mucosa in Ussing chambers. Independent samples t-test was used for groups comparisons.

Results

For the control group, the DON group, the PD's were ($P > 0.05$) -7 ± 3.22 mV and-12 ± 3.32 mV, respectively. The tissue resistance was higher ($P < 0.1$)for the DON group (406 ± 13.51 $\Omega.cm^2$) compared to the controls (380 ± 26.7 $\Omega.cm^2$). The addition of 5 mmol/l D-glucose on the luminal side of the jejunum increased ($P < 0.05$) the Isc in the control group, reflecting a higher net flux of sodium from the mucosal to the serosal side compared to basal conditions, while this parameter decreased ($P < 0.05$) for the DON group. The increase of Isc (with a rise of $34\ \mu A/cm^2$) in the

control, this is equivalent to an increase of about two times that for the basal values. For the DON group; the Isc decreased by 7 μA/cm^2 relative to the basal values.

Table 1 The short-circuit current (Isc) in isolated mucosa of broilers after addition of D-glucose

Treatments	Control	DON	P
Basal Isc (μA/cm^2)	16 ± 7.56	33 ± 7.75	0.115
Isc 2 min after addition of glucose (μA/cm^2)	50^a ± 7.65	26^b ± 7.49	0.031
Isc 30 min after glucose addition (μA/cm^2)	18 ± 6.73	23 ± 6.48	0.599

Within the same row; means with no common superscript differ statistically
($P < 0.05$, independent samples t-test). Results are reported as means ± SEM

Discussion

The current study demonstrated clear effects of DON on intestinal physiology of broiler chickens. small and large intestines of birds are known to have high absorptive rates for water and electrolytes. The movement of ions responsible for the electrical current across the epithelium are mainly result of the absorption of Na^+ and the secretion of Cl^- (Grubb, 1991). The current induced by ion transport is recorded as changes in PD.

In this study, we measured the PD, Rt and Isc of all groups using the Ussing chambers. The PD was reduced in broilers that were fed the diet containing 10 mg/kg DON. This response could be attributed to the inhibitory effect of DON on Na^+-transport, a result of the effect of DON on sodium co-transporter (Maresca et al., 2002). This is similar to the effect of amiloride, an inhibitor of sodium ion transport (Kosik-Bogacka et al., 2003) which causes a decrease in PD. The tissue resistance was higher ($P < 0.1$) in the DON group compared to controls. This may be ascribed to a relatively tighter epithelium, with a lower paracellular permeability to ions (Amat et al., 1996).

Glucose like other nutrients is transported by carrier systems and they are usually co-transported with Na^+. The Na^+-coupled glucose uptake across SGLT1 is present in all regions of the small and large intestine of chicken (Ferrer et al., 1994). Maximal transport capacity values for D-glucose indicated that the jejunum is the segment that is most suited for Na^+ –mediated uptake (Amat et al., 1996).

In the present study, the addition of 5 mmol of glucose to the mucosal side icreased the Isc ($P < 0.05$), the increase in Isc after glucose addition to luminal side was due to a stimulation of transepithelial Na^+ transport. ON imparied the intestinal transfer and uptake of nutrients such as D-glucose (Hunder et al., 1991). In the present study, DON decreased ($P < 0.05$) the Isc after addition of D-glucose. The results confirm that DON decrease the absorption of glucose. This could be attributed to the effect of DON on D-glucose/sodium-dependent transporter (Maresca et al., 2002).

In conclusion, feeding DON contaminated diets at 10 mg/kg appears to have a specific effect by reducing nutrient absorption. Indeed this study revealed that DON impaired the intestinal transfer and uptake of D-glucose. DON alters gut function in broilers. DON decrease ($P < 0.05$) the Isc after the addition of glucose to the luminal side of jejunum. This would indicate that the glucose induced Isc was altered by DON.

References

AMAT, C., J. A. PIQUERAS, J. M. PlaNas, and M. MORET. 1999. Electrical properties of the intestinal mucosa of the chicken and the effects of luminal glucose. Poult. Sci. 78:1126–1131.

AMAT, C., J. M. PLANAS, and M. MORETO. 1996. Kinetics of hexose uptake by the small and large intestine of the chicken. Am. J. Physiol. R. 271:1085-1089.

BOUCHER R. C. 1994. Human airway ion transport. Part one. Amer. J. Respir. Crit. Care Med. 150:271–281.

FERRER, R., M. A. GIL, M. MORETO, M. OLIVERAS, and J. M. PLANAS. 1994. Hexose transport across the apical and basolateral membrane of enterocytes from different regions of the chicken intestine. Pfluegers Arch. 426:83–88.

GRUBB, B. R. 1991. Avian cecum: role of glucose and volatile fatty acids in transepithelial ion transport. Am. J. Physiol. G. 260:703–710.

GRUBB, B. R., S. M. DRISCOLL, and P. J. BENTLEY. 1987. Electrical PD, short-circuit current and fluxes of Na and Cl across avian intestine. J. Comp. Physiol. B 157:181–186.

HAMILTON, R. M. G., H. L. TRENHOLM, B. K. THOMPSON, and R. GREENHALGH. 1985. The tolerance of white Leghorn and broiler chicks, and turkey poults to diets that contained deoxynivalenol (vomitoxin)- contaminated wheat. Poult. Sci. 64:273– 286.

HUNDER, G., K. SCHUMANN, G. STRUGALA, J. GROPP, B. FICHTL, and W. FORTH. 1991. Influence of subchronic exposure to low dietary deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, on intestinal absorption of nutrients in mice. Food Chem. Toxic. 12:809–814.

KOSIK-BOGACKA D., B. BANACH, and T. TYRAKOWSKI. 2002. Effect of capsaicin on ion transport in caecum of rabbits. Pol. J. Pharmacol. 54:475–482.

KOSIK-BOGACKA D., B. BANACH, and T. TYRAKOWSKI. 2003. Effect of amiloride and bumetanide on ionic currents in the epithelium of caecum from starved rabbits. Pol. J. Pharmacol. 55:211–226.

LERNER, J., P. H. BURRILL, P. A. SATTELMEYER, and C. F JANICKI. 1976. Developmental patterns of intestinal transport mechanisms in the chick. Comp. Biochem. Physiol. 54A:109–111.

MARESCA, M., R. MAHFOUD, N. GARMY, and J. FANTINI. 2002. The mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells. J. Nutr. 132:2723–31.

POWELL, D. W. 1987. Intestinal water and electrolyte transport. Pages 1267–1305 in: Physiology of the Gastrointestinal Tract. L. R. Johnson, ed. Raven Press, New York, NY.

ROTTER B., D. B. PRELUSKY, and J. J. PESTKA. 1996. Toxicology of Deoxynivalenol (Vomitoxin). J. Toxicol. Environ. Health 48:1–34.

Entwicklung eines fluoreszenzbasierten Schnelltests zur Detektion von Deoxynivalenol

M. HAFNER, G. BUTTINGER, H. KNAPP, Elisabeth PICHLER,
M. FREUDENSCHUSS, Eva Maria BINDER und R. KRSKA

Einleitung:

In den letzten Jahren wurde die von Mykotoxinen ausgehende Gefahr für Nahrungs- und Futtermittel als immer bedeutsamer erkannt. Die Entdeckung von betroffenen Nahrungs- und Genussmitteln möglichst früh im Verarbeitungs- oder Transportprozess kann dazu betragen, das Risiko, dass kontaminiertes Material in die Nahrungskette gelangt, zu reduzieren. Immer mehr Mykotoxine werden regulatorisch erfasst und maximal tolerierbare Werte definiert (Usleber *et al*., 2004; FSA, 2004)

Die dabei anfallende hohe Probenanzahl erfordert exakte, schnelle und kostengünstige Testsysteme, die auch für unerfahrene Personen einfach zu bedienen sind. Darüber hinaus ist es in der Transportkette manchmal von entscheidender Bedeutung, dass ein Ergebnis nach wenigen Minuten vorliegt und dass eine Charge (z.B. Waggon, LKW) nach der anderen getestet werden kann.

Aufgabenstellung:

Die Entwicklung einer Testmethode für Deoxynivalenol (DON), welche diesen Anforderungen entspricht, ist die Aufgabenstellung dieser Arbeit im Christian-Doppler-Labor für Mykotoxinforschung am IFA Tulln.

Auswahl der Methode:

Als Detektionsmethode wurde Fluorometrie gewählt, weil bei dieser Methode der apparative Aufwand niedrig ist und geeignete Messgeräte vergleichsweise günstig sind. Weiters sind ihre Anforderungen an den Benutzer relativ gering, was bei den geplanten Anwendern - Personen mit wenig oder gar keiner Erfahrung in analytischer Chemie - von Vorteil ist.

Die Entscheidung für Fluoreszenzdetektion erfordert allerdings die Derivatisierung des DON-Moleküls, weil dieses selbst nicht fluoreszent ist. Die Nutzung der funktionellen Gruppen, welche im DON-Molekül vorhanden sind (Hydroxyl-, Epoxid- und Ketogruppen) ist durch das Zeitlimit von weniger als 15 Minuten pro Messung nicht möglich.

Aus diesem Grund wurde die zweistufige Nachsäulenderivatisierungsmethode, welche auf der Zersetzung von DON zu NorDON und Formaldehyd (Young JC *et al*. 1986) und der nachfolgenden

Autoren: Mag. Martin HAFNER, Hermann KNAPP und Ao. Univ. Prof. Rudolf KRSKA, Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung, Department IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln; Mag. Gerhard BUTTINGER, Dr. Elisabeth PICHLER und Dr. Eva Maria BINDER, RomerLabs Diagnostic GmbH, Industriestrasse 21, A-3130 Herzogenburg; Dr. Martin FREUDENSCHUSS, biopure Referenzsubstanzen GmbH, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln

Umsetzung des Formaldehyds mit Ammoniak und Methylacetoacetat beruht, als Ausgangspunkt gewählt (Sano *et al.*, 1987, Buttinger *et al*. 2003).

Vorteile	Nachteile
Bekannte Methode	Zweistufige Reaktion
Harmlose Reagenzien	Apparativer Aufwand groß
Unkomplizierte Methode	
Für Nichtchemiker anwendbar	
Summenbestimmung der Typ B-Trichothecene	

Tabelle 1: Vor- und Nachteile der gewählten Methode

Die Herausforderung bei der Weiterentwicklung dieser bereits publizierten Methode ist es, die Bedingungen der zweistufigen Reaktion so zu optimieren, dass reproduzierbare hohe Ausbeuten erhalten werden. Für dieses System sprechen die harmlosen und leicht zu entsorgenden Reagenzien und die einfache Handhabung.

Status:

Innerhalb kurzer Zeit konnte die Reaktion des entstehenden Formaldehyds mit Ammoniak und Methylacetoacetat, optimiert werden (basierend auf Sano et al, 1987 und Nash, T 1953). Die Zersetzung des DON-Moleküls wird noch hinsichtlich der Dauer und der benötigten Temperatur gemeinsam mit verschiedenen Varianten an Heiz- und Kühlgeräten untersucht. Diese Bedingungen sind von entscheidender Bedeutung für den Erfolg der Methode (Young, JC 1986).

Ausblick:

Nach erfolgter Optimierung ist eine ausführliche Validierung in den wichtigsten Matrices sowie eine Evaluierung der Methode nach ISO Guide 33 mit zertifiziertem Referenzmaterial geplant.

Danksagung:

Die Autoren bedanken sich bei der Christian-Doppler Forschungsgesellschaft und beim Kooperationspartner Romer Labs Diagnostic GmbH für die Unterstützung des Projekts.

Literatur:

Usleber, E; Curtui, V; Seidler, C; Schneider E *Proceedings of 'Mycotoxins and Pathogenic Mould in the Environment',* 28 – 30 Juni 2004, Bydgoszcz, Polen

Sano, A; Matsutani, S; Suzuki, M; Takitani, S. *Journal of Chromatography* **1987**, 410: 427- 36

Young, JC; Blackwell, BA; ApSimon JV *Tetrahedron Letters* **1986**, 27, 1019 – 22

Young, JC *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **1986**, 34 919 – 923

Buttinger, G; Krska, R. *Mycotoxin Research* **2003,** 19(2), 139-142

Nash, T *The Biochemical Journal* **1953**, 55; 416 – 21

Food Standards Agency (FSA) Mycotoxin Letter, 3 November 2004

Aktuelle Regulierungen und Richtwerte für Mykotoxine in Futtermitteln im internationalen Vergleich

H. WÜRZNER

Die Richtlinie der Europäischen Kommission über unerwünschte Stoffe in der Tierernährung 1999/29/EG wurde im Jahr 2002 durch die RL 2002/32/EG ersetzt. Diese wurde durch die RL 2003/100/EG vom 31.10.2003 geändert, welche mit November 2003 in Kraft trat.

In der geänderten RL 2003/100/EG wurden auch die Aflatoxin-Grenzwerte geändert. So wird bei den Alleinfuttermitteln nicht mehr nach Ausgangsprodukten (alle 0,05mg/kg außer Erdnüsse, Kokoskerne, Palmkerne, Baumwollsaat, Maiskörner usw. 0,02mg/kg) unterschieden, sondern es gibt nur mehr einen einzigen, für alle Ausgangserzeugnisse gültigen Grenzwert von 0,02mg/kg. Auch für Ergänzungsfuttermittel wurden die Grenzwerte auf 0,02mg/kg geändert.

Für andere Mykotoxine gibt es weiterhin keine Grenzwerte. Im koordinierten Kontrollprogramm für Tierernährung 2004 wird jedoch gefordert, die Schwerpunkte der Kontrollen neben anderen kritischen Parametern auch auf Aflatoxin, Ochratoxin, Zearalenon, Deoxynivalenol und die Fumonisine B_1, B_2 und B_3 als Gruppe zusammengefasst zu legen. Kontrollen sollen sowohl in Futtermittel-Ausgangserzeugnissen als auch in Mischfuttermitteln durchgeführt werden und die verwendete Analysenmethode und ihre Nachweisgrenzen sind anzugeben. Für DON, ZON, OTA und Fumonisine gibt es weiterhin nur Richtwerte in einzelnen EU-Ländern.

Tabelle 1: Regulierungen für DON in Futtermitteln im internationalen Vergleich

	DON						
	Ö	**D**	**N**	**NL**		**CH**	**USA**
Tierkategorie				AW	GW		
Schweine				0,80	1,00	1,00	5,00
Ferkel und junge Zuchtschweine							
Junge, weibliche Zuchtschweine	**0,50**	1,00	0,50				
Mastschweine und Zuchtsauen	**0,50**	1,00	0,50				
Rinder					5,00		10,00
Kälber und Jungrinder	**--**	2,00		1,60	2,00		
Kalbin und Milchvieh	**--**	5,00	1,50	2,40	3,00		
Mastrinder	**1,00**	5,00	1,50				
Geflügel		5,00		3,20	4,00		5,00
Legehennen, Puten	**1,00**		0,50				
Masthühner	**2,00**		1,50				
Pferde			0,50				5,00

Autor: Univ. Doz. Dr. Herbert WÜRZNER, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Institut für Futtermittel, Spargelfeldstraße 191, A-1226 Wien

Tabelle 2: Regulierungen für Zearalenon in Futtermitteln im internationalen Vergleich

	Zearalenon					
	Ö	**D**	**N**	**CH**	**NL**	
Tierkategorie					AW	GW
Schweine						
Ferkel und junge Zuchtschweine					0,08	0,10
Junge, weibliche Zuchtschweine	**0,05**	0,05		0,05	0,08	0,10
Mastschweine und Zuchtsauen	**0,15**	0,25	0,10	0,25	0,20	0,25
Rinder						
Kälber und Jungrinder		0,25			0,40	0,50
Kalbin und Milchvieh		0,50			0,40	0,50
Mastrinder		*				
Geflügel						
Legehennen, Puten		*				
Masthühner		*				

Die einzigen gesetzlichen Grenzwerte in der EU und somit auch in Österreich gibt es für Aflatoxin, die im Jahr 2003 mit der RL 2003/100/EG geändert wurden:

Alle Futtermittel-Ausgangserzeugnisse	0,02
Alleinfuttermittel für Rinder, Schafe und Ziegen, ausgenommen:	0,02
- Alleinfuttermittel für Milchvieh	0,005
- Alleinfuttermittel für Kälber und Lämmer	0,01
Alleinfuttermittel für Schweine und Geflügel (ausgenommen Jungtiere)	0,02
Andere Alleinfuttermittel	0,01
Ergänzungsfuttermittel für Rinder, Schafe und Ziegen (ausgenommen Ergänzungsfuttermittel für Milchvieh, Kälber und Lämmer)	0,02
Ergänzungsfuttermittel für Schweine und Geflügel (ausgenommen Jungtiere)	0,02
Andere Ergänzungsfuttermittel	0,005

Nach längerer Diskussion im Expertenausschuss für Unerwünschte Stoffe in Brüssel wurde im vergangenen Jahr ein **Entwurf** für Grenzwerte für Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) erstellt, der auf den Richtwerten in einigen Ländern aufbaut. Die Werte beziehen sich auf Allein- **und** Ergänzungsfuttermittel für, zumindest bei DON, alle Tierarten:

Futtermittel	ppm DON (88 % TS)
Allein- und Ergänzungsfutter für Schweine	**0,5**
Allein- und Ergänzungsfutter für Kälber (< 4 Monate), Lämmer, Kitze	**2,0**
Allein- und Ergänzungsfutter für Rinder (> 4 Monate), Schafe, Ziegen	**4,0** (2,0)
Allein- und Ergänzungsfutter für Geflügel	**4,0** (2,0)
Andere Allein- und Ergänzungsfuttermittel	**4,0**
Getreide und Getreidenebenprodukte für die Mischfutterherstellung	**7,0 - 8,0**

Futtermittel	ppm ZON (88 % TS)
Allein- und Ergänzungsfutter für Ferkel und Jungsauen	**0,05**
Allein- und Ergänzungsfutter für Sauen und Mastschweine	**0,25**
Allein- und Ergänzungsfutter für Schafe und Ziegen	**0,5**
Allein- und Ergänzungsfutter für Kälber und Milchkühe	**0,5**
Getreide und Getreidenebenprodukte für die Mischfutterherstellung	**1,0 - 2,0**
Andere Allein- und Ergänzungsfuttermittel	**kein Grenzwert nötig oder zuwenig Daten verfügbar**

Wie aus den obigen Tabellen ersichtlich, sind in diesem Entwurf auch Grenzwerte für Getreide und Getreidenebenprodukte enthalten. Zusätzlich wird in einer Fußnote vermerkt, dass bei direkter Verfütterung sowohl die angegebenen Werte, als auch in der täglichen Ration die Werte für DON und ZON im Alleinfuttermittel nicht überschritten werden dürfen, damit nicht hoch kontaminierte Produkte in die Futtermittelkette gelangen.

In der letzten Sitzung (2004) in Brüssel wurde angeregt, über Richtwerte für Sojaprodukte, Stroh, Heu, Gras und Silage (speziell Maissilage) nachzudenken, wobei sich die Frage erhob, ob eingestreutes Stroh als Futtermittel angesehen werden kann.

Die Empfehlung der Kommission für ein Koordiniertes Kontrollprogramm im Futtermittelbereich enthält auch für das nächste Jahr die Untersuchung von Futtermitteln auf folgende Mykotoxine:

- Aflatoxin B1
- Ochratoxin A
- Zearalenon
- Deoxynivalenol
- Fumonisin (B1, B2, B3 zusammen)

Dieser Empfehlung wird die Amtliche Futtermittelkontrolle wie bisher versuchen, nachzukommen.

Mittlerweile hat die EFSA (Europ. Agentur für Lebensmittelsicherheit) im Auftrag der Kommission Gutachten zu DON, ZON und Ochratoxin erstellt, die im Internet unter http://efsa.eu.int/science/feedap_opinions zu finden sind. Diese dienen als Grundlage für alle Diskussionen und Vorhaben in Brüssel.

Aktuelle und geplante gemeinschaftliche Regelungen bezüglich Mykotoxinen in Lebensmitteln

R. GROSSGUT

Im Zuge der nachfolgenden Darstellung sollen die aktuellen und vorgesehenen gemeinschaftlichen gesetzlichen Regelungen von den verschiedensten Mykotoxinen, wie Aflatoxine, Patulin, Ochratoxin A, Fusarientoxine (Deoxynivalenol, Zearalenon, T2- und HT-2-Toxin sowie Fumonisin B_1/B_2) zusammenfassend dargestellt werden. Da es sich um eine Bestandaufnahme zum Zeitpunkt des Mold-Meetings 2004 handelt, ist speziell bei den diskutierten Höchstgehalten und Lebensmitteln festzuhalten, dass im Jahr 2004/2005 noch über die Höhe diese Werte und Art der zu regelnden Lebensmitteln diskutiert werden wird. Die angeführten, bereits erlassenen Verordnungen, Richtlinien sowie Empfehlungen können im Internet über die Seite http://www.europa.eu.int/eur-lex/de/index.html heruntergeladen werden.

Mykotoxinregelungen in Lebensmitteln bis zum Moldmeeting 13.-14. November 2003

RICHTLINIE 98/53/EG DER KOMMISSION vom 16. Juli 1998 zur Festlegung von Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle bestimmter Lebensmittel auf Einhaltung der Höchstgehalte für Kontaminanten

In dieser Richtlinie werden im wesentlichen Probenahmeverfahren sowie Kriterien für Analysenmethoden bezüglich Aflatoxinen in Lebensmitteln geregelt.

VERORDNUNG (EG) Nr. 466/2001 DER KOMMISSION vom 8. März 2001 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln

Die Verordnung regelt Höchstgehalte von Aflatoxinen in Erdnüssen, Schalenfrüchten, getrockneten Früchten, Getreide und Milch.

VERORDNUNG (EG) Nr. 257/2002 DER KOMMISSION vom 12. Februar 2002 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 194/97 zur Festsetzung der zulässigen Höchstgehalte an Kontaminanten in Lebensmitteln sowie der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln

Die Verordnung regelt Höchstgehalte von Aflatoxinen in Erdnüssen, Schalenfrüchten, getrockneten Früchten und Getreide.

Autor: DI Dr. Roland GROSSGUT, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Risikobewertung, Spargelfeldstraße 191, A-1226 Wien

VERORDNUNG (EG) Nr. 472/2002 DER KOMMISSION vom 12. März 2002 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln

Die Verordnung regelt Höchstgehalte von Aflatoxinen in Gewürzen sowie Ochratoxin A in Getreide, Getreideerzeugnissen sowie getrockneten Weintrauben.

RICHTLINIE 2002/26/EG DER KOMMISSION vom 13. März 2002 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle der Ochratoxin A-Gehalte in Lebensmitteln

In dieser Richtlinie werden die Probenahmevorschriften sowie Kriterien für die Analytik für Die Kontrolle und Untersuchung auf Ochratoxin festgelegt.

RICHTLINIE 2002/27/EG DER KOMMISSION vom 13. März 2002 zur Änderung der Richtlinie 98/53/EG zur Festlegung von Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle bestimmter Lebensmittel auf Einhaltung der Höchstgehalte für Kontaminanten

Mit dieser Richtlinie werden die Probenahmevorschriften wegen der Regelung von Aflatoxinen in Gewürzen angepasst.

VERORDNUNG (EG) Nr. 1425/2003 DER KOMMISSION vom 11. August 2003 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 in Bezug auf Patulin

Mit dieser Regelung werden Höchstgehalte für das Mykotoxin Patulin geregelt.

Fruchtsäfte, insbesondere Apfelsaft, und Fruchtsaftzusätze in anderen Getränken einschließlich Fruchtnektar	50 µg/kg
Fruchtsaftkonzentrate nach Rekonstitution entsprechend den Herstellerangaben	50 µg/kg
Spirituosen, Apfelwein und andere aus Äpfeln gewonnene oder Apfelsaft enthaltende fermentierte Getränke	50 µg/kg
Feste, für den direkten Verzehr bestimmte Apfelerzeugnisse, einschließlich Apfelkompott, Apfelpüree	25 µg/kg
Apfelsaft sowie feste Apfelerzeugnisse, einschließlich Apfelkompott und Apfelpüree, für Säuglinge und Kleinkinder, die mit diesem Verwendungszweck gekennzeichnet und verkauft werden; andere Beikost	10 µg/kg *

* siehe Mykotoxinregelungen in Lebensmitteln seit dem Moldmeeting 13.-14. November 2003 (unten)

RICHTLINIE 2003/78/EG DER KOMMISSION vom 11. August 2003 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle des Patulingehalts von Lebensmitteln

Diese Richtlinie legt die Vorgaben für die Probenahme sowie Leistungskriterien für die analytische Untersuchung fest.

EMPFEHLUNG DER KOMMISSION vom 11. August 2003 zur Prävention und Reduzierung der Patulinkontamination von Apfelsaft und Apfelsaftzutaten in anderen Getränken

Diese Empfehlung wurde auf Ersuchen der in der Arbeitsgruppe „Agrarkontaminanten" vertretenen Mitgliedstaaten erarbeitet und enthält den „Verhaltenskodex zur Prävention und Reduzierung der Patulinkontamination in Apfelsaft und Apfelsaftzutaten in anderen Getränken" sowie das Ziel, letztlich einen Höchstgehalt von 25 µg Patulin/kg anzustreben.

Mykotoxinregelungen in Lebensmitteln seit dem Moldmeeting 13.-14. November 2003

VERORDNUNG (EG) Nr. 2174/2003 DER KOMMISSION vom 12. Dezember 2003 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 in Bezug auf Aflatoxin

Diese Verordnung betrifft die Adaptierung wegen Mais für zu verarbeitendem Mais, da der Höchstgehalt noch nicht festgesetzt war. Untersuchungen zeigten, dass der Aflatoxingehalt von nicht verarbeitetem Mais durch Sortieren und verschiedene physikalische Behandlungsverfahren nach der Reinigung im Endprodukt deutlich reduziert werden kann.

Der Höchstgehalt von Mais, der vor seinem Verzehr oder seiner Verwendung als Lebensmittelzutat einer Sortierung oder anderen physikalischen Verfahren unterzogen werden soll beträgt 5 µg/kg Aflatoxin B1 bzw. 10 µg/kg für die Summe aus den Aflatoxinen B1, B2, G1, G2.

RICHTLINIE 2003/121/EG DER KOMMISSION vom 15. Dezember 2003 zur Änderung der Richtlinie 98/53/EG der Kommission zur Festlegung von Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle bestimmter Lebensmittel auf Einhaltung der Höchstgehalte für Kontaminanten

Dies ist eine Anpassung des Probenahmeverfahrens und der Referenzanalysenmethode (Analysenkriterien) wegen obiger VO 2175/2003, welche zusätzliche Höchstgehalte in Mais regelt.

VERORDNUNG (EG) Nr. 455/2004 DER KOMMISSION vom 11. März 2004 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 in Bezug auf Patulin

Diese Verordnung fixiert nun den Höchstgehalt von 10 µg Patulin/kg in Apfelsaft sowie feste Apfelerzeugnisse, einschließlich Apfelkompott und Apfelpüree, für Säuglinge und Kleinkinder, die mit diesem Verwendungszweck gekennzeichnet und verkauft werden; andere Beikost aufgrund eines validiertes Analysenverfahrens (ausgetestet in einem Vergleichstest), das im Wesentlichen die Analysierbarkeit dieses Höchstgehaltes belegt hat.

VERORDNUNG (EG) Nr. 683/2004 DER KOMMISSION vom 13. April 2004 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 im Hinblick auf Aflatoxine und Ochratoxin A in Lebensmitteln für Säuglinge und Kleinkinder

In der Verordnung werden insbesondere die Höchstgehalte von Aflatoxinen sowie Ochratoxin°A in Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung geregelt.

Aflatoxine:

Erzeugnis	Höchstgehalt (µg/kg)			Probenahme-verfahren	Referenz-analyse-verfahren
	B1	B1 + B2 + G1 + G2	M1		
Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder	0.10	-	-	Richtlinie 98/53/EG	Richtlinie 98/53/EG
Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung, einschließlich Säuglingsmilchnahrung und Folgemilch	-	-	0.025	Richtlinie 98/53/EG	Richtlinie 98/53/EG
Diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die eigens für Säuglinge bestimmt sind	0.10	-	0.025	Richtlinie 98/53/EG	Richtlinie 98/53/EG

Ochratoxin A:

Erzeugnis	Höchstgehalt (µg/kg)	Probenahme-verfahren	Referenz-analyse-verfahren
Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder	0.50	Richtlinie 2002/26/EG	Richtlinie 2002/26/EG
Diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die eigens für Säuglinge bestimmt sind	0.50	Richtlinie 2002/26/EG	Richtlinie 2002/26/EG

RICHTLINIE 2004/43/EG DER KOMMISSION vom 13. April 2004 zur Änderung der Richtlinie 98/53/EG zur Festlegung von Probenahmeverfahren und Analysemethoden zur amtlichen Kontrolle der Gehalte an Aflatoxin und Ochratoxin A in Lebensmitteln für Säuglinge und Kleinkinder

Inhalt dieser Verordnung ist die Anpassung der Probenahmenverfahren und Analysenkriterien wegen der Regelungen obiger VERORDNUNG (EG) Nr. 683/2004.

Mykotoxinregelungen in Lebensmitteln in Vorbereitung

Fusarientoxine

Anlässlich der SCOOP-Arbeitsgruppe 3.2.10 “Collection of Occurrence data of Fusarium-toxin in Food and Assessment of the Dietary Intake by the Population of EU Member States” wurden europaweit Daten gesammelt und in einem Bericht zusammengefasst, der auch im Internet veröffentlicht ist: http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/index_en.html. Die Daten sind auch Basis für Höchstgehaltsüberlegungen der Mykotoxine Deoxynivalenol (DON), T-2 und HT-2-Toxin, Zearalenon sowie Fumonisin B_1 und B_2.

Die in den nachfolgenden Tabellen angeführten Werte entsprechen dem Stand Diskussionsstand November 2004.

Deoxynivalenol (DON)

Die täglich duldbare Aufnahmemenge für dieses Mykotoxin beträgt 1 µg/kg KG und Tag (SCF 2. Dezember 1999).

Erzeugnis	Höchstgehalt (µg/kg)	ab 1.7.2007, falls kein spezifischer Wert festgelegt wird
Rohgetreide außer Durum-Weizen, Hafer und Mais	1250	-
Rohgetreide Durum-Weizen und Hafer	1750	-
Rohgetreide Mais	-	1750
Getreidemehl inkl. Maismehl, Maisgries	750	-
Brot, Konditorwaren, Kekse, Snacks und Frühstücksgetreide	500	-
Teigwaren (trocken)	750	-
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Getreidebasis	200	-

Zearalenon

Die temporäre duldbare Aufnahmemenge beträgt 0,2 µg/kg KG und Tag (SCF 22. Juni 2000)

Erzeugnis	Höchstgehalt (µg/kg)	ab 1.7.2007, falls kein spezifischer Wert festgelegt wird
Rohgetreide außer Mais	100	-
Rohgetreide Mais	-	200
Getreidemehl ausgenommen Maismehl	75	-
Maismehl und Maisgrieß	-	200
Brot, Konditorwaren, Kekse Maissnacks andere Getreidesnacks und Frühstückscerealien	50 - 50	- 50 -
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Maisbasis andere Getreidearten	 - 20	 20 -

Fumonisin B_1, B_2

Die temporäre duldbare Aufnahmemenge beträgt 2 µg/kg KG und Tag (Substanz allein oder in Kombination (Fumonisin B_1,B_2,B_3); SCF 17. Oktober 2000 bzw. 4. April 2003)

Erzeugnis	Höchstgehalt (µg/kg)	ab 1.7.2007, falls kein spezifischer Wert festgelegt wird
Rohgetreide Mais	-	2000
Maismehl und Maisgrieß	-	1000
Lebensmittel auf Maisbasis zum direkten Konsum	-	400
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Maisbasis	-	200

T-2 und HT-2-Toxin

Die temporäre duldbare Aufnahmemenge beträgt für die Summe dieser beiden Substanzen 0,06 µg/kg KG und Tag (SCF 30. Mai 2001)

Da die Basis der zugrunde liegenden Daten limitiert ist, wird vorerst kein Wert festgelegt. Die derzeit vorliegenden Daten weisen jedoch auf ein Fusarientoxinproblem hin, weshalb für T-2 und HT-2-Toxin eine Höchstgehaltsfestsetzung vor dem 1.7.2004 angestrebt wird. Außerdem soll an der Entwicklung einer empfindlicheren Analysenmethode sowie an der Erarbeitung weiterer Auftretensdaten insbesondere in Hafer und Haferprodukten gearbeitet werden.

Ähnlich wie bei Aflatoxinen, Ochratoxin A und Patulin werden auch Probenahmeverfahren sowie Kriterien für die Analysenmethoden in einer Richtlinie festgelegt werden.

Weitere zukünftige Diskussionen sind bei den noch offenen Positionen bei Ochratoxin A, Aflatoxin in weiteren Produkten sowie anderen Mykotoxinen (z.B. Ergot-Alkaloiden) zu erwarten.

Mykotoxingehalte in Getreide, Futtermitteln und Lebensmitteln (Überblick 2004)

R. ÖHLINGER

Im Beobachtungsjahr 2004 wurde erstmalig ein Mykotoxinmonitoring bei Getreide durchgeführt (Organisation: DI. Krumphuber, OÖ LWK). Dieses umfasste die Bundesländer Oberösterreich, Niederösterreich, Steiermark, Burgenland und Kärnten. Dabei wurden Getreideproben direkt bei der Ernte gesammelt und zur Analyse aufgegeben. Zur Probe selbst wurden mittels Fragebogen noch weitere „mykotoxinrelevante" Daten wie Angaben über Vorfrucht, Bodenbearbeitung oder über Pflanzenschutzmaßnahmen erhoben. Vor der Mykotoxinbestimmung wurde das Getreide zunächst gereinigt (Siebtechnik) und anschließend vermahlen. Die Mykotoxinanalysen erfolgten im Rahmen des Mykotoxinmonitorings auf B- und A-Trichothecene und Zearalenon.
Futtermittel- und Lebensmittelproben stammten vornehmlich aus der amtlichen Kontrolle und wurden hauptsächlich auf matrixrelevante Mykotoxine untersucht.

Methoden:

B-Trichothecene (Deoxynivalenol (DON), Nivalenol (NIV), Fusarenon X (FUS), 3-Acetyldeoxynivalenol (3-ADON) und 15-Acetyldeoxynivalenol (15-ADON)): Mycosep-Säulen-Clean up, Derivatisierung mit TMS, Kapillar-GC auf zwei Säulen unterschiedlicher Polarität mit EC-Detektion.

A-Trichothecene (T-2 Toxin (T-2), HT-2 Toxin (HT-2), Monoacetoxyscirpenol (MAS), Diacetoxyscirpenol (DAS)): Mycosep-Säulen-Clean up, Derivatisierung mit HFBI, Kapillar-GC auf zwei Säulen unterschiedlicher Polarität mit EC-Detektion.

Zearalenon (ZON): IAS Clean up, HPLC mit FLD

Fumonisin (FUM) B1 und B2: IAS Clean up, Derivatisierung mit OPA, HPLC mit FLD

Ochratoxin A (OTA): IAS Clean up, HPLC mit FLD

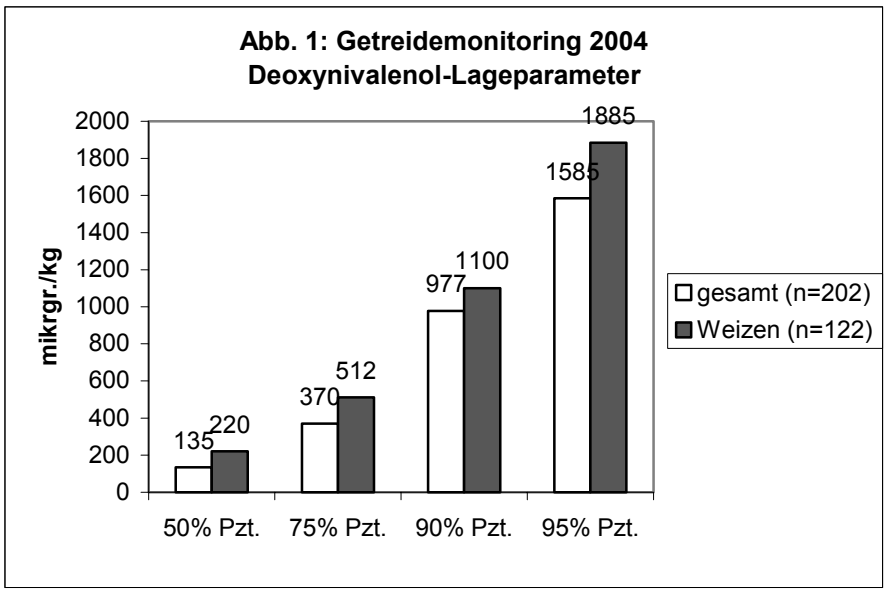
Aflatoxin B1, B2, G1 und G2: IAS Clean up, HPLC, Nachsäulenderivatisierung mit PBPB und FLD

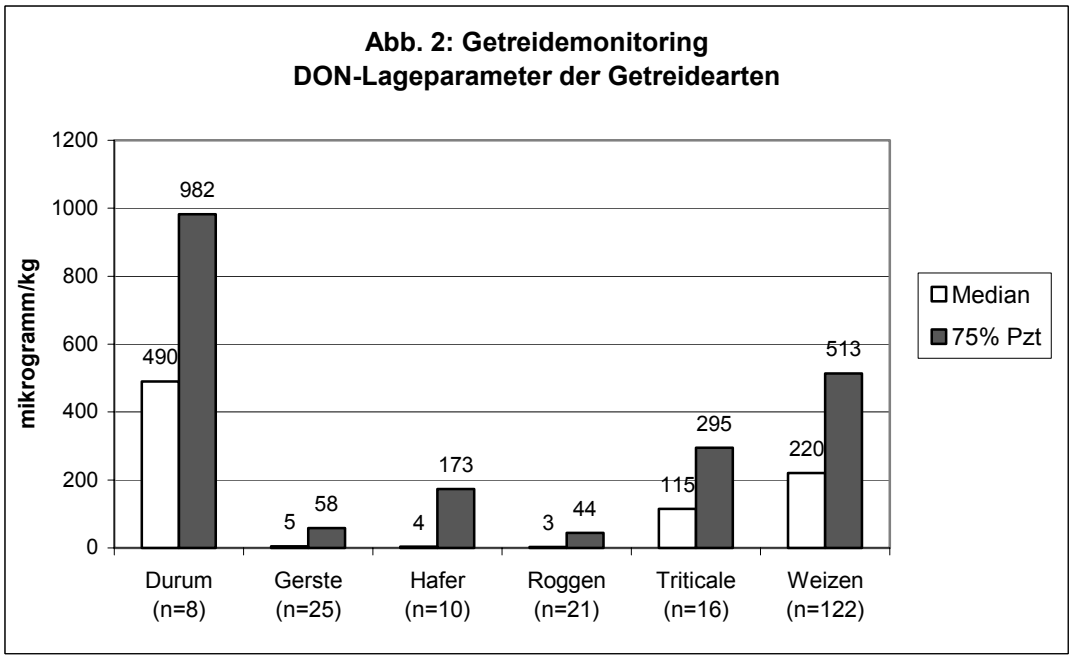
Ergebnisse – Mykotoxinmonitoring

In den folgenden Tabellen bzw. Abbildungen werden die Ergebnisse für Deoxynivalenol (DON) dargestellt. Zur Untersuchung gelangten insgesamt 202 Getreideproben, davon 122 Muster von Weizen, 16 Triticale, 21 Roggen, 10 Hafer, 25 Gerste und 8 Muster von Durumweizen.
Ab 1.7.2006 sollen Mykotoxinhöchstwerte für Rohgetreide zur Lebensmittelproduktion gelten, für DON ist dabei z. Z. ein Grenzwert von 1250 µg/kg vorgesehen. Für Hafer, Durum und Mais wird dagegen ein Grenzwert in der Höhe von 1750 µg/kg diskutiert. Aus dieser Sicht würden „nur" 9% der untersuchten Weizenproben und 12,5% der Durumproben den vorgesehenen Höchstwert überschreiten, wenngleich die Anzahl der Proben von Durumweizen auch relativ gering ist.

Autor: Dr. Richard ÖHLINGER, Kompetenzzentrum „Cluster Chemie Linz"; Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Wieningerstraße 8, A-4021 Linz

Abb. 1 und 2 beschreiben die ermittelten DON-Lageparameter. Dabei liegt der Gesamtmedian unter 200 µg/kg, der von Weizen bei 220 µg/kg. Während Gerste, Roggen und auch Hafer meistens sehr geringe Konzentrationen aufweisen (Anmerkung: die Nachweisgrenze für DON ist etwa 25 µg/kg; ev. angeführte Gehalte <25 µg/kg sind nur Rechenwerte bzw. Messwerte zur Verrechnung), zeigt Triticale eine deutlich höhere Kontamination.

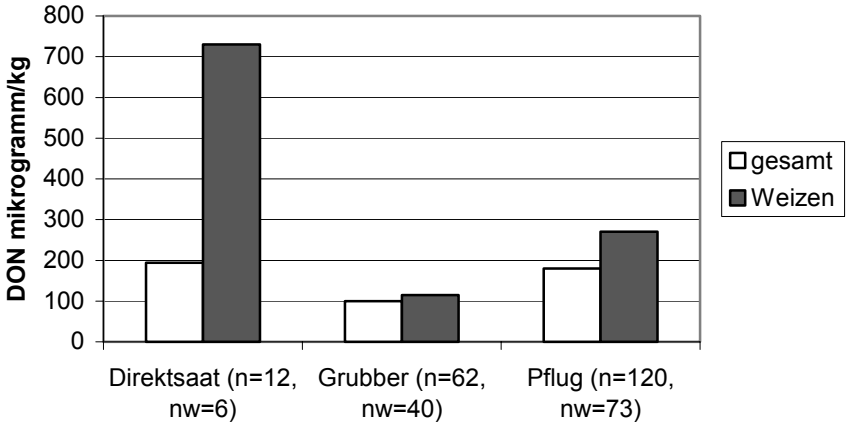




Die Daten wurden bezüglich Bodenbearbeitung, Pflanzenschutzmaßnahmen und Vorfrucht auch einer Rangvarianzanalyse nach Kruskal-Wallis unterworfen und in den meisten Fällen wurden Signifikanzen ausgewiesen (Abb. 3, 4 und 5). Beim Vergleich der Bodenbearbeitungssysteme Direktsaat-Grubber-Pflug erwies sich (wie erwartet) die Direktsaat als jenes System, das die

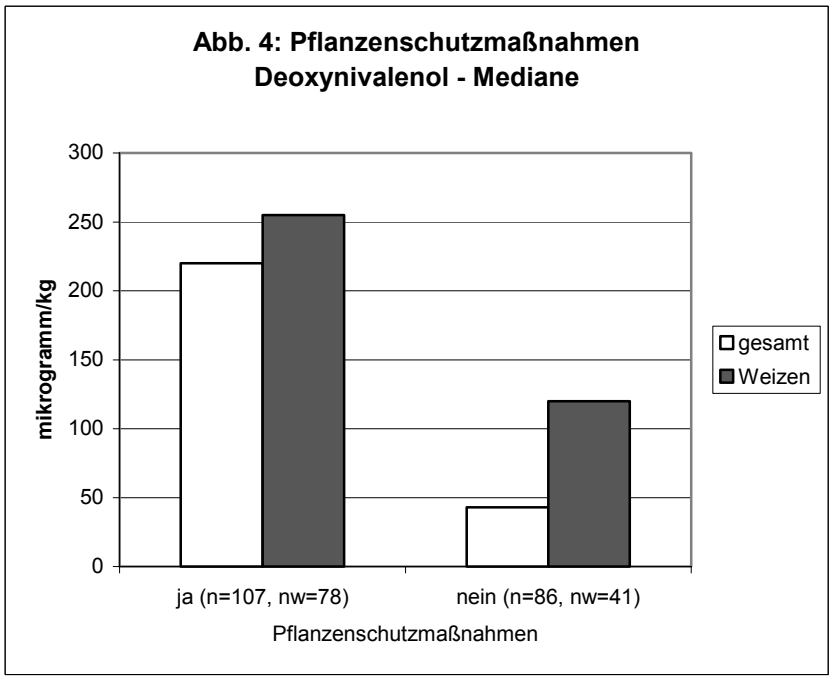
höchsten DON-Werte aufwies. Interessant war hingegen das schlechtere Abschneiden der Pflugvariante gegenüber der Grubberanwendung. Die wahrscheinlichste Erklärung dafür ist, dass bei der Pflugvariante deutlich mehr Maisvorfrucht-Varianten enthalten waren, als bei der Grubberanwendung (nw= Anzahl der Weizenproben).

Abb. 3: Bodenbearbeitung - Vergleich der DON-Mediane



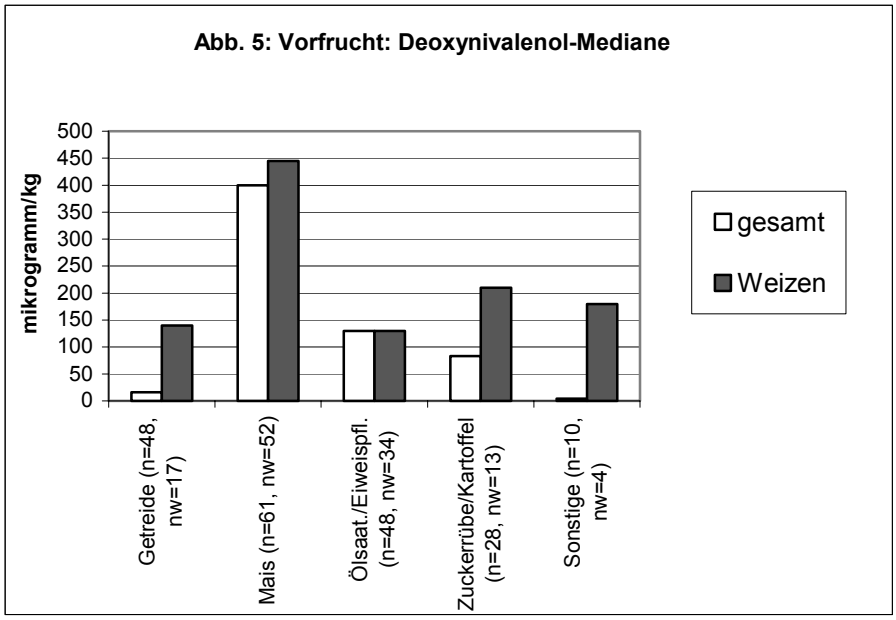
Ebenso „überraschend“ zeigte das mit Pflanzenschutzmaßnahmen behandelte Getreide höhere mittlere DON-Gehalte als die „nein“-Pflanzenschutzvariante. Erklärungen wie mehr Mais-Vorfuchtvarianten oder Unabwägbarkeiten bei der Pflanzenschutzanwendung sind möglich.

Abb. 4: Pflanzenschutzmaßnahmen Deoxynivalenol - Mediane



Als wichtigste Einflussgröße auf einen hohen DON-Gehalt wird Mais als Vorfrucht vor Weizen vermutet (Abb. 5). Maisernterückstände verbleiben im Vergleich zu anderen Getreidearten in höherem Ausmaß am Feld und bilden dadurch ein optimales Inokulum für Fusarien.

Abb. 5: Vorfrucht: Deoxynivalenol-Mediane

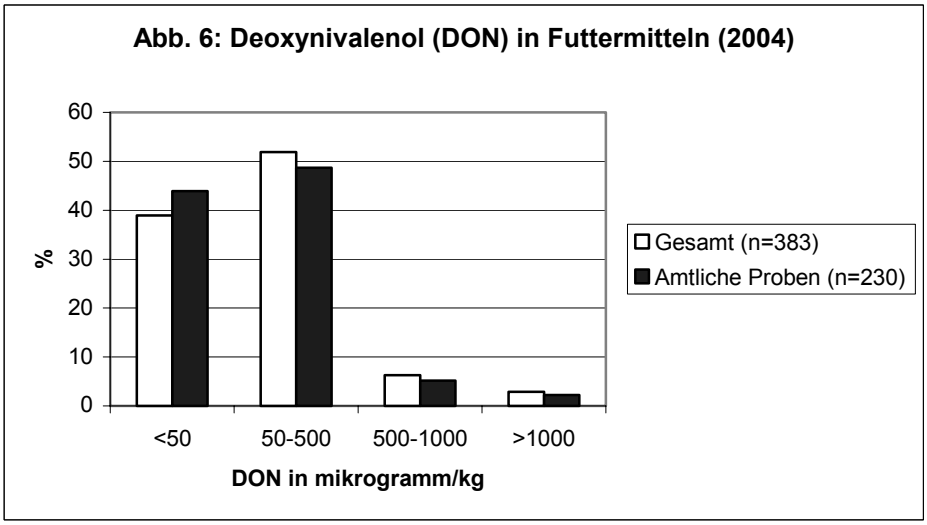


Im Gegensatz teilweise zu früheren Jahren waren 2004 andere Trichothecene (NIV, T-2, HT-2. etc) sowie Zearalenon im untersuchten Getreide kaum nachweisbar.

Ergebnisse – Mykotoxingehalte in Futtermitteln

Die nachfolgenden Abb. 6, 7 und 8 zeigen Ergebnisse von Futtermitteluntersuchungen speziell auf die Mykotoxine DON, ZON, FUM und NIV. Aflatoxine wurden nur bei bestimmten Matrices bestimmt und zeigten keine nennenswerte Gehalte.

Abb. 6: Deoxynivalenol (DON) in Futtermitteln (2004)



Erfahrungsgemäß überschreitet nur ein geringer Prozentsatz vorgegebene DON-Richtwerte (z.B. 500 µg/kg für Schweine) bzw. ZON-Richtwerte (z.B. 50 µg/kg für weibliche Zuchtschweine).

Abb. 7: Zearalenon in Futtermitteln (2004)
n= 304

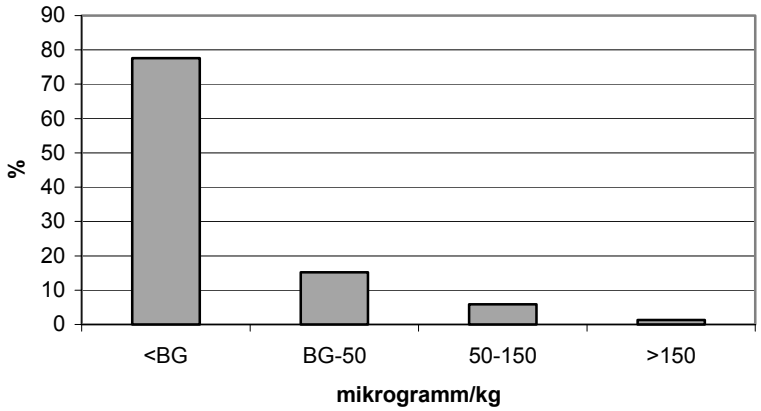
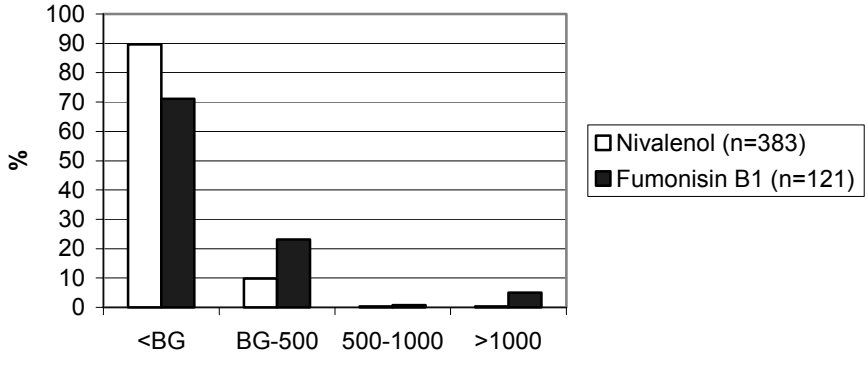


Abb. 8: Nivalenol und Fumonisin B1 in Futtermitteln (2004)



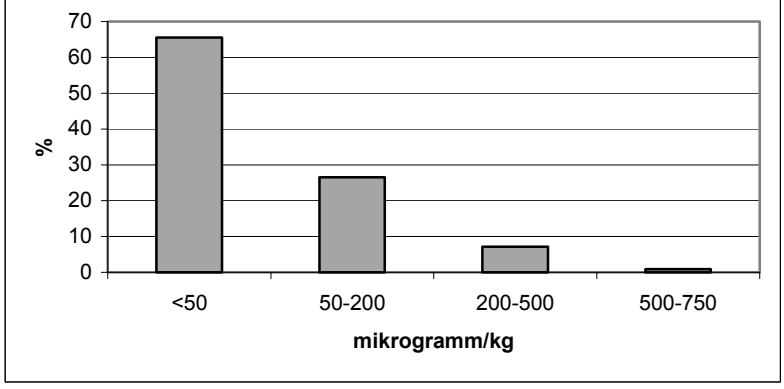
Während Fumonisine hauptsächlich in maishältigen Futtermitteln nachgewiesen wurden, war der in den Proben nachgewiesene Nivalenolgehalt vornehmlich auf Haferanteile zurückzuführen.

Ergebnisse – Mykotoxingehalte in Lebensmitteln

Der Hauptteil der Untersuchungen betraf Fusarientoxine in Lebensmitteln. Etwa 65% der ermittelten DON-Gehalte lagen unter einem Gehalt von 50 µg/kg, ca. 34% zwischen 50 und 500 µg/kg und 1% zwischen 500 und 750 µg/kg (Abb. 9). Bezogen auf die zukünftigen EU-Grenzwerte ab 1.7.2006 (Stand September 2004) würden demnach 99% der Anforderung bezüglich DON-Höchstwert bei Kindernahrung entsprechen.

Sowohl Nivalenol als auch Zearalenon wurden sehr selten nachgewiesen. Fumonisine (B1 und B2) wurden in vielen Verdachtsproben (z.B. Maisgriess) bestimmt (n=87). Dabei lagen rd. 28% der Gehalte >1000 µg/kg (diskutierter EU-Grenzwert ab 1.7.2007 für Maismehle etc.). Rosinen, Bier, Chips, getrocknete Früchte wurden zum Teil auch auf Ochratoxin A untersucht (n=50). Während vor allem etwa in Rosinen vereinzelt hohe Werte auftreten können (>10 µg/kg), wurde in den 20 bisher untersuchten verschiedenen Biersorten kein Ochratoxin A nachgewiesen (Höchstwert in Diskussion: 0,2 µg/L).

Abb. 8: Deoxynivalenol in Lebensmitteln (2004)
n=113



Ein herzliches Dankeschön dem Analytikteam:
W. Brodacz, A. Della Rosa, E. Kiendler, M. Höfler, M. Bachl und S. Knoll

Überblick über österreichrelevante Mykotoxin-Grenz-, Richt- und Diskussionswerte

(Stand 18. März 2005)

zusammengestellt salvo errore et omissione von R. ÖHLINGER

1. Lebensmittel

Aflatoxine (B1, B2, G1, G2 und M1)

Lebensmittel	Höchstgehalt in µg/kg	Anmerkungen, Quelle
Gewürze: Capsicum spp. (inkl. Chilis, Cayennepfeffer und Paprika), Piper ssp., Muskatnuss, Ingwer, Gelbwurz	**5** (B1) **10** (B1+B2+G1+G2)	EG Verordnung Nr. 472/2002
Erdnüsse, Schalenfrüchte und getrocknete Früchte und deren Verarbeitungserzeugnisse, die für den **direkten Verzehr** oder zur Verwendung als **Lebensmittelzutat** bestimmt sind	**2** (B1) **4** (B1+B2+G1+G2)	EG Verordnung Nr. 257/2002
Erdnüsse, die **vor ihrem Verzehr** oder ihrer Verwendung als Lebensmittelzutat einer **Sortierung** oder anderen physikalischen Verfahren unterzogen werden sollen	**8** (B1) **15** (B1+B2+G1+G2)	EG Verordnung Nr. 257/2002
Schalenfrüchte oder getrocknete Früchte, die **vor ihrem Verzehr** oder ihrer Verwendung als Lebensmittelzutat einer **Sortierung** oder anderen physikalischen Verfahren unterzogen werden sollen	**5** (B1) **10** (B1+B2+G1+G2)	EG Verordnung Nr. 257/2002
Getreide (inkl. Buchweizen, Fagopyrum spp.) und dessen Verarbeitungserzeugnisse, die für den **direkten Verzehr** oder zur Verwendung als **Lebensmittelzutat** bestimmt sind	**2** (B1) **4** (B1+B2+G1+G2)	EG Verordnung Nr. 257/2002
Getreide (inkl. Buchweizen, Fagopyrum spp.), mit Ausnahme von Mais, das **vor seinem Verzehr** oder seiner Verwendung als Lebensmittelzutat einer **Sortierung** oder anderen physikalischen Verfahren unterzogen werden sollen	**2** (B1) **4** (B1+B2+G1+G2)	EG Verordnung Nr. 257/2002

Autor: Dr. Richard ÖHLINGER, Kompetenzzentrum „Cluster Chemie Linz“; Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Wieningerstraße 8, A-4021 Linz

Aflatoxine (B1, B2, G1, G2 und M1), Fortsetzung

Lebensmittel	Höchstgehalt in µg/kg	Anmerkungen, Quelle
Mais, der **vor seinem Verzehr** oder seiner Verwendung als Lebensmittelzutat einer **Sortierung** oder anderen physikalischen Verfahren unterzogen werden sollen	**5** (B1) **10** (B1+B2+G1+G2)	EG Verordnung Nr. 2174/2003
Milch (Rohmilch, Werkmilch und wärmebehandelte Milch)	**0,05** (M1)	EG Verordnung Nr. 2174/2003
Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder	**0,1** (B1)	EG Verordnung Nr. 683/2004
Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung einschließlich Säuglingsmilchnahrung und Folgemilch	**0,025** (M1)	EG Verordnung Nr. 683/2004
Diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die eigens für Säuglinge bestimmt sind	**0,1** (B1) **0,025** (M1)	EG Verordnung Nr. 683/2004

Ochratoxin A

Lebensmittel	Höchstgehalt in µg/kg	Anmerkungen, Quelle
Rohe Getreidekörner (einschließlich Rohreis und Buchweizen)	**5**	EG Verordnung Nr. 123/2005
Alle aus Getreide (einschließlich verarbeiteten Getreideerzeugnissen und zum unmittelbaren menschlichen Verzehr bestimmten Getreidekörnern) **gewonnenen Erzeugnisse**	**3**	EG Verordnung Nr. 123/2005
Getrocknete Weintrauben (Korinthen, Rosinen und Sultaninen)	**10**	EG Verordnung Nr. 123/2005
Geröstete Kaffeebohnen sowie gemahlener Kaffee außer löslicher Kaffee	**5**	EG Verordnung Nr. 123/2005
Löslicher Kaffee (Instant Kaffee)	**10**	EG Verordnung Nr. 123/2005
Wein (rot, weiß, rose) sowie andere Getränke auf Wein- und/oder Traubenmostbasis	**2**	EG Verordnung Nr. 123/2005 *****

***** Höchstgehalt gilt für Erzeugnisse aus der Weinlese ab 2005

Ochratoxin A, Fortsetzung

Lebensmittel	**Höchstgehalt in µg/kg**	**Anmerkungen, Quelle**
Traubensaft, Traubensaftzutaten in anderen Getränken, einschließlich Traubennektar und konzentrierter rekonstituierter Traubenmost	**2**	EG Verordnung Nr. 123/2005 *****
Zum unmittelbaren menschlichen Verzehr bestimmter Traubenmost und konzentrierter rekonstituierter Traubenmost	**2**	EG Verordnung Nr. 123/2005 *****
Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder	**0,5**	EG Verordnung Nr. 123/2005
Diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die eigens für Säuglinge bestimmt sind	**0,5**	EG Verordnung Nr. 123/2005

***** Höchstgehalt gilt für Erzeugnisse aus der Weinlese ab 2005

Patulin

Lebensmittel	**Höchstgehalt in µg/kg**	**Anmerkungen, Quelle**
Fruchtsäfte, insbesondere Apfelsaft, und Fruchtsaftzusätze in anderen Getränken, einschließlich Fruchtnektar	**50**	EG Verordnung Nr. 1425/2003
Spirituosen, Apfelwein und andere aus Äpfeln gewonnene oder Apfelsaft enthaltende fermentierte Getränke	**50**	EG Verordnung Nr. 1425/2003
Feste, für den direkten Verzehr bestimmte Apfelerzeugnisse, einschließlich Apfelkompott, Apfelpüree	**25**	EG Verordnung Nr. 1425/2003
-Apfelsaft sowie feste Apfelerzeugnisse, einschließlich Apfelkompott, Apfelpüree **für Säuglinge und Kleinkinder**, die mit diesem Verwendungszweck gekennzeichnet und verkauft werden -Andere Beikost	**10**	EG Verordnung Nr. 1425/2003

Höchstgehalt von Mykotoxinen bei Lebensmitteln, BGBl. Nr. 251/1986

Mykotoxin	**Lebensmittel**	**Höchstwert** in od. auf Lebensmitteln in µg/kg
Aflatoxin B1	- Alle Lebensmittel (ausg. Mahl- und Schälprodukte sowie die ausschl. daraus hergestellten Produkte) - Mahl- und Schälprodukte sowie die ausschließlich daraus hergestellten Produkte	1 2
Aflatoxin Summe B2+G1+G2	Alle Lebensmittel	5
Aflatoxin M1	- Pasteurisierte Frischmilch Baby, Kindermilch, Milchnahrung für Kinder (bez. auf genussfertige Zubereitung) - Andere Milch, Milchprodukte (ausg. die im Folgenden genannten) - Molke, flüssige Molkeprodukte (ausg. Kindernährmittel) - Molkepulver, Molkepaste (ausg. Kindernährmittel, TM) - Butter - Käse - Trockenmilch und Trockenmilchprodukte, Kondensmilch, Milchkonzentrate (bezogen auf Milch-TM)	0,01 0,05 0,025 0,4 0,02 0,25 0,4
Aflatoxin Summe M1+B1+B2+G1+G2	Andere Kindernährmittel (bezogen auf die genussfertige Zubereitung)	0,02
Patulin	Obstsäfte	50

In Vorbereitung (voraussichtlich in Kraft ab 1.7.2006):
Änderung der VO (EG) Nr. 466/2001 in Bezug auf *Fusarium*-Toxine in Lebensmitteln

Deoxynivalenol

Produkt	**Höchstgehalt in µg/kg**
Unbearbeitetes[1] Getreide ausgenommen Durum, Hafer und Mais	1250
Unbearbeiteter Durum und Hafer	1750
Unbearbeiteter Mais	(1750)*
Getreidemehle, einschließlich Maismehl und Maisgriess	750
Brot, Konditorwaren, Kekse, Frühstückscerealien, …	500
Spaghetti (trocken)	750
Lebensmittel auf Getreidebasis für Kleinkinder und Kinder und Babynahrung	200

***** Wenn kein Höchstwert bis 1.7.2007 festgelegt wird, dann gilt der Wert in Klammer

[1] Rohgetreide vor dem ersten Verarbeitungsschritt zur Lebensmittelerzeugung (davon sind z.B. nicht betroffen: trocknen, sortieren und reinigen, da bei diesen Prozessen das Korn als solches erhalten bleibt)

Zearalenon

Produkt	**Höchstgehalt in µg/kg**
Unbearbeitetes[1] Getreide ausgenommen Mais	100
Unbearbeiteter[1] Mais	(200)*
Getreidemehle, ausgenommen Maismehl	75
Maismehl, Maisgrieß, raffinierte Maisöle	(200)*
Brot, Konditorwaren, Kekse	50
Maissnacks, Cornflakes	(50)*
Andere Getreidesnacks, Frühstückscerealien	50
Lebensmittel auf Maisbasis für Kleinkinder und Kinder	(20)*
Andere Lebensmittel auf Getreidebasis für Kleinkinder und Kinder und Babynahrung	20

***** Wenn kein Höchstwert bis 1.7.2007 festgelegt wird, dann gilt der Wert in Klammer

Fumonisin B1 + B2

Produkt	**Höchstgehalt in µg/kg**
Unbearbeiteter[1] Mais	(2000)*
Maismehl, Maisgriess	(1000)*
Lebensmittel auf Maisbasis zum direkten Verzehr (ausgenommen Maismehle und Kindernahrung)	(400)*
Lebensmittel auf Maisbasis für Kleinkinder und Kinder und Babynahrung	(200)*

***** Wenn kein Höchstwert bis 1.7.2007 festgelegt wird, dann gilt der Wert in Klammer

Österreichische Richtwerte für Mykotoxine in Getreide für den menschlichen Genuss
(aus: Mitteilungen der österreichischen Sanitätsverwaltung, 1993)

Mykotoxin	**Getreide**	**mg/kg** (Angebotsform)
Deoxynivalenol (DON)	Weizen, Roggen Durumweizen	0,5 0,75
Zearalenon (ZON)	Weizen, Durumweizen, Roggen	0,06
Ochratoxin A	Weizen, Durumweizen, Roggen	0,005

2. Futtermittel

Aflatoxin B1

Futtermittel	**Höchstgehalt in mg/kg (mit 88 % TM)**	**Anmerkungen, Quelle**
Alle Futtermittel-Ausgangserzeugnisse	**0,02**	Richtlinie 2003/100/EG
Alleinfuttermittel für Rinder, Schafe und Ziegen, ausgenommen: - Milchvieh - Kälber und Lämmer	 **0,02** **0,005** **0,01**	Richtlinie 2003/100/EG
Alleinfuttermittel für Schweine und Geflügel (ausgen. Jungtiere)	**0,02**	Richtlinie 1999/29/EG
Andere Alleinfuttermittel	**0,01**	Richtlinie 1999/29/EG
Ergänzungsfuttermittel für Rinder, Schafe und Ziegen (ausgen. Ergänzungsfuttermittel für Milchvieh, Kälber und Lämmer):	**0,02**	Richtlinie 2003/100/EG
Ergänzungsfuttermittel für Schweine und Geflügel (ausgenommen Jungtiere):	**0,02**	Richtlinie 2003/100/EG
Andere Ergänzungsfuttermittel	**0,005**	Richtlinie 1999/29/EG

Mutterkorn (Claviceps purpurea)

Futtermittel	**Höchstgehalt in mg/kg (mit 88 % TM)**	**Anmerkungen, Quelle**
Alle Futtermittel, die ungemahlenes Getreide enthalten	**1000**	Richtlinie 2002/32/EG

Österreichische Richtwerte für Futtermittel

(ALVA-Arbeitskreis für „Mykotoxine im Futter“, 2003)

Kategorie	**Deoxynivalenol** (mg/kg Futter)	**Zearalenon** (mg/kg Futter)
Schweine Präpubertäre weibliche Zuchtschweine Mastschweine und Zuchtsauen	 0,5 0,5	 0,05 0,15
Geflügel Zuchtgeflügel, Legehennen,Mastputen Masthühner	 1 2	 - -
Mastrinder	1	-

In Diskussion:

Änderung des Annex I der Richtlinie 2002/32/EG über unerwünschte Stoffe und Erzeugnisse in der Tierernährung in Bezug auf Deoxynivalenol, Zearalenon und Ochratoxin A

Deoxynivalenol

Produkt	**Höchstgehalt in mg/kg** Futtermittel mit 12% Wassergehalt
Futtermittel-Ausgangserzeugnisse *:	
Getreidekörner	5
Getreideprodukte	10
Ergänzungs- und Alleinfuttermittel	5
ausgenommen:	
- Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Schweine	0,9
- Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Kälber (<4 Monate), Lämmer und Zicklein	2

* nachstehende Ausgangserzeugnisse, welche direkt verfüttert werden, müssen nicht nur die Höchstwerte einhalten, sondern es ist auch sicherzustellen, dass in der täglichen Ration die entsprechenden Höchstwerte für Alleinfuttermittel eingehalten werden.

Zearalenon

Produkt	**Höchstgehalt in mg/kg** Futtermittel mit 12% Wassergehalt
Futtermittel-Ausgangserzeugnisse *:	
Getreidekörner	1
Getreideprodukte	2
Ergänzungs- und Alleinfuttermittel:	
für Ferkel und Jungsauen	0,1
für Sauen und Mastschweine	0,25
für Kälber, Milchkühe, Schafe und Ziegen	0,5

* nachstehende Ausgangserzeugnisse, welche direkt verfüttert werden, müssen nicht nur die Höchstwerte einhalten, sondern es ist auch sicherzustellen, dass in der täglichen Ration die entsprechenden Höchstwerte für Alleinfuttermittel eingehalten werden.

Ochratoxin A

Produkt	**Höchstgehalt in mg/kg** Futtermittel mit 12% Wassergehalt
Futtermittel-Ausgangserzeugnisse *: Getreidekörner und Getreideprodukte	0,25
Ergänzungs- und Alleinfuttermittel: für Schweine für Geflügel	 0,05 0,1

* nachstehende Ausgangserzeugnisse, welche direkt verfüttert werden, müssen nicht nur die Höchstwerte einhalten, sondern es ist auch sicherzustellen, dass in der täglichen Ration die entsprechenden Höchstwerte für Alleinfuttermittel eingehalten werden.

In Diskussion:
Änderung des Annex II der Richtlinie 2002/32/EG

Unerwünschte Substanz	**Produkt**	**Aktionswert** bezogen auf Futter mit 12 % Wassergehalt	**Anmerkung**
Deoxynivalenol	Getreidekörner und -produkte	1,5 mg/kg	Bei Überschreitung des Aktionswertes ist darauf zu achten, dass diese Produkte nicht für die Erzeugung von Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Schweine verwendet werden, sondern für andere Tiergattungen.
Zearaleneon	Getreidekörner und -produkte	0,2 mg/kg	Bei Überschreitung des Aktionswertes ist darauf zu achten, dass diese Produkte nicht für die Erzeugung von Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Ferkel und Jungsauen verwendet werden, sondern für andere Tiergattungen.
Ochratoxin A	Getreidekörner und -produkte	0,1 mg/kg	Bei Überschreitung des Aktionswertes ist darauf zu achten, dass diese Produkte nicht für die Erzeugung von Ergänzungs- und Alleinfuttermittel für Schweine und Geflügel verwendet werden, sondern für andere Tiergattungen.

Kurzfassung der Diskussion: Mykotoxinsituation / Vermeidungsstrategien

"Hinweise zur Verminderung der Mykotoxinbelastung in Getreide und Mais"

Mold-Meeting der ALVA-Fachgruppe Mikrobiologie, 26. November 2004

Im Rahmen des Mold-Meetings (2004) der ALVA-Fachgruppe Mikrobiologie wurden Vermeidungsstrategien zu Fusarienbefall und Mykotoxinbelastung von Getreide und Mais diskutiert, wesentliche Aspekte dieser Diskussion sind in der nachfolgenden Kurzfassung zusammengestellt.

Konsumenten müssen davon ausgehen können, dass mit dem Genuss von Lebensmitteln das geringst mögliche Risiko verbunden ist. Gesunde, qualitativ hochwertige Nahrungsmittel sind eine unabdingbare Voraussetzungen für einen vorbeugenden Verbraucherschutz und eine hohe Lebensmittelsicherheit.

Eine Strategie gegen die mit *Fusarium*-Befall verbundene Toxinbelastung setzt in der Getreide-, speziell Weizenproduktion, eine integrierte Vorgehensweise voraus. EU-weite Rechtsnormen betreffend Höchstwerte für Mykotoxine sind zudem hinsichtlich Interventionsgetreide sowie für Getreide zur Verwendung in der Lebensmittelproduktion bereits für die Ernte 2006 geplant. Erfahrungsgemäß sind etwa folgende wesentliche Schwerpunkte und Handlungsempfehlungen zur Verminderung der Mykotoxingehalte im Getreide zu nennen:

Erweiterung der Fruchtfolge, vor allem in Risikogebieten

- Reduzierung des Infektionsrisikos durch Erweiterung der Fruchtfolgen und Verminderung des Maisanteils in der Fruchtfolge, besonders gefährdet ist Weizen nach der Vorfrucht Mais.
- Daher möglichst kein Weizen nach Mais, besser Anbau von Sommergetreide oder Nachbau von Blattfrüchten oder Soja nach Mais, Auflockerung von engen Getreidefruchtfolgen.

Bodenbearbeitung, Ackerhygiene

- In Fruchtfolgen mit Körnermais bleibt viel organisches Material an der Ackeroberfläche vorhanden, daher sind ein gleichmäßiges Zerkleinern, Verteilen und Einarbeiten der Ernterückstände und wendende Bodenbearbeitung zur Vermeidung einer Infektion erforderlich.
- Gründliches Einarbeiten von Mais-Ernterückständen ist insbesondere bei Anbau von Weizen nach der Vorfrucht Mais, aber auch für die Bekämpfung des Maiszünslers ganz wesentlich.
- Verzicht auf Direktsaat von Weizen nach Vorfrucht Mais bei pflugloser Bodenbearbeitung!
- Förderung eines biologisch aktiven Bodens; zu tiefes Einpflügen hemmt dabei die Verrottung.
- Wichtig ist, dass im Boden auch tatsächlich eine Rotte stattfindet und nicht unverrottetes Pflanzenmaterial im nächstfolgenden Jahr wieder an die Bodenoberfläche gepflügt wird.

Kurzfassung: Dr. Andreas ADLER und Mag. Dr. Sandra BRUNNER, Inst. für Landwirtschaftliche Analytik; Dr. Richard ÖHLINGER, Kompetenzzentrum „Cluster Chemie Linz"; Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Wieningerstraße 8, A-4021 Linz

Standortgerechte Sortenwahl

- Anbau von Sorten mit geringer Anfälligkeit gegenüber Ährenfusarien, insbesondere bei enger Getreide-Mais-Fruchtfolge und konservierender Bodenbearbeitung (zunehmende Pflanzenlänge und kürzere Blühdauer etwa führen meist zu geringerer *Fusarium*-Anfälligkeit der Sorten).
- Wichtig ist eine standortgerechte Sortenwahl. Hinweise für Weizen aus Sortenwertprüfung (siehe österreichische beschreibende Sortenliste) verstärkt für die Praxis heranziehen.
- Bei Mais sind Sorten anzubauen, die am gegebenen Standort auch sicher ausreifen. Reifezahl dabei nicht nur aufgrund der Witterung und Erfahrungen eines einzelnen Vorjahres auswählen.

Bedarfsorientierte Düngung

- Förderung optimaler Pflanzenbestände durch standort- und pflanzenspezifische Abstimmung der Nährstoffzufuhr, Verzicht auf zu hohe Bestandsdichten, Verringerung der Lagerneigung.
- Anbauintensität mit Stickstoffangebot, Wachstumsreglereinsatz und Fungizidbehandlung sollen jedenfalls auf eine nicht zu späte Abreife ausgerichtet sein.

Chemischer Pflanzenschutz

- Gezielter Einsatz von zugelassenen Azolfungiziden bei infektionsfördernden Bedingungen (Temp. von mehr als 18°C, mind. 5 mm Niederschlag täglich und 24 h Ährenfeuchte) während der Weizenblüte, insbesondere bei anfälligen Sorten und konservierender Bodenbearbeitung.
- Wachstumsregler frühzeitig zur Stabilisation der Halmbasis und nicht zur Einkürzung der Halmlänge verwenden. Wechselwirkungen verschiedener Fungizide beachten, insbesondere bei strobilurinhaltigen Präparaten. Die amtliche Pflanzenschutzberatung nutzen!

Rechtzeitige und beschädigungsfreie Ernte

- Nach Erreichen des optimalen Reifegrades und niedriger Kornfeuchte unverzüglich ernten, Körner sind im reifen Zustand sehr anfällig gegenüber Pilzbefall.
- Bei drohender Wetterverschlechterung die Ernte (speziell bei Hafer) auch bei höherer Kornfeuchtigkeit (20 bis 25 %) durchführen und das Erntegut danach trocknen.
- Auf eine beschädigungsfreie Ernte durch optimale Einstellung der Erntetechnik achten. Ausreinigung befallener Schmachtkörner möglichst bereits bei der Ernte. Vorzeitige Ernte beschädigter Pflanzen (etwa nach Hagel). Zeitliche Abstimmung Ernte – Transport – Lagerung.
- Anfall von Reststroh minimieren, etwa durch optimale Einstellung der Schnitthöhe bei Silomais.

Sorgfältige Reinigung, sachgerechte Lagerung, Feuchtigkeitsabfuhr

- Sachgerechte Getreidelagerung bei Temperaturen unter 18°C und einer Feuchtigkeit von etwa 13 % (a_w-Wert 0,65), bei Feuchtegehalten >14 % sofort nachtrocknen und umziehen.
- An der Oberfläche der Getreidekörner, darf sich keine für das Pilzwachstum ausreichend hohe Wasseraktivität aufbauen. Kontrolle auf Lagerschädlinge, ggf. Anwendung von Säuren.
- Nach erfolgtem Fusarienbefall und erhöhten Toxingehalten im Erntegut ist nur mehr eine Schadensbegrenzung, etwa durch Aufbereitung und sorgfältige Reinigung (Aspirieren und Leichtkornauslese) und/oder eine Separierung belasteter Partien möglich.

Fazit

Gegen die mit *Fusarium*-Befall verbundene Toxinbelastung von Getreide und Mais ist zunächst die gesamte Anbaupraxis auf eine Risikominimierung auszurichten. Nach (trotz aller Vorsichtsmaßnahmen) aufgetretenem Befall ist letztlich nur mehr eine Schadensbegrenzung durch entsprechendes Risikomanagement möglich, etwa durch Aufbereitung und sorgfältige Reinigung, vor allem aber durch eine Separierung belasteter Chargen, um problematische Partien der Nahrungskette zu entziehen.

Durch eine Kombination von Maßnahmen, wie etwa geeignete Fruchtfolge, Bodenbearbeitung, Sortenwahl und Anbauintensität, sollte das Risiko der Mykotoxinbelastung im Weizen allerdings bereits am Feld maßgeblich gesenkt werden können.

Unter Berücksichtigung der jeweiligen Anbauregion lässt sich dabei erfahrungsgemäß eine steigende Wahrscheinlichkeit für höhere Toxinwerte aus einer Rangfolge etwa folgender Risikokriterien ableiten: Witterung, Vorfrucht Mais, nicht-wendende Bodenbearbeitung nach Mais, Sortenanfälligkeit. Zur Minimierung des Befallsrisikos erscheint dabei der Verzicht auf eine Direktsaat von Weizen nach Vorfrucht Mais bei pflugloser Bodenbearbeitung besonders relevant.

Aus den bereits für die Ernte 2006 geplanten Höchstwerte-Regelungen für Mykotoxine sowie verschärften Bestimmungen zur Rückverfolgbarkeit von Futter- und Lebensmitteln resultiert ein unmittelbarer Handlungsbedarf für Landwirtschaft und Übernehmende Hand:

Landwirtschaft

- Produktion nach „Guter Landwirtschaftlicher Praxis“ (GLP) zur Minimierung von Fusarienbefall und Mykotoxinbelastung
- Dokumentation der Produktionsbedingungen und der getroffenen GLP-Maßnahmen
- Nachweis von Produktionsbedingungen und GLP-Maßnahmen bei Ablieferung der Ernte

Übernehmende Hand

- Einsicht in Dokumentation zu den Produktionsbedingungen bereits vor Übernahme der Ernte
- Chargenbezogene Kontrolle und Dokumentation relevanter Qualitätsparameter und von Mykotoxinen bei der Warenübernahme, Aufbewahrung von Rückstellmustern
- Getrennte Lagerhaltung bis zum Vorliegen entsprechender Qualitätsdaten
- Rückverfolgbare und chargenbezogene Kenntnis um die Qualität der übernommenen Produkte
- Qualitätsgebundene Lagerung und Abgabe der Ware entsprechend ihrer Verwendungseignung

Handlungsbedarf - Forschung

Fragen der Mykotoxinbelastung von Nahrungs- und Futtermitteln sind primär im Lichte von umfassendem Gesundheitsschutz und maximaler Ernährungssicherheit zu bewerten. Eine Minimierung des Mykotoxinrisikos setzt dabei eine integrierte Vorgehensweise voraus, die weit über unmittelbare Fragen der Produktion hinausreicht.

Unabdingbare Voraussetzung für eine diesen Vorgaben entsprechende Verbindung von Risikobewertung und -management bezüglich Mykotoxine im Interesse aller Konsumenten sind zunächst die Erhebung und Aktualisierung aller Einflussmöglichkeiten sowie eine Quantifizierung des Gefahrenpotentials.

In dieser Hinsicht zielt der Vorschlag für ein modular aufgebautes interdisziplinäreres Forschungsprojekt unter Federführung der AGES (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH) in einem ersten Schritt mittels eines umfassenden Monitoring-Programms auf eine Evaluierung von Maßnahmen und Richtlinien zur Minimierung von Fusarienbefall und Mykotoxinbelastung in Getreide und Mais unter Betonung von pflanzenbaulichen Maßnahmen ab.

Wesentliche Zielsetzung eines anschließenden zweiten Moduls des AGES-Projektvorschlags ist, auf Basis der im Bereich der landwirtschaftlichen Produktion erhobenen Monitoring-Daten die Logistik der aufnehmenden Hand und der weiteren Be- und Verarbeitung hinsichtlich Minimierung der notwendigen Mykotoxinüberwachungen zu optimieren.

Erst eine aus dem AGES-Projekt resultierende repräsentative Datengrundlage für Risikobewertung und -management unter Berücksichtigung der spezifischen Situation von Landwirtschaft, aufnehmender Hand sowie der weiteren be- und verarbeitenden Wirtschaft in Österreich kann nachfolgend als eine statistisch fundierte Entscheidungsgrundlage für die Erstellung bzw. Umsetzung von Rechtsnormen betreffend Mykotoxine herangezogen werden.