

**Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz**

**Abteilung Phytomedizin**

**Breitenweg 71**

**67435 Neustadt/Weinstraße**

## **Abschlussbericht**

**zum**

**Forschungsvorhaben Az. 514-06.01/04 HS 019**

**Untersuchungen zu einer möglichen Ochratoxin A-Bildung durch neu in den deutschen Weinbaugebieten auftretende *Aspergillus*-Stämme und Analysen ausgewählter Weine aktueller Jahrgänge auf Ochratoxin A -Gehalte**

**Laufzeit: 01.08.2007 bis 31.07.2011**

**Berichtszeitraum: 01.08.2007 – 31.10.2011**



## Inhaltsverzeichnis

1	Ziele und Aufgabenstellung.....	1
1.1	Planung und Ablauf des Vorhabens .....	2
1.1.1	Sammlung von <i>Aspergillus</i> -Isolaten .....	2
1.1.2	Identifizierung der beteiligten Arten.....	2
1.1.3	Untersuchungen zur OTA-Bildung.....	2
1.1.4	Analyse von Wein und Traubenmost auf OTA-Gehalte .....	3
1.1.5	Einfluss kellertechnischer Verfahren auf Ochratoxin A-Gehalte .....	3
1.1.6	Zeitplan.....	4
1.2	Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde .....	4
2	Material und Methoden.....	6
2.1	Sammlung von <i>Aspergillus</i> -Isolaten .....	6
2.1.1	Probenahme zur Gewinnung von Isolaten.....	6
2.1.2	Analytik von Ochratoxin A.....	7
2.1.3	Screening auf OTA-Bildung.....	10
2.2	DNA-Isolation und Identifizierung isolierter Arten .....	10
2.2.1	Isolation der DNA .....	11
2.2.2	PCR-Verfahren .....	11
2.2.3	Untersuchungen zu Wachstum und OTA-Bildung in vitro und in vivo .....	20
2.2.4	Analyse von Weinen und Traubenmosten auf OTA-Gehalte.....	22
2.2.5	Einfluss kellertechnischer Verfahren auf OTA-Gehalte.....	23
3	Ergebnisse .....	26
3.1	Wichtigste Ergebnisse .....	26
3.1.1	Verbreitung von <i>Aspergillus</i> -Arten in den deutschen Weinbaugebieten.....	26
3.1.2	OTA-bildende <i>Aspergillus</i> -Arten in deutschen Weinbaugebieten.....	26
3.1.3	Infektionsversuche .....	28
3.1.4	Analyse von Weinen und Traubenmosten auf OTA-Gehalte.....	37
3.1.5	Einfluss kellertechnischer Verfahren auf OTA-Gehalte.....	40
3.2	Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit der Ergebnisse, weiterer Forschungsbedarf.....	47
4	Zusammenfassung.....	49
5	Soll-Ist-Vergleich des Vorhabens.....	52

6	Literatur.....	53
7	Projektbeteiligung und Danksagung .....	56
8	Anhang.....	57
8.1	<i>PCR-Protokolle</i> .....	57
8.2	Probenahmeorte und cfu-Werte.....	60
8.3	OTA-bildende <i>Aspergillus</i> -Isolate .....	64
8.4	Boniturergebnisse Infektionsversuche Einzelbeeren.....	69

## 1 Ziele und Aufgabenstellung

Durch die seit Jahrzehnten anhaltende globale Erwärmung haben sich auch in den deutschen Weinbaugebieten Veränderungen im Spektrum der Krankheiten und Schädlinge ergeben. So haben zum Beispiel wärmeliebende, direkt oder indirekt als Vektoren schädigende Insekten wie etwa Zikaden oder Schildläuse an Bedeutung gewonnen, aber auch Pilzkrankheiten wie Esca und Schwarzfäule oder Phytoplasmosen wie die Schwarzholzkrankheit breiten sich zunehmend aus. Auch das Spektrum der an Trauben in Folge eines Vorbefalls durch *Botrytis* oder einer mechanischen Verletzung der Beerenhaut auftretenden Sekundärfäuleerreger hat sich erweitert. Neben Schimmelpilzen der Gattungen *Penicillium* (Grünfäule), *Trichothecium* (Rosafäule) und anderer, sind immer häufiger auch *Aspergilli* an reifenden Trauben zu finden. Von vielen *Aspergillus*- und einigen *Penicillium*-Arten ist bekannt, dass sie unter anderem das hochtoxische Mykotoxin Ochratoxin A (OTA) bilden können. Berichte über Ochratoxin A-Kontaminationen von Trauben und Traubenerzeugnissen beziehen sich bisher allerdings überwiegend auf Produkte aus dem mediterranen Raum (u. a. Varga, Kozakiewicz, 2006).

Vor diesem Hintergrund sollte mit diesem Projekt vor allem geklärt werden, ob in den deutschen Weinbaugebieten unter den geänderten Klima- und Produktionsbedingungen zumindest in manchen Jahren Wachstumsbedingungen für Ochratoxin A-bildende Schimmelpilzarten gegeben sind und ob unter diesen Bedingungen auch Kontaminationen von Traubenmosten und Weinen mit Ochratoxin A auftreten können.

Im Einzelnen sollten daher die folgenden Fragen beantwortet werden:

- Welche *Aspergillus*-Arten kommen in den deutschen Weinanbaugebieten regelmäßig vor?
- Sind aus diesen Regionen stammende Isolate zur Ochratoxin A-Bildung befähigt?
- Unter welchen Bedingungen kann es zur Ochratoxin A-Bildung kommen?
- Ist in Weinen deutscher Herkunft Ochratoxin A nachweisbar?
- Kann während des Weinbereitungsprozesses Ochratoxin A gebildet werden?
- Wie verhält sich Ochratoxin A während der Gärung oder gegenüber Schönungsmaßnahmen?

## **1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens**

### **1.1.1 Sammlung von *Aspergillus*-Isolaten**

In einem umfangreichen Screening sollte das Auftreten potentieller OTA-Bildner in den deutschen Weinbaugebieten untersucht werden. Da die an Trauben vorkommenden *Aspergilli* außer von Pflanzenoberflächen vor allem auch aus dem Boden isoliert werden können, wurde der ursprüngliche Arbeitsplan um ein systematisches Screening nach geografischer Verteilung ergänzt. Dazu wurden nach einem festgelegten Raster überwiegend Boden-, teilweise auch Rindenproben aus Weinbergen verschiedener deutscher Anbaugebiete entnommen und auf das Vorhandensein potentieller OTA-Bildner untersucht. Darüber hinaus sollten während des Untersuchungszeitraums möglichst viele Trauben mit Fäulnissymptomen analysiert und die verursachenden Pilze identifiziert werden. Es sollten außerdem Proben aus Parzellen mit verschiedenen Sorten, Erziehungssystemen und Bewirtschaftungsweisen (z.B. Ökoparzellen) untersucht werden.

### **1.1.2 Identifizierung der beteiligten Arten**

Alle Isolate wurden zunächst auf ihre Fähigkeit zur OTA-Bildung untersucht. Da verschiedene Arten der Gattung *Aspergillus* sowie einige *Penicillium*-Arten zur Bildung von OTA befähigt sind, wurden die OTA-bildenden Isolate näher bestimmt. Für einige Arten stehen mittlerweile artspezifische PCR-Primer zur Verfügung. Sie wurden auf ihre Eignung überprüft und gegebenenfalls zur Identifizierung eingesetzt. Außerdem konnten verschiedene morphologische und biochemische Parameter als Bestimmungsmerkmale herangezogen werden.

### **1.1.3 Untersuchungen zur OTA-Bildung**

Pilzisolat, die aufgrund morphologischer Merkmale als potenziell OTA-bildende Arten eingestuft wurden, wurden zunächst in vitro unter standardisierten Bedingungen auf ihre Fähigkeit zur Bildung von Ochratoxin A überprüft.

Für Untersuchungen zur OTA-Bildung unter den hiesigen Klimabedingungen im Freiland wurden Trauben künstlich mit charakterisierten OTA-Bildnern inokuliert und die Entwicklung der Fäulnis bonitiert.

In Anlehnung an die Arbeiten von Walter (2008) wurden außerdem unter definierten Laborbedingungen Infektionsversuche mit Einzelbeeren durchgeführt. Damit sollten epidemiologi-

sche Kenntnisse zur Ausbreitung des Inokulums, der Infektionswege der Pilze und dem daraus resultierenden Risiko für Infektionen an Trauben gewonnen werden. Im Rahmen dieser Versuche wurde auch untersucht, welchen Einfluss eine Behandlung mit verschiedenen Fungiziden auf den Infektionsverlauf hat.

#### **1.1.4 Analyse von Wein und Traubenmost auf OTA-Gehalte**

Zur Abschätzung, ob bereits in jüngerer Vergangenheit Bedingungen für die Bildung von OTA in deutschen Weinbaugebieten gegeben waren, sollten deutsche Weine verschiedener Jahrgänge auf Kontaminationen mit OTA analysiert werden. Bevorzugt wurden Weine höherer Qualitätsstufen untersucht sowie Eisweine und Weine aus Rebsorten die stärker zur Fäulnis neigen. Darüber hinaus war die Analyse von Traubenmostproben aus faulen Trauben vorgesehen. Ergänzend zu den Messungen in Weinen höherer Qualitäten wurden auch Discoun-ter-Weine nationaler und internationaler Herkunft auf mögliche Ochratoxin A-Gehalte analysiert.

#### **1.1.5 Einfluss kellertechnischer Verfahren auf Ochratoxin A-Gehalte**

Ergänzend zum ursprünglichen Arbeitsplan sollte in einer ersten orientierenden Untersuchung die Möglichkeit einer OTA-Bildung im Lesegut bzw. das Verhalten vorhandenen Ochratoxins A während der Weinherstellung untersucht werden.

Eine OTA-Bildung im Lesegut wäre vor allem bei der Rotweinherstellung im Zeitraum vom Einmaischen bis zur Kelterung denkbar. Fast 40 Prozent der in Deutschland angebauten Reben sind mittlerweile rote Sorten. Davon werden zwischen 30 und 50 % als Maische über 8 bis 10 Tage vergoren. Damit hat das Verfahren der Maischegärung als Quelle möglicher OTA-Kontaminationen in Deutschland erheblich an Bedeutung gewonnen. Es soll untersucht werden, ob es während der Maischestandzeiten bei kontaminiertem Lesegut zu einer OTA-Bildung kommen kann und was mit eventuell vorhandenem Ochratoxin A während des weiteren Weinbereitungsprozesses geschieht.

Auch bei verschiedenen Weißweinsorten sollte untersucht werden, ob vorhandene Kontaminationen mit Ochratoxin A durch die verschiedenen Prozesse bzw. Behandlungen während der Weinbereitung beeinflusst werden. Dies betrifft vor allem die Gärung, die Schwefelung sowie verschiedene Schönungsverfahren (Gelatine, Bentonit, Aktivkohle). Die Angaben in der Literatur hierzu sind teilweise widersprüchlich.

### 1.1.6 Zeitplan

Tätigkeit/Quartal	2007		2008				2009				2010				2011	
	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2
Sammeln von Isolaten von faulen und geschädigten Trauben, Frucht mumien																
<b>Sammlung von Aspergillus-Isolaten aus Bodenproben deutscher Weinbaugebiete</b>																
Screening aller Isolate auf Fähigkeit zur OTA-Bildung																
Artbestimmung OTA-bildender Isolate																
Untersuchungen zur OTA-Bildung in vitro und in vivo, Infektionsversuche																
Analyse von Traubenmosten und Weinen auf OTA-Gehalte																
<b>Einfluss kellertechnischer Verfahren auf OTA-Bildung</b>																
Sachbericht																
Zwischenbericht																
Abschließende Analysen, Endauswertung, Endbericht																

### 1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde

Belastungen von Nahrungsmitteln durch Mykotoxine stellen eine ernst zu nehmende Gefahr für die Gesundheit der Verbraucher dar. Aus diesem Grund muss der Prävention der Mykotoxinbildung in pflanzlichen Produkten sowie der Vermeidung der Besiedlung durch die relevanten Schimmelpilzarten als wichtige Maßnahme des vorbeugenden Verbraucherschutzes hohe Priorität eingeräumt werden. Speziell die Kontamination vieler Nahrungs- und Genussmittel, z. B. Getreide, Reis, Erdnüsse, Fleisch- und Wurstwaren, Säfte, Tees, Kaffee und Bier mit Ochratoxin A haben mittlerweile ein bedenkliches Maß angenommen. Besonders häufig wurde Ochratoxin A auch in Traubensäften und Wein (EU 2002, Wolf, Garreis 1999) nachgewiesen. Bisher besteht durch die durchschnittliche Aufnahme von OTA über die verschiedenen Nahrungs- und Genussmittel noch keine unmittelbare Verbrauchergefährdung.

Durch die Verordnung (EG) Nr. 123/2005 der Kommission vom 26. Januar 2005 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 in Bezug auf Ochratoxin A wurden auch für Traubenerzeugnisse folgende Höchstgehalte an Ochratoxin A festgelegt (u. a. Gotter 2005):

- 10 µg/kg für getrocknete Weintrauben (Korinthen, Rosinen und Sultaninen) und
- 2 µg/kg für Wein sowie andere Getränke auf Wein- und/oder Traubenmostbasis oder mit Zusätzen von Wein oder Traubensaft

Ochratoxin A wurde in höheren Konzentrationen vor allem in Weinen aus Südeuropa gefunden, Produkte aus roten Rebsorten erwiesen sich als häufiger und höher kontaminiert als solche aus weißen Sorten (u. a. Drouillard et al. 2003, LGL Bayern, 2004, Majerus, Otteneder 1996, Jørgensen 2005, Varga, Kozakiewicz 2006, Zimmerli et al., 1996,).

OTA kann von einer ganzen Reihe verschiedener Schimmelpilzarten der Gattung *Aspergillus*, aber auch von einigen *Penicillien* (z. B. *Penicillium verrucosum*, *P. nordicum*) gebildet werden. In den Ländern des mediterranen Raumes spielen vor allem der thermo- und xerophile Pilz *Aspergillus carbonarius*, aber auch andere Vertreter der „schwarzen“ *Aspergilli*, wie etwa *A. niger* und *A. tubingensis* als OTA-Produzenten auf Trauben eine wichtige Rolle (u. a. Battilani et al. 2002, 2003, 2006, Belli et al. 2005, 2006, Esteban et al. 2004, 2006, Medina et al. 2005, Perrone et al. 2006, Varga et al. 2006). Aus diesen Ländern stammt daher auch die überwiegende Anzahl der Untersuchungen zur Charakterisierung OTA-bildender *Aspergilli* und zum Einfluss weinbaulicher und kellerwirtschaftlicher Maßnahmen auf die OTA-Kontamination weinbaulicher Erzeugnisse. Daten zur Beurteilung der Situation in deutschen Weinbaugebieten existieren diesbezüglich bisher nicht.

Die warmen und trockenen oder durch extreme Niederschlagsverteilung geprägten Sommer der letzten Jahre haben dazu beigetragen, dass mittlerweile auch in den deutschen Anbaugebieten besondere Fäulniskomplexe an Trauben aufgetreten sind, die in diesem Ausmaß noch nicht beobachtet wurden. Daran sind neben verschiedenen *Penicillium*-Arten häufig auch Pilze der Gattung *Aspergillus* beteiligt.

So konnten beispielsweise 2005 vermehrt *Aspergilli* der Section Nigri aus verschiedenen Weinbergen isoliert werden, von denen ein Teil den Arten *A. tubingensis* und *A. niger* (bzw. *A. awamori*) zugeordnet werden konnten. Es ist nicht mehr auszuschließen, dass auch die Art *Aspergillus carbonarius* oder andere Arten, die zur Bildung von OTA befähigt sind, in den deutschen Anbaugebieten zur Entwicklung kommen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Sammlung von *Aspergillus*-Isolaten

#### 2.1.1 Probenahme zur Gewinnung von Isolaten

Nach einem zuvor festgelegten geografischen Raster wurden aus insgesamt 197 Weinbergen der verschiedenen deutschen Anbaugebiete (außer Anbaugebiet Sachsen) systematisch Boden- und teilweise auch Rindenproben entnommen. Dazu wurden aus den ausgewählten Rebanlagen mit Stechzylindern jeweils 10 Proben des Oberbodens (bis ca. 5 cm Tiefe, jeweils etwa 100 g) entnommen und zu einer Mischprobe vereinigt.

An einigen Standorten wurde außerdem von 10 verschiedenen Rebstöcken etwa 10-20 g Rinde abgeschält und ebenfalls zu einer Mischprobe vereint. Durch weiteres Zerkleinern wurde die Homogenität der Mischprobe erhöht. Zur Bestimmung des Inokulums je g Trockengewicht Boden bzw. Rinde wurde von jeweils 50 g Boden bzw. 10 g Rinde das Trockengewicht festgestellt.

Zur Gewinnung der Isolate aus Boden wurden 5 g der Boden-Mischprobe über eine Verdünnungsreihe auf Biomalz-Agar (BA) ausplattiert.

Da sich in früheren Versuchen ein Abspülen von Rebteilen mit Wasser (+ 0,05 % Tween 80) zur Gewinnung von Isolaten nicht bewährt hat, wurden je 3 g der Rinden-Mischprobe direkt auf Biomalz-Agarplatten ausgelegt.

Nach 10 Tagen Inkubation bei 25 °C wurde die Anzahl Kolonie bildender Einheiten (colony forming units, cfu) je Gramm Trockengewicht Boden (s. Tabelle 25, Anhang) bzw. Rinde ermittelt. Die Selektion der *Aspergillus*-Kolonien erfolgte anhand morphologischer Merkmale vor allem der Konidien und Konidienträger. Insgesamt wurden mehr als 750 *Aspergillus*-Isolate gesammelt. Die Isolate stammen überwiegend von Boden, aber auch von Rinden- und Traubenproben. Da die Gewinnung von Isolaten aus Bodenproben bessere Ergebnisse ergab, wurde im weiteren Verlauf der Arbeiten auf die Gewinnung von Isolaten aus Rindenproben verzichtet.

Alle Isolate wurden zunächst in Laborversuchen auf die Fähigkeit zur OTA-Bildung untersucht und von den OTA-bildenden Isolaten die Art bestimmt.

Außer von verschiedenen Standorten und Rebsorten wurden Isolate auch z. B. speziell von Trauben mit bestimmten Vorschädigungen (Sonnenbrand, Ausdünnen mit dem Vollernter) und anschließender Fäulnis entnommen.

## 2.1.2 Analytik von Ochratoxin A

### 2.1.2.1 Messung und Detektion

Zur Messung des Ochratoxin A-Gehaltes wurden die folgenden analytischen Methoden verwendet:

#### Probenaufarbeitung:

Festphasenextraktion über RP-18 Säulen, Elution mit je 2,5 ml Acetonitril und 2 ml Ethylacetat. Anschließend Clean-up über Silica-Gel, Elution mit 1:1 Hexan - Aceton

#### Detektion und Quantifizierung: mit Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

- Pumpe und Probenautomat: Knauer
- Detektion: Fluoreszenz-Detektor (WLex 330 nm, WLeM 460 nm)
- Säulen: Jupiter C18, 250 x 4 mm, 5 µ und Hyperclone C18, 125 x 4 mm, 3 µ
- Eluent:
  - Laufmittel A: 4 mM Natriumacetat-Puffer/Acetonitril 80:20
  - Laufmittel B: 4 mM Natriumacetat-Puffer/Acetonitril 52:48
  - Gradiententabelle:

Zeit (min)	A (%)	B (%)	Fluss (ml/min)
Initial	100	0	1,00
5,00	100	0	1,00
10,00	0	100	1,00
23,00	0	100	1,00
26,00	100	0	1,00
30,00	100	0	1,00

### 2.1.2.2 Methodvalidierung, Wiederfindungsraten

Die Extraktionsmethode wurde für den jeweils anfallenden Analyten durch Aufstockungsversuche überprüft. Dazu wurden Kulturmedien, Wein- bzw. Mostproben zusätzlich mit Standard an Ochratoxin A in den Konzentrationen 0,1; 1,0; 5,0 oder 10,0 µg versetzt. Danach erfolgte die Probenaufarbeitung durch Festphasenextraktion über RP-18 Säulen und anschließende Reinigung des Extrakts über Silica-Gel.

Die Wiederfindungsraten lagen in Abhängigkeit von den Matrixeffekten zwischen 87 und 98 Prozent:

- Süßreserve (Huxelrebe): 87 – 90 %
- Rotweine: 89 % (Dornfelder) bis 96 % (Spätburgunder)
- Weißweine und Moste, in Abhängigkeit vom Restzucker: 92 – 98 %

Die Absicherung positiver Befunde an Ochratoxin A erfolgte durch das Signal eines Dioden-Array-Detektors. Die Detektion wurde bei einer Wellenlänge von 333 nm durchgeführt. Bei der entsprechenden Retentionszeit konnten dann die Absorptionsmaxima des Ochratoxins A von 248 und 333 nm überprüft und damit der Befund des Fluoreszenzdetektors abgesichert werden.

Zur Methodenvalidierung wurden HPLC-Messungen mit einer Kinetex 2.6  $\mu$  PFP 100 Å Säule durchgeführt und folgende Eluenten benutzt:

- Laufmittel A: 4 mM Natriumacetat-Puffer/Methanol 50:50
- Laufmittel B: 4 mM Natriumacetat-Puffer/Methanol 5:95
- Gradiententabelle:

Zeit (min)	A (%)	B (%)	Fluss (ml/min)
Initial	100	0	0,60
7,00	100	0	0,60
12,00	0	100	0,60
24,00	0	100	0,60
27,00	100	0	0,60
30,00	100	0	0,60

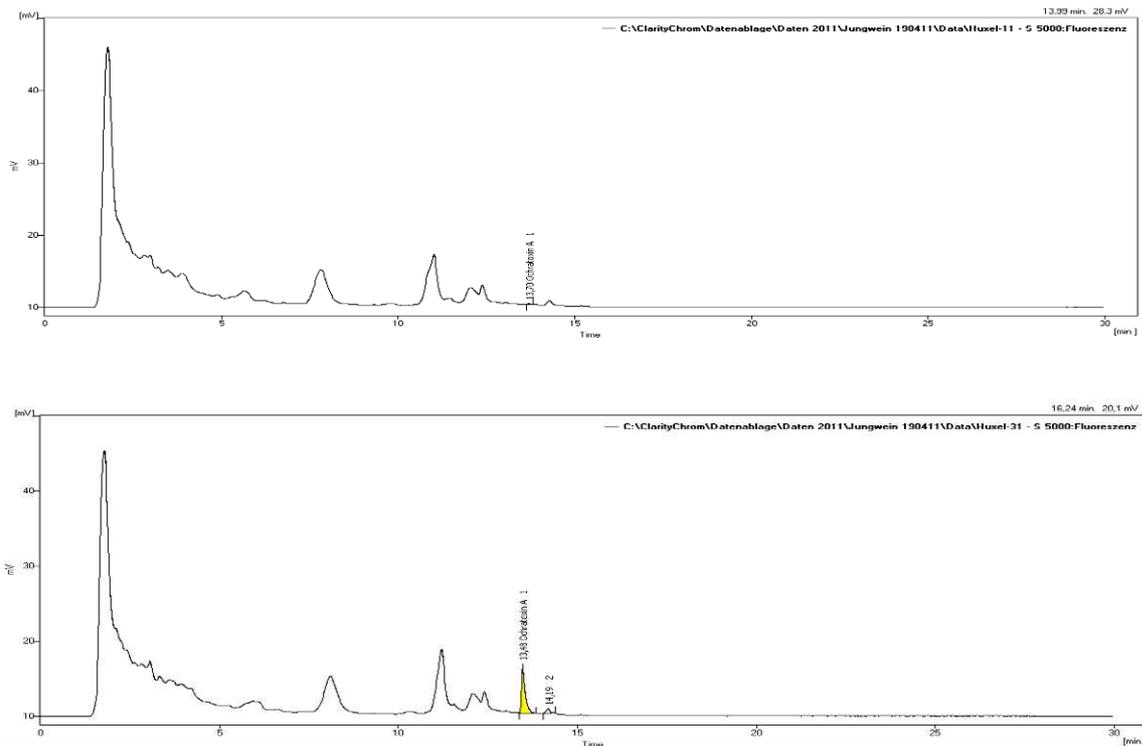


Abbildung 1: HPLC-Chromatogramm Most (Huxelrebe) ohne (oben) und mit 5 µg Ochratoxin A-Dotierung

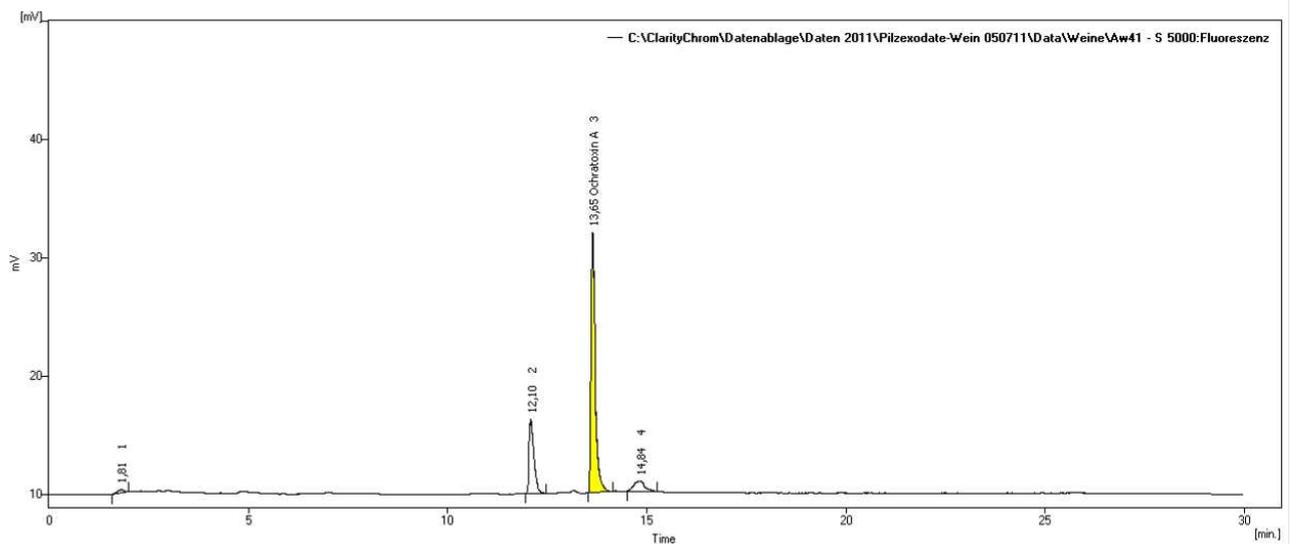


Abbildung 2: HPLC-Chromatogramm einer mit Ochratoxin A kontaminierten Mostprobe

Die Überprüfung der Injektionsgenauigkeit sowie der Linearität der Fluoreszenz-Detektion bei verschiedenen Konzentrationen ergab die in Tabelle 1 aufgeführten Werte. Der Response-Faktor beträgt 0,0245, die lineare Regression der erhaltenen Geraden liegt bei 99,38 %.

**Tabelle 1: Validierung HPLC-Messung: Injektionsgenauigkeit, Linearität der Fluoreszenz-Detektion**

Konz. OTA µg/ml	Peakflächen bei Injektion						Standardabweichung	
	1	2	3	4	5	Mittelwert	abs.	rel. %
0,1	5,024	4,245	4,949	4,583	4,549	4,670	0,28	5,96
0,5	21,166	20,432	21,617	21,125	20,275	20,923	0,50	2,39
1,0	44,641	44,507	43,493	42,924	42,377	43,588	0,88	2,02
5,0	215,514	214,442	215,350	216,128	217,760	215,839	1,10	0,51
10,0	399,967	402,155	402,024	401,203	403,557	401,781	1,18	0,29

### 2.1.3 Screening auf OTA-Bildung

Das Screening der *Aspergillus*-Isolate auf OTA-Bildung wurde mit Standkulturen (14 Tage bei 25 °C in Dunkelheit) auf Biomalz-Medium (2 %) durchgeführt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wird das Myzel extrahiert, der Myzelextrakt filtriert und mit dem Flüssigmedium vereint. Nach Untersuchungen von Atoui et al. (2007) an verschiedenen Isolaten von *Aspergillus carbonarius* werden 60 – 70% des gebildeten Ochratoxin A in den Konidien angehäuft. Auch bei anderen *Aspergillus*-Arten sind die gefundenen OTA-Konzentrationen nach Aufarbeitung des Kulturmediums einschließlich einer Myzelextraktion deutlich höher als bei einer Extraktion ohne Myzelextraktion.

Bestimmt wurden das Myzeltrockengewicht und die Ochratoxin A-Konzentration im Medium.

## 2.2 DNA-Isolation und Identifizierung isolierter Arten

Zur molekularbiologischen Identifizierung der *Aspergillus*-Isolate mittels PCR wurden verschiedene Primer geprüft. Zum einen wurden unspezifische Primer der ITS-Region, des  $\beta$ -Tubulin-Gens und des Calmodulin-Gens eingesetzt, deren Amplifikate sequenziert wurden und anschließend über einen Sequenzabgleich in der Gendatenbank zur Identifizierung der Art herangezogen wurden. Zum anderen wurden verschiedene, laut Literatur spezifische, Primer der Arten *A. tubingensis*, *A. carbonarius*, *A. niger* und *A. japonicus* auf ihre Spezifität hin geprüft und für ein Screening der Ochratoxin A-bildenden Isolate eingesetzt. Die genannten Arten sind häufig vorkommende *Aspergillus*-Arten mit schwarzen Konidien bzw. Konidienträgern und wurden teilweise schon als OTA-Bildner in der Literatur genannt (u. a. Samson et al. 2004; Medina et al. 2008, Visconti et al. 2008, s. auch Abschnitt 1.2). Die nachfol-

gende methodische Vorgehensweise wurde mit den schwarzen *Aspergillus*-Isolaten durchgeführt.

### **2.2.1 Isolation der DNA**

- Myzelplatte mit flüssigem Stickstoff fluten, abschaben und in ein 1,5 ml Eppendorf-tube geben (Probenmenge: 50-100mg)
- Probe mit flüssigem Stickstoff und Retsch-Mühle (MM 400) zermörsern
- 500 µl Extraktionspuffer (200mM Tris HCL pH 8,5; 25mM NaCl; 25mM EDTA; 0,5% SDS; 0,1ml/100ml Mercaptoethanol) hinzugeben
- 60 min. bei 65°C inkubieren, auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugeben, 10 min. zentrifugieren (13.000 rpm), Überstand in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführen, Vorgang wiederholen
- 10 µl RNase (10mg/ml) hinzugeben und für 60 min. bei 37°C inkubieren
- 0,5 faches Volumen 7,5 M Ammoniumacetat (pH 6,0) hinzugeben, kurz schwenken
- 10 min. zentrifugieren (13000rpm), Überstand in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführen
- 1/9 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 0,5faches Volumen Isopropanol hinzugeben
- 10 min. auf Eis inkubieren, danach 20 min. zentrifugieren (13000 rpm)
- Überstand abgießen und bei Raumtemperatur trocknen lassen
- Pellet in 50 µl TE-Puffer lösen und bei 4°C lagern

### **2.2.2 PCR-Verfahren**

Alle PCR-Ansätze wurden mit den puReTaq™ Ready-To-Go™ PCR beads (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Für 25 µl-Ansätze wurden je 3 µl DNA eingesetzt. Die Reaktionen erfolgten in einem Thermocycler (Gene Amp®, PCR SYSTEM 2700, Applied Biosystems). Alle Primer-Sequenzen und PCR-Protokolle der angewandten Methoden sind im Anhang aufgeführt.

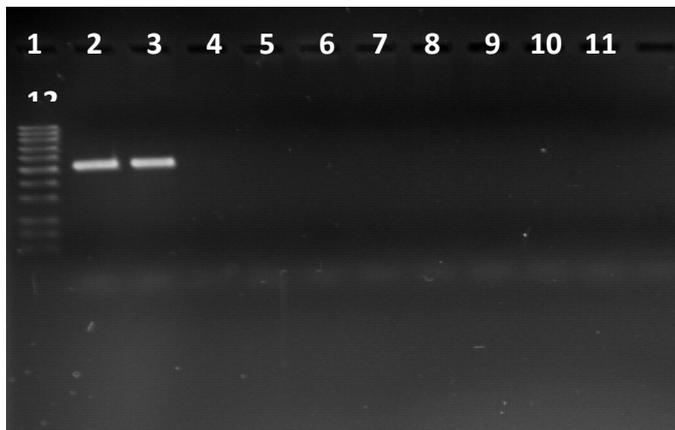
#### **2.2.2.1 Artbestimmung unspezifischer Primer und Sequenzierung**

In den weiteren Untersuchungen wurden nur noch die unspezifischen Primer der ITS-Region (ITS4/ITS5, White et al. 1990) eingesetzt (s. Tabellen 23 und 24, Anhang). Die PCR-Produkte sollten durch eine anschließende Sequenzierung (Fa. MWG) und Sequenzabgleich mit der

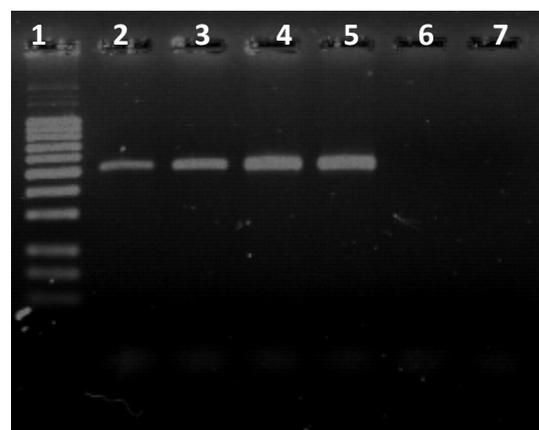
Gendatenbank NCBI (National Center of Biotechnology Information) artspezifisch zugeordnet werden.

### 2.2.2.2 Bestimmung der Art *Aspergillus tubingensis* mittels spezifischer Primer

Da mit den Isolaten 8550, 8557, 8582 und 8584 eine 99 %-ige Sequenzhomologie mit *A. tubingensis* bestand, wurden in einem weiteren Ansatz für den gezielten Nachweis der Art *A. tubingensis* das Primer-Paar TUB1 und TUB2 nach Susca et al. (2007) eingesetzt. Andere *Aspergillus*-Stämme sollten kein PCR-Produkt aufweisen. Die Spezifität der Primer wurde mit verschiedenen Referenzstämmen der Arten *A. tubingensis*, *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. awamori*, *A. foetidus* und *A. niger* überprüft. Das PCR-Produkt sollte für *A. tubingensis* eine Länge von 505 bp ergeben. Der Nachweis mittels Agarose-Gelelektrophorese (1,8 %) zeigte eine spezifische Reaktion der Primer mit *A. tubingensis*. Keine der anderen *Aspergillus*-Arten zeigte ein Signal (Abbildung 3). Zudem konnten die Isolate 8850, 8557, 8582 und 8584 eindeutig als *A. tubingensis* bestätigt werden (Abbildung 4). Wie anhand der Sequenzierungsergebnisse erwartet werden konnte, zeigte das Isolat 8631 (98-99% *A. niger* / *A. awamori*) kein Signal mit den Primern TUB1/TUB2.



**Abbildung 3:** Überprüfung der Primer TUB1/TUB2 auf Spezifität für *A. tubingensis*. 1:100bp DNA-Leiter; 2: *A. tubingensis* (CBS 115.29); 3: *A. tubingensis* (CBS 134.48); 4: *A. carbonarius* (CBS 111.26); 5: *A. carbonarius* (CBS 101.14); 6: *A. japonicus* (CBS 113.48); 7: *A. japonicus* (CBS 114.51); 8: *A. awamori* (CBS 121.48); 9: *A. awamori* (CBS 127.48); 10: *A. foetidus* (CBS 114.49); 11: *A. niger* (CBS 119558); 12: *A. niger* (CBS 119559).



**Abbildung 4:** Bestimmung der Art *A. tubingensis* mittels der Primer TUB1/TUB2. 1:100bp DNA-Leiter; 2: Isolat 8850; 3: Isolat 8557; 4: Isolat 8582; 5: Isolat 8584; 6: Isolat 8631; 7: neg. Kontrolle.

Das Screening der Ochratoxin A-bildenden Isolate mit den Primern TUB1/TUB2 erbrachte bisher 27 positive Signale. Ein Ausschnitt aus dem Screening ist in Abbildung 5 dargestellt.

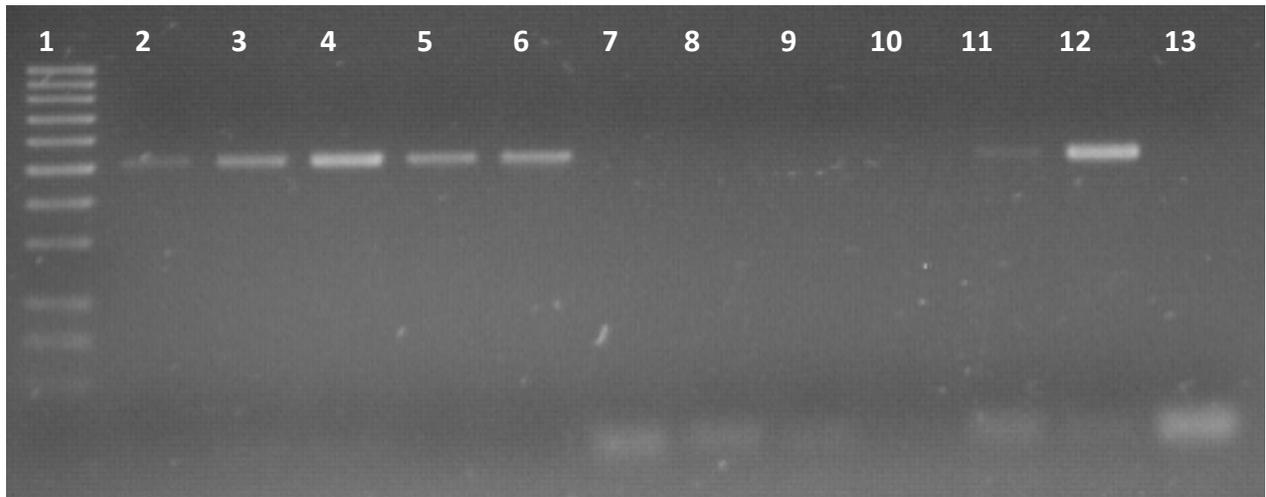


Abbildung 5: Ausschnitt aus dem Screening der OTA-bildenden Isolate mit den Primern TUB1/TUB2.

1: 100 bp DNA-Leiter; 2: Isolat 8551; 3: Isolat 8615; 4: Isolat 8619; 5: Isolat 8633; 6: Isolat 8634; 7: Isolat 8677; 8: Isolat 8691; 9: Isolat 8693; 10: Isolat 8716; 11: Isolat 8751; 12: *A. tubingensis* (CBS 115.29); 13: neg. Kontrolle

### 2.2.2.3 Bestimmung der Art *Aspergillus niger* mittels spezifischer Primer

In einem weiteren Schritt wurde ein spezifischer Nachweis der Art *A. niger* mit den Primern NIG1/NIG2 nach Susca et al. (2007) und den Primern ITS1/NIG nach Gonzales-Salgado et al. (2005) überprüft. Sowohl die PCR-Reaktion mit den Primern NIG1/NIG2 (PCR-Produkt 245 bp, Abbildung 6) als auch die Reaktion mit den Primern ITS1/NIG (PCR-Produkt 520 bp, Abbildung 7) zeigten Signale bei Referenzstämmen der Arten *A. niger* und der sehr eng verwandten Art *A. awamori*. Da eine Unterscheidung dieser beiden Arten auch anhand morphologischer, physiologischer oder chemischer Daten kaum möglich ist (Perrone et al., 2011), wird im weiteren Verlauf die Art mit *A. niger/awamori* bezeichnet.

Die Primer ITS1/NIG zeigten außerdem ein Signal bei den Referenzstämmen der Art *A. tubingensis* und erwiesen sich somit als noch unspezifischer als die PCR mit den Primern NIG1/NIG2. Für das weitere Screening der Isolate wurden demnach die Primer NIG1/NIG2 eingesetzt.

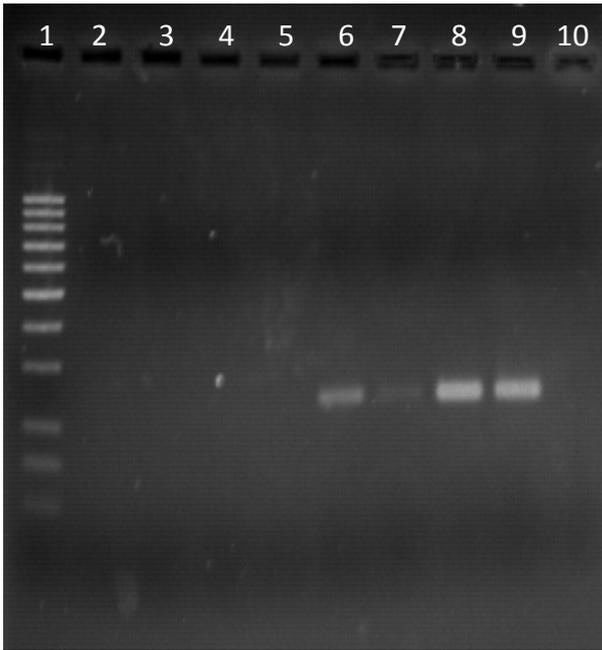


Abbildung 6: Prüfung der Primer NIG1/NIG2 auf Spezifität für die Art *A. niger*. 1:100bp DNA-Leiter; 2: *A. carbonarius* (CBS 111.26); 3: *A. carbonarius* (CBS 101.14); 4: *A. tubingensis* (CBS 115.29); 5: *A. tubingensis* (CBS 134.48); 6: *A. niger* (CBS 119.558); 7: *A. niger* (CBS 119.559); 8: *A. awamori* (CBS 121.48); 9: *A. awamori* (CBS 127.48); 10: neg. Kontrolle.

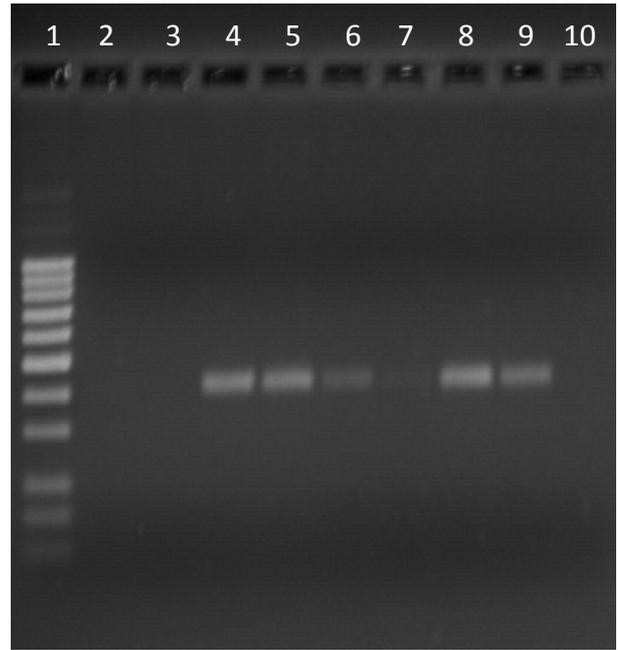


Abbildung 7: Prüfung der Primer ITS1/NIG auf Spezifität für die Art *A. niger*. 1:100bp DNA-Leiter; 2: *A. carbonarius* (CBS 111.26); 3: *A. carbonarius* (CBS 101.14); 4: *A. tubingensis* (CBS 115.29); 5: *A. tubingensis* (CBS 134.48); 6: *A. niger* (CBS 119.558); 7: *A. niger* (CBS 119.559); 8: *A. awamori* (CBS 121.48); 9: *A. awamori* (CBS 127.48); 10: neg. Kontrolle.

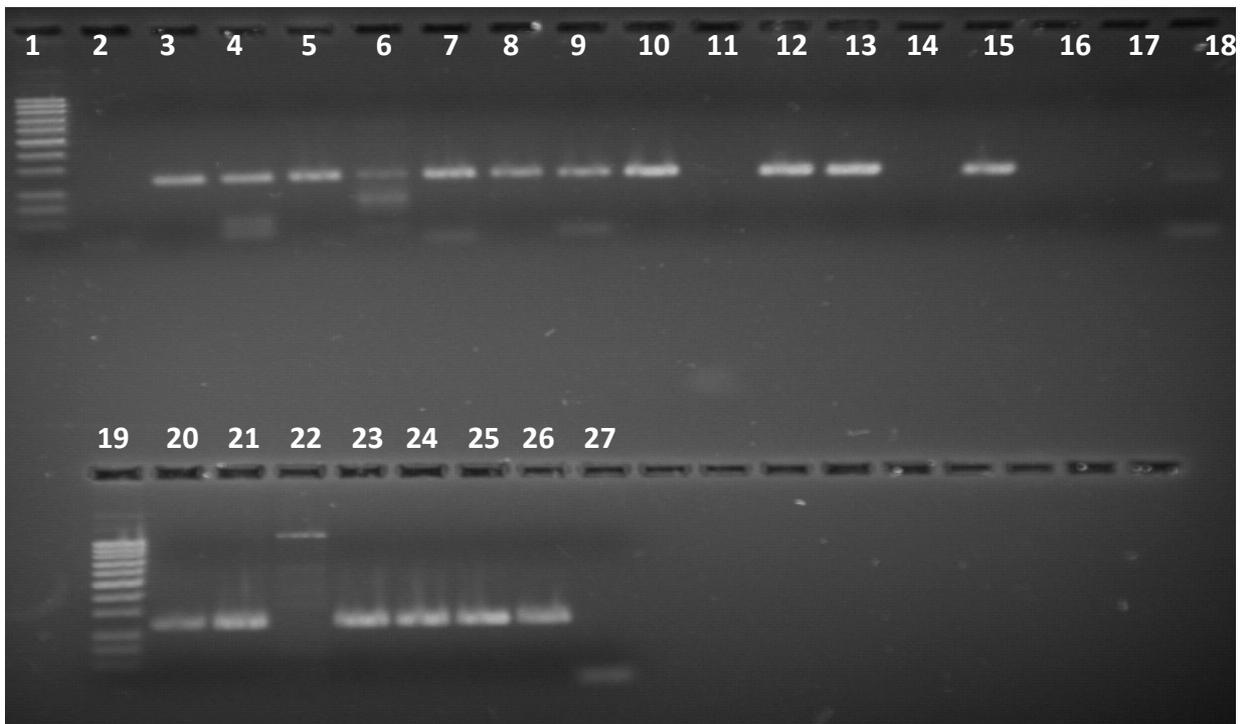


Abbildung 8: Ausschnitt aus dem Screening der OTA-bildenden Isolate mit den Primern NIG1/NIG2. 1: 100 bp DNA Leiter; 2: Isolat 8551; 3: Isolat 8561; 3: Isolat 8562; 4: Isolat 8568; 5: Isolat 8575; 6: Isolat 8575; 7: Isolat 8578; 8: Isolat 8580; 9: Isolat 8581; 10: Isolat 8583; 11: Isolat 8596; 12: Isolat 8601; 13: Isolat 8628; 14: Isolat 8660; 15: Isolat 867 2; 16: Isolat 8673; 17: Isolat 8677; 18: Isolat 8680; 19: DNA Leiter; 20: Isolat 8681; 21: Isolat 8683; 22: Isolat 8691; 23: *A. niger* (CBS 119.558); 24: *A. niger* (CBS 119.559); 25: *A. awamori* (CBS 121.48); 26: *A. awamori* (CBS 127.48); 27: neg. Kontrolle

#### 2.2.2.4 Bestimmung der Art *Aspergillus carbonarius* mittels spezifischer Primer

In einem weiteren Schritt wurden spezifische Primer für die Art *A. carbonarius* (CARBO1 / CARBO2) nach Perrone et al. (2004) geprüft. Die Primer erwiesen sich als spezifisch für die Art *A. carbonarius* (Abbildung 9). Von den untersuchten OTA-bildenden Isolaten ist keines der Art *A. carbonarius* zuzuordnen.

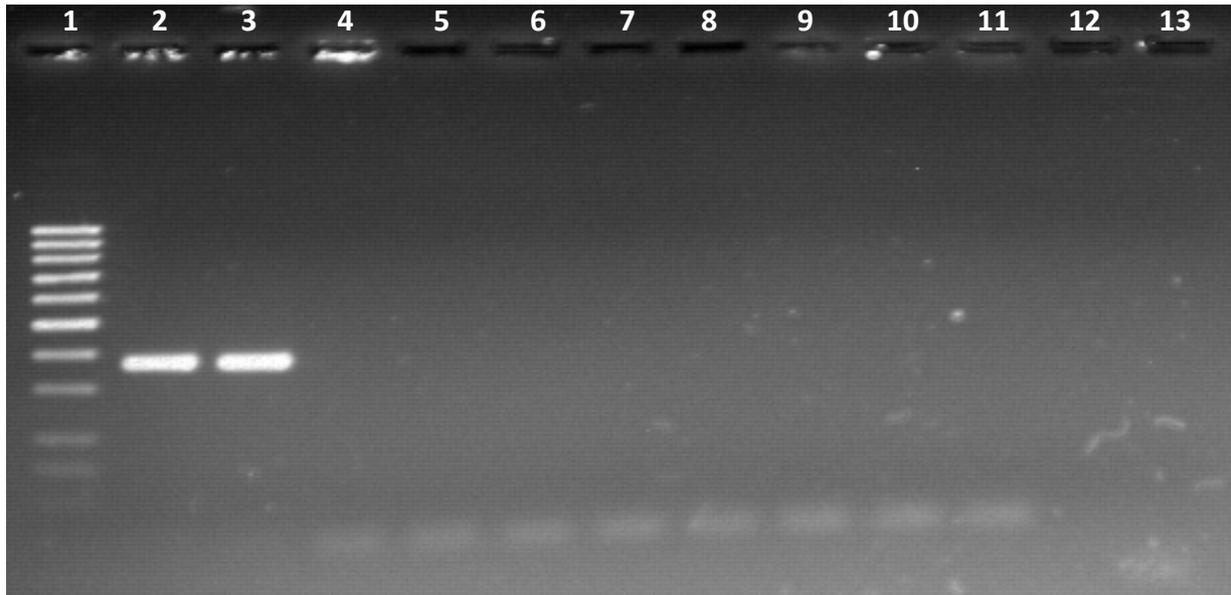


Abbildung 9: Prüfung der Primer CARBO1/CARBO2 auf Spezifität für die Art *A. carbonarius*. 1:100bp DNA-Leiter; 2: *A. carbonarius* (CBS 111.26); 3: *A. carbonarius* (CBS 101.14); 4: *A. tubingensis* (CBS 115.29); 5: *A. tubingensis* (CBS 134.48); 6: *A. niger* (CBS 119.558); 7: *A. niger* (CBS 119.559); 8: *A. awamori* (CBS 121.48); 9: *A. awamori* (CBS 127.48); 10: *A. japonicus* (CBS 113.48); 11: *A. japonicus* (CBS 114.51); 12: *A. foetidus* (CBS 114.49); 13: neg. Kontrolle

#### 2.2.2.5 Bestimmung der Art *A. japonicus* mittels spezifischer Primer

Um die Art *A. japonicus* zu bestimmen, wurden die Primer JAPO1/JAPO2 nach Perrone et al. (2004) auf ihre Spezifität hin überprüft. Das Agarosegel zeigte ausschließlich bei den Referenzstämmen der Art *A. japonicus* ein Signal (Abbildung 10). Die Spezifität der Primer für die Art konnte demnach bestätigt werden. Unter den untersuchten OTA-bildenden Isolaten konnte demnach achtmal die Art *A. japonicus* identifiziert werden.

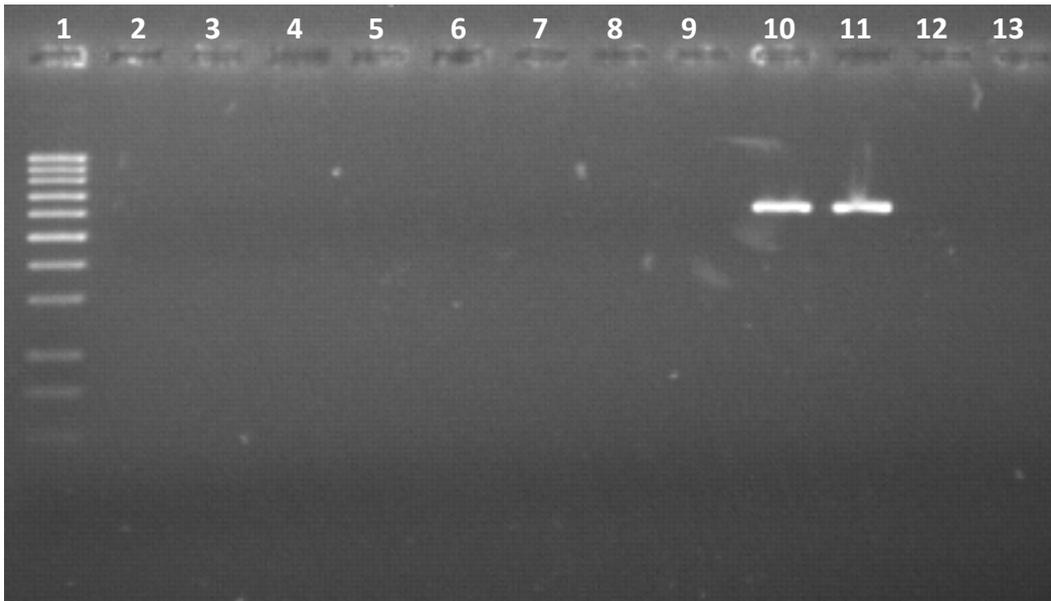


Abbildung 10: Prüfung der Primer JAPO1/JAPO2 auf Spezifität für die Art *A. japonicus*. 1:100bp DNA-Leiter; 2: *A. carbonarius* (CBS 111.26); 3: *A. carbonarius* (CBS 101.14); 4: *A. tubingensis* (CBS 115.29); 5: *A. tubingensis* (CBS 134.48); 6: *A. niger* (CBS 119.558); 7: *A. niger* (CBS 119.559); 8: *A. awamori* (CBS 121.48); 9: *A. awamori* (CBS 127.48); 10: *A. japonicus* (CBS 113.48); 11: *A. japonicus* (CBS 114.51); 12: *A. foetidus* (CBS 114.49); 13: neg. Kontrolle

Für die Bestimmung der Aspergillus-Arten wurden ausschließlich eindeutige Signale als zuverlässige Ergebnisse gewertet. Signale wie beispielsweise in Abbildung 8, Linien 6 und 18 (Isolate 8575 und 8680), wurden erneut überprüft.

#### 2.2.2.6 Bestimmung der Art *Aspergillus wentii*

Zur Artbestimmung der OTA-bildenden Isolate mit gelben Konidienträgern (n= 23) wurden sowohl morphologische Parameter als auch molekularbiologische Methoden herangezogen. Hierzu wurden die Pilze auf speziellen Nährmedien angeimpft. Folgende Nährmedien nach Samson et al. 2004 und Klich 2002 wurden verwendet:

##### Czapek Yeast Autolysate Agar (CYA)

3 g/l NaNO<sub>3</sub>, 5 g/l Hefeextrakt, 30 g/l Saccharose, 13 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3 H<sub>2</sub>O, 0,5 g/l MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0,01 g/l KCl, 0,01 g/l FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0,01 g/l CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O, 0,01 g/l ZnSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 15 g/l Agar, destilliertes Wasser, autoklaviert bei 120°C für 20 min.

##### Yeast Extract Sucrose Agar (YES)

20 g/l Hefeextrakt, 150 g/l Saccharose, 0,5 g/l MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0,005 g/l CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O, 0,01 g/l ZnSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 20 g/l Agar, destilliertes Wasser, autoklaviert bei 120°C für 20 min.

### Creatine Sucrose Agar (CREA)

3 g/l Kreatin, 30 g/l Saccharose, 1,6 g/l  $K_3PO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0,5 g/l  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0,5 g/l KCl, 0,01 g/l  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0,005 g/l  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ , 0,01 g/l  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0,05 g/l Bromcresolblau, 15 g/l Agar, destilliertes Wasser, pH  $8,0 \pm 0,2$ , autoklaviert bei  $120^\circ C$  für 20 min.

### Malt Extract Agar (MEA):

20 g/l Malzextrakt, 1 ml Trace metal-solution (siehe unten), 15 g/l Agar, destilliertes Wasser, pH  $8,0 \pm 0,2$ , autoklaviert bei  $120^\circ C$  für 20 min.

### Czapek Agar (CZ):

30 g/l Saccharose, 3 g/l  $NaNO_3$ , 1 g/l  $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ , 0,5 g/l KCl, 0,5 g/l  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0,01 g/l  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 1 ml Trace metal-solution 15 g/l Agar, auf pH  $6,2 \pm 0,2$  einstellen, autoklaviert bei  $120^\circ C$  für 20 min.

### Trace metal-solution (TMS)

10 g/l  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 5 g/l  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$

### Czapek Yeast Agar mit 20 % Saccharose (CY20S):

1 g/l  $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ , 10 ml Czapek Concentrate (siehe unten), 5 g/l Hefeextrakt, 30 g/l Saccharose, 15 g/l Agar, autoklaviert bei  $120^\circ C$  für 20 min.

### Czapek Concentrate:

300 g/l  $NaNO_3$ , 50 g/l KCl, 50 g/l  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 1 g/l  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 1 g/l  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0,5 g/l  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$

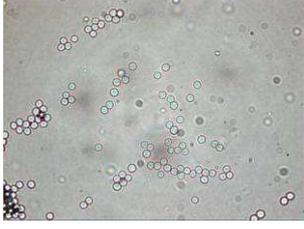
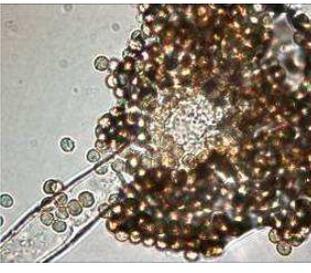
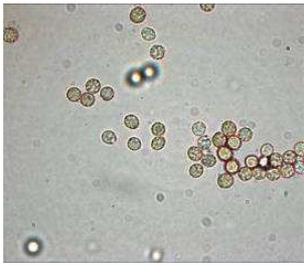
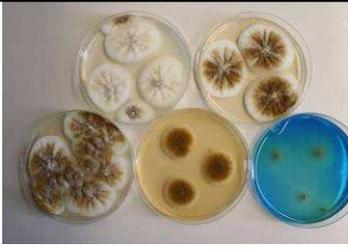
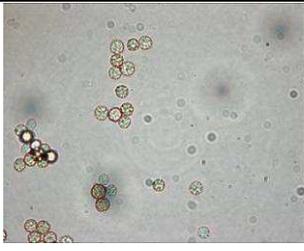
Je drei Platten wurden dreifach mit Konidien suspensionen beimpft. Die Platten wurden sieben Tage bei  $25^\circ C$  in Dunkelheit inokuliert. Danach wurden die Myzeldurchmesser (mm), die Farben der Kolonien und die Formen der Konidienträger und Konidien mikroskopisch ausgewertet. Die gelben *Aspergillus*-Arten *A. wentii* (DSM 3701) und *A. terreus* (Bestimmung durch DSMZ) wurden als Referenzstämme in die Versuchsserie mit aufgenommen. Einige Beispiele der Auswertungen sind fotografisch in Tabelle 3 aufgeführt. Aufgrund der morphologischen Ähnlichkeiten wurden die Isolate in fünf verschiedene Gruppen unterteilt. Je ein Isolat

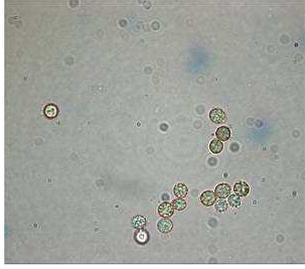
aus jeder Gruppe wurde durch eine ITS-Sequenzierung (siehe Abschnitt 2.2.2.1) einer *Aspergillus*-Art zugeordnet (Tabelle 2).

**Tabelle 2: *Aspergillus*-Isolate, Einteilung in die 5 morphologisch ähnlichen Gruppen und Ergebnisse der Sequenzierung.**

Isolat-Nr.	Sequenziert (ITS-Sequenz)	Gruppe (nach morphologischen Merkmalen)	<i>Aspergillus</i> -Art (ITS-Sequenzierung)
8753	ja	1	<i>A. wentii</i>
8868			
8766			
8708		2	<i>A. wentii</i>
8646	ja		
8726			
8721		3	<i>A. wentii</i>
8722			
8765	ja		
8727			
8763			
8754			
8752		4	<i>A. wentii</i>
8764			
8730			
8709	ja	4	<i>A. wentii</i>
8732			
8867		5	<i>A. wentii</i>
8871	ja		
8861			
8886			
8731			
8870			

**Tabelle 3: Myzelwachstum, Konidienträger und Konidien verschiedener *Aspergillus*-Arten mit gelben Konidienträgern.**

	Myzelwachstum auf speziellen Nährmedien 1: CZ, 2: CY 20S 3:CYA, 4: MEA, 5: CREA	Konidienträger (Lichtmikroskop)	Konidien (Lichtmikroskop)
<i>Aspergillus wentii</i> DSM 3701			
<i>Aspergillus terreus</i> Isolat 8639			
Gruppe1 Isolat 8753 <i>A. wentii</i>			
Gruppe 2 Isolat 8646 <i>A. wentii</i>			
Gruppe 3 Isolat 8765 <i>A. wentii</i>			
Gruppe 4 Isolat 8730 <i>A. wentii</i>			

	Myzelwachstum auf speziellen Nährmedien 1: CZ, 2: CY 20S 3:CYA, 4: MEA, 5: CREA	Konidienträger (Lichtmikroskop)	Konidien (Lichtmikroskop)
Gruppe 5 Isolat 8871 <i>A. wentii</i>			

## 2.2.3 Untersuchungen zu Wachstum und OTA-Bildung in vitro und in vivo

### 2.2.3.1 Infektionsversuche Einzelbeeren

#### Vorversuche:

Um das Infektionsrisiko durch bodenbürtige *Aspergillus*-Arten an Trauben besser einschätzen zu können, wurden Vorversuche mit Beeren der Sorte Thompson Seedless (Herkunft Ägypten) durchgeführt. In den Labortests wurden verschiedene Infektionswege der Arten *A. carbonarius* und *A. tubingensis* untersucht und die Befallsgeschwindigkeit dokumentiert. Die Versuche wurden mit den Referenzstämmen *A. carbonarius* (CBS 111.26) und *A. tubingensis* (CBS 115.29) durchgeführt. Hierzu wurden unterschiedlich behandelte Einzelbeeren (n=20) mit einer Konidien suspension (je  $10^6$  Konidien/ml) mittels Feinzerstäuber tropfnass eingesprüht. Die inokulierten Beeren wurden in einer feuchten Kammer bei 25°C für 4 Tage inkubiert.

#### Versuchsvarianten:

1. Beerenhaut unverletzt
2. Beerenhaut einmalig mit Impfnadel verletzt
3. Beerenhaut mehrfach mit Impfnadel verletzt

Inokulation jeweils mit *A. tubingensis* und *A. carbonarius* von Beeren ohne und mit vorheriger Oberflächensterilisation (Tauchen der Beeren: 30 sec. 70% Ethanol, 2 min. 0,35% Natriumhypochlorit, 30 sec. 70% Ethanol)

Die Bewertung der Befallsstärke an den Einzelbeeren erfolgte mittels eines 12-stufigen Boniturschemas. Dabei wurde der prozentual befallene Anteil der Beere nach folgenden Befallsstufen beurteilt: 0; 1,5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 und 100 %. Für die Berechnung der Befallsstärke über die Wiederholungen wurde das arithmetische Mittel aller Befallswerte gebildet, für die Berechnung der Befallshäufigkeit wurde die Anzahl der befallenen Beeren (Befallsstärke 1 %) in Prozent dargestellt.

#### Einzelbeerenversuche mit Grauburgunder, Riesling und Spätburgunder

Pro Ansatz wurden wie oben beschrieben jeweils 20 Traubenbeeren der Rebsorten Grauburgunder, Riesling und Spätburgunder verwendet. Zur Inokulation dienten Konidiensuspensionen (je  $10^6$  Konidien/ml) verschiedener *Aspergillus*-Arten (Eigenisolate und Referenzstämme). Die Inokulation erfolgte durch das Aufsetzen eines Tropfens (10  $\mu$ l) auf die Verletzung bzw. die intakte Beerenhaut. Inkubiert wurde in feuchten Schalen bei 25 °C mit einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus. Zu den in den Tabellen 27 bis 29 (Anhang) angegebenen Zeitpunkten wurde Befallsstärke und Befallshäufigkeit bonitiert, am Ende des Versuchs wurde auch die in den Beeren erreichte OTA-Konzentration ermittelt.

#### **2.2.3.2 Infektionsversuche Trauben in vitro**

Trauben der Sorten Riesling und Cabernet Sauvignon (Jahrgang 2009) wurden mit Nadeln verletzt, mit Konidiensuspensionen ( $2 \times 10^6$  Konidien/ml) besprüht und anschließend eine Woche bei 21 °C im Brutschrank inkubiert. Verwendet wurden Konidiensuspensionen von *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* sowie einer Mischung der drei Pilzkulturen.

#### **2.2.3.3 Infektionsversuche Trauben Freiland**

##### Infektionsversuche Herbst 2009

Im Herbst 2009 wurden Freiland-Infektionsversuche an den Rebsorten Riesling, Grauburgunder und Spätburgunder durchgeführt. Jeweils zwei Trauben pro Variante wurden mit einer Konidiensuspension besprüht. Bei den Varianten mit Verletzung wurden die Traubenbeeren zuvor mit einem Nadelkissen angestochen. Beginn des Versuchs 18.09.09, Lese der Versuchsvarianten 14.10.09. Von allen Varianten wurde die OTA-Konzentration im Traubensaft gemessen.

### Infektionsversuche Herbst 2010

Die Freiland-Infektionsversuche wurden im Herbst 2010 fortgeführt. Dazu wurden an drei verschiedenen Standorten im doppelten Ansatz jeweils drei gesunde Trauben (Rebsorten Grauburgunder, Riesling, Spätburgunder) je Variante wie folgt behandelt:

- verletzt (Nadelkissen) inokuliert mit Konidiensuspension ( $10^6$  Konidien/ml) von OTA-bildenden *Aspergillus*-Isolaten verschiedener Herkünfte
- verletzt, ohne Inokulation
- unverletzt, inokuliert mit Konidiensuspension ( $10^6$  Konidien/ml)
- unverletzt, ohne Inokulation als Kontrolle

#### **2.2.4 Analyse von Weinen und Traubenmosten auf OTA-Gehalte**

Insgesamt wurden 453 Weine auf mögliche OTA-Gehalte analysiert, davon 315 deutsche Weine aus verschiedenen deutschen Weinanbaugebieten. Die untersuchten Weine stammten zum Teil aus dem Premiumsegment, zum Teil handelte es sich aber auch um Discountware (65 Weine). Rote Traubensorten waren mit 52 Prozent vertreten. Die ausländischen Weine stammten überwiegend aus europäischen Ländern (z. B. Frankreich, Italien, Bulgarien, Ungarn, Österreich), vertreten waren aber auch Weine zum Beispiel aus Neuseeland, Chile und den USA.

Auswahlkriterien für die Weine waren vor allem die Traubensorte und die Qualitätsstufe bzw. die Art der Traubenerzeugung (Eiswein). Es wurden in erster Linie Traubensorten ausgewählt, die stärker zu Fäulnis neigen, wie z. B. Burgundersorten und Riesling. Qualitätsstufen wie Auslesen und Trockenbeerenauslesen sowie Eisweine wurden ebenfalls bevorzugt analysiert.

## 2.2.5 Einfluss kellertechnischer Verfahren auf OTA-Gehalte

### 2.2.5.1 Gär- und Schönungsversuche

#### Versuchsvarianten:

Mit Modellversuchen in kleinem Maßstab sollte untersucht werden, ob die Konzentration von in Mosten enthaltenem Ochratoxin A durch Schwefelung, Gärung oder Schönungsmaßnahmen beeinflusst werden kann. Dazu wurden in 500 ml Rollflaschen mit Gäraufsatz (Abbildung 11) jeweils 400 ml Most bzw. 400 g Maische verschiedener Rebsorten eingefüllt und je nach Versuchsvariante gemäß Tabelle 4 weiterbehandelt. Es wurden Varianten mit 2 und 10 µg/l Ochratoxin A angesetzt, jeweils mit einer Wiederholung. Zur Vergärung wurde mit Reinzuchthefer beimpft und der Gärverlauf durch tägliches Wiegen festgehalten. Die Vergärung erfolgte bei konstanten Temperaturen von 17 °C bei Weißweinsorten und 21 °C bei Rotweinen im Klimaschrank (Abbildung 12).

#### Verwendete Materialien:

- Moste der Rebsorten Huxelrebe, Silvaner, Riesling und Spätburgunder
- Reinzuchthefen: SIHA Aktivhefe (3 g in 90 ml), 3 ml je Ansatz (Weißmoste), BM (Lavin) 4 g/100 ml, 1 ml Ansatz (Rotweinmaische)
- Schwefel und Schönungsmittel: handelsübliche, in der Kellerwirtschaft eingesetzte Materialien, die Dosagen beruhen auf folgenden Zugaben, berechnet pro hl:
  - Kaliumdisulfid ( $K_2S_2O_5$ ): 10 g/hl



Abbildung 11: Gäraufsatz in 500 ml Rollflasche



Abbildung 12: Kontrollierte Vergärung im Klimaschrank

- Aktivkohle 30 g/hl
- Gelatine: 20 g/hl
- Bentonit: 200 g/hl

**Tabelle 4: Behandlungsvarianten Gär- und Schönungsversuche**

Variante/untersuchte Einflussfaktoren	OTA-Konz. (µg/l)	Mostbehandlung je Ansatz	Weinbehandlung je Ansatz	Analyse von
Kontrolle	-	-	-	Jungwein
Gärung	2 bzw. 10	-	-	Hefetrub, Jungwein
Schwefelung	2 bzw. 10	40 mg Kaliumdisulfit	40 mg Kaliumdisulfit	Hefetrub, Wein
Aktivkohle	2 bzw. 10	120 mg Aktivkohle	120 mg Aktivkohle	Jungwein
Gelatinezugabe Most	2 bzw. 10	80 mg Gelatine	-	Hefetrub, Jungwein
Bentonitzugabe Most	2 bzw. 10	800 mg Bentonit	-	Hefetrub, Jungwein
Bentonitzugabe Wein	2 bzw. 10	-	800 mg Wein	Hefetrub, Wein
Schwefelung + Schönung I	2 bzw. 10	40 mg Kaliumdisulfit 120 mg Aktivkohle	40 mg Kaliumdisulfit 800 mg Aktivkohle	Hefetrub, Jungwein
Schwefelung + Schönung II	2 bzw. 10	40 mg Kaliumdisulfit 80 mg Gelatine	40 mg Kaliumdisulfit 800 mg Aktivkohle	Hefetrub, Jungwein

### 2.2.5.2 Maischegärung

#### Versuchsvarianten:

Zur Überprüfung, ob es während einer Maischegärung zur Bildung von Ochratoxin A kommen kann, wurden geschlossene (30 l Speidel Maischefässer) bzw. offene Behälter mit je 20 kg Maische der Rebsorten Portugieser bzw. Spätburgunder befüllt, teilweise mit Reinzuchtheefe versetzt und mit je 100 ml einer gemischten Konidiensuspension ( $10^6$  Konidien/ml) inokuliert (siehe Versuchsansätze).

#### Verwendete Materialien:

Reinzuchtheefe:

10 g/hl Hefe BM 4x4, 30 g/hl Goferm (Heferindenpräparat) und 0,6 g/hl Vitamin B

*Aspergillus* Konidiensuspension von:

*Aspergillus tubingensis* (Isolate 8550, 8557, 8584, 8633)

*Aspergillus niger/awamori* (Isolate 8561, 8562, 8568, 8631, 8623)

*Penicillium* Konidiensuspension von:

*Penicillium crustosum* (DSM-Isolat 62837, Isolate 401, 876)

Inkubationsbedingungen:

Klimakammer, Hell-Dunkel-Rhythmus 12 h, Temperatur täglich ansteigend 24, 26, 28, 30 °C

**Tabelle 5: Versuchsansatz OTA-Bildung auf Portugieser-Maische**

Behälter		° Oe	Konidiensuspension	Gärbehälter
1a	mit Hefe	67	100 ml <i>Aspergillus spec.</i>	Maischefass Speidel
1b	mit Hefe	68	100 ml <i>Aspergillus spec.</i>	Maischefass Speidel
2a	ohne Hefe	68	100 ml <i>Aspergillus spec.</i>	Maischefass Speidel
2b	ohne Hefe	68	100 ml <i>Aspergillus spec.</i>	Maischefass Speidel
3	ohne Hefe	64	100 ml <i>Aspergillus spec.</i>	offene Bütte

**Tabelle 6: Versuchsansatz OTA-Bildung auf Spätburgunder-Maische**

Behälter		° Oe	Konidiensuspension	Gärbehälter
1a	mit Hefe	92	100 ml <i>Aspergillus spec.</i>	Maischefass Speidel
1b	mit Hefe	89	100 ml <i>Aspergillus spec.</i>	Maischefass Speidel
2a	ohne Hefe	93	100 ml <i>Aspergillus spec.</i>	Maischefass Speidel
2b	ohne Hefe	92	100 ml <i>Aspergillus spec.</i>	Maischefass Speidel
3	mit Hefe	92	100 ml <i>Penicillium crustosum.</i>	Maischefass Speidel
3b	mit Hefe	92	100 ml <i>Penicillium crustosum</i>	Maischefass Speidel
4a	ohne Hefe	88	100 ml <i>Penicillium crustosum</i>	Maischefass Speidel
4b	ohne Hefe	90	100 ml <i>Penicillium crustosum</i>	Maischefass Speidel
5	ohne Hefe	91	100 ml <i>Aspergillus spec.</i>	offene Bütte
6	ohne Hefe	90	100 ml <i>Penicillium crustosum</i>	offene Bütte

Nach Beendigung der Gärung wurde die vergorene Maische in einer pneumatischen Kleinkelter abgepresst und die Ochratoxin A-Gehalte direkt nach der Pressung sowie nach erfolgter Klärung im Jungwein und im Hefetrub gemessen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Wichtigste Ergebnisse

#### 3.1.1 Verbreitung von *Aspergillus*-Arten in den deutschen Weinbaugebieten

Die Ergebnisse des Monitorings zeigen, dass Inokulum von *Aspergillus spec.* flächendeckend in allen deutschen Weinbaugebieten vorkommt. Bei der Höhe der cfu-Werte besteht eine erhebliche Bandbreite zwischen 0 und 8.793 cfu (s. Tabelle 25, Anhang). Die höchsten Inokulum-Werte wurden in einem Weinberg in Kirrweiler (Pfalz) gefunden in dem Versuche zur Traubenausdünnung mit einem Traubenvollernter stattfanden. Dies steht möglicherweise in Zusammenhang mit dem dabei in größeren Mengen auf den Boden gelangenden organischen Material, das eine gute Nährstoffquelle für Pilze der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* darstellt. Ähnliche hohe cfu-Werte wurden in Bodenproben aus Schweich (Mosel, 7.300), und Lahr (Breisgau, 5.435) bestimmt.

#### 3.1.2 OTA-bildende *Aspergillus*-Arten in deutschen Weinbaugebieten

Die Überprüfung der systematisch gesammelten *Aspergillus*-Isolate aus deutschen Weinbaugebieten (649) auf ihre Fähigkeit zur OTA-Bildung ergab, dass davon rund ein Drittel (211 = 32,5%) unter den beschriebenen Standardbedingungen auf Biomalz-Flüssigmedium Ochratoxin A bilden können. Die bisher gefundenen Größenordnungen reichen dabei von 0,03 µg/l bis 114,3 µg/l (s. auch Tabelle 26, Anhang).

Rund 70 % der OTA-bildenden Isolate wurden als *A. niger*/*A. awamori* bestimmt. Wie bereits im Abschnitt 2.2.2.3 dargelegt, ist eine genaue Unterscheidung dieser Arten der Sektion Nigri mit der verwendeten Methodik nicht möglich. Mit einem Anteil von 13 % stellt *Aspergillus tubingensis* die zweitgrößte Gruppe unter den OTA-bildenden Isolaten. Die unter Laborbedingungen erreichten OTA-Konzentrationen sind im Durchschnitt mit 15,4 µg/l jedoch etwa dreifach so hoch wie bei den Isolaten des *A. niger/awamori*-Komplexes (5,7 µg/l). Danach folgt *A. wentii* (gelbe Konidienträger und Konidien, 11 % Anteil, mittlere OTA-Bildung 1,03 µg/l) sowie *A. japonicus* mit einem Anteil von 4 % und 0,23 µg/l mittlerer OTA-Konzentration. OTA-Produktion durch *Aspergillus wentii* wurde erstmals von Varga et al., 1996, beschrieben. Einige OTA-bildende Isolate mit gelben bzw. grünen Konidienträgern wurden als *A. terreus* und *A. ustus* (gelb) bzw. *A. fumigatus* und *A. versicolor* (grün) bestimmt (s. Tabelle 7). Die bezüglich der gebildeten OTA-Konzentrationen potenteste Art *Aspergillus*

*carbonarius* wurde bisher jedoch noch nicht in deutschen Weinbaugebieten gefunden. Der wärmeliebende Pilz *Aspergillus carbonarius* wurde vor allem in den südlicheren Ländern Europas auf Trauben nachgewiesen. Auch die Höhe der in Weinen gefundenen OTA-Kontaminationen ist positiv korreliert mit einem Nord-Süd-Gefälle (u. a. Battilani et al. 2006, Varga und Kozakiewicz et al. 2006, Visconti et al. 2008).

**Tabelle 7: OTA-Bildung auf Biomalz durch *Aspergillus*-Arten aus deutschen Weinbaugebieten**

Aspergillus Art	Anzahl Isolate	Anteil %	OTA-Bildung von bis (µg/l)	Mittelwert OTA-Bildung (µg/l)
<i>A. niger/awamori</i>	148	70	0,03 – 78,18	5,69
<i>A. tubingensis</i>	27	13	0,13 – 114,32	15,43
<i>A. wentii</i>	23	11	0,20 – 3,30	1,03
<i>A. japonicus</i>	8	4	0,05 – 0,55	0,23
<i>A. terreus</i>	1		0,61	0,61
<i>A. ustus</i>	1		2,82	2,82
<i>A. fumigatus</i>	1		1,85	1,85
<i>A. versicolor</i>	1		2,95	2,95

Ein Vergleich der durch verschiedene Stämme bzw. Isolate von *A. tubingensis* auf Biomalz-Medium erreichten OTA-Konzentrationen mit *Aspergillus carbonarius* zeigt, dass die OTA-Bildung durch *A. carbonarius* um ein Vielfaches höher ist. In Tabelle 8 sind die nach 14 bzw. 21 Tagen erreichten OTA-Konzentrationen aufgeführt, grau unterlegt sind dabei die durch Isolate aus deutschen Anbaugebieten erreichten Werte. Bei einer Kulturdauer von über 14 Tagen verringert sich die Ochratoxin A-Konzentration im Medium.

**Tabelle 8: OTA-Bildung auf Biomalz-Medium durch *A. carbonarius* und *A. tubingensis***

Art	Stamm/Isolat	µg OTA/l		µg OTA/g Myzel TG	
		Tage Inkubation (25 °C)		Tag Inkubation (25 °C)	
		14	21	14	21
<b><i>Aspergillus carbonarius</i></b>	8310 (CBS 111.26)	371,2	311,8	133,5	89,9
	8070	800,8	634,2	n.b.	206,9
	8072	366,2	294,8	158,5	97,0
	8180	355,3	326,5	187,2	140,9
<b><i>Aspergillus tubingensis</i></b>	8307 (CBS 103.12)	4,6	0,5	2,0	0,2
	8308 (CBS 115.29)	5,7	25,0	2,7	10,5
	8309 (CBS 134.48)	27,9	17,4	11,4	6,8
	8129/2	37,3	21,7	19,9	9,2
	8129/3	35,4	25,8	16,5	10,3

### 3.1.3 Infektionsversuche

#### 3.1.3.1 Infektionsversuche Einzelbeeren

Die teilweise hohen cfu-Werte der untersuchten Bodenproben aus den verschiedenen Weinbauregionen zeigen, dass potentiell Inokulum für Infektionen an Trauben durch *Aspergillus*-Arten vorhanden ist und damit auch die Möglichkeit einer OTA-Bildung an Trauben gegeben ist.

Bisher liegen wenige epidemiologische Kenntnisse zur Ausbreitung des Inokulums, den Infektionswegen der Pilze und dem daraus resultierenden Risiko für Infektionen an den Trauben vor. Untersuchungen von Battilani & Pietri (2002) zeigten auf, dass beispielsweise *Aspergillus carbonarius* Beeren auch ohne Verletzungen der Beerenhaut infizieren kann, wodurch das Risiko einer Infektion enorm steigt. Untersuchungen von Walter (2008) an den ebenfalls bodenbürtigen Pilzen der Gattung *Penicillium* belegten, dass das Inokulum beispielsweise bei Bodenbearbeitungen in den Rebflächen verstärkt vom Boden in die Luft transportiert werden kann. Auch von *Aspergillus spec.* kann ein hohes Inokulum sowohl im Boden als auch an der Rinde und anderen Rebsorten gefunden werden.

#### Vorversuche

Um das Infektionsrisiko der bodenbürtigen *Aspergillus*-Arten an Trauben besser einschätzen zu können, wurde zunächst Vorversuche mit Beeren der Sorte Thompson Seedless (Herkunft Ägypten) durchgeführt. In den Labortests wurden verschiedene Infektionswege der Arten *A. carbonarius* und *A. tubingensis* untersucht und die Befallsgeschwindigkeit dokumentiert. Die Versuche wurden mit den Referenzstämmen *A. carbonarius* (CBS 111.26) und *A. tubingensis* (CBS 115.29) durchgeführt.

Die Ergebnisse der Infektionsversuche sind in Tabelle 9 dargestellt.

**Tabelle 9: Befallshäufigkeit [%] und Befallsstärke[%] von *A. carbonarius* und *A. tubingensis* an Einzelbeeren der Sorte Thompson Seedless (n=20), bei 25°C, 4 Tage nach Inokulation.**

		<i>A. carbonarius</i>		<i>A. tubingensis</i>	
		BH [%]	BS [%]	BH [%]	BS [%]
ohne Sterilisation	ohne Wunde	45	9,8	5	0,5
	einfach verwundet	95	29,3	100	14,1
	mehrfach verwundet	100	99,0	100	40,5
mit Sterilisation	ohne Wunde	25	6,5	10	1
	einfach verwundet	100	21,1	100	8,7
	mehrfach verwundet	100	66,5	100	30,5

Die Untersuchungen zeigten deutlich, dass *A. carbonarius* die Beeren ohne offensichtliche Wunden in der Beerenhaut infizieren konnte. Die Infektionsstärke nahm mit zunehmendem Verletzungsgrad der Beerenhaut zu (Abbildung 13).

*A. tubingensis* zeigte sich im Vergleich zu dem verwendeten *A. carbonarius*-Stamm weniger aggressiv und erreichte in der gleichen Inkubationszeit geringere Befallsstärken an den Beeren. Ein Eindringen von *A. tubingensis* durch die intakte Beerenhaut konnte nicht eindeutig belegt werden (Abbildung 14), da die Infektionsraten an den unverletzten Beeren sehr gering waren und daher eher kleinere Wunden in der Beerenhaut vermuten lassen. Dahingegen zeigte sich ganz deutlich eine starke Sporulation des Pilzes im Narbenbereich der Beeren (Abbildung 15).



Abbildung 13: Infektionen von Beeren der Sorte Thompson Seedless ohne (links) und mit mehrfacher künstlicher Verletzung der Beerenhaut (rechts) durch *A. carbonarius*, 4 Tage nach Inokulation bei 25°C.

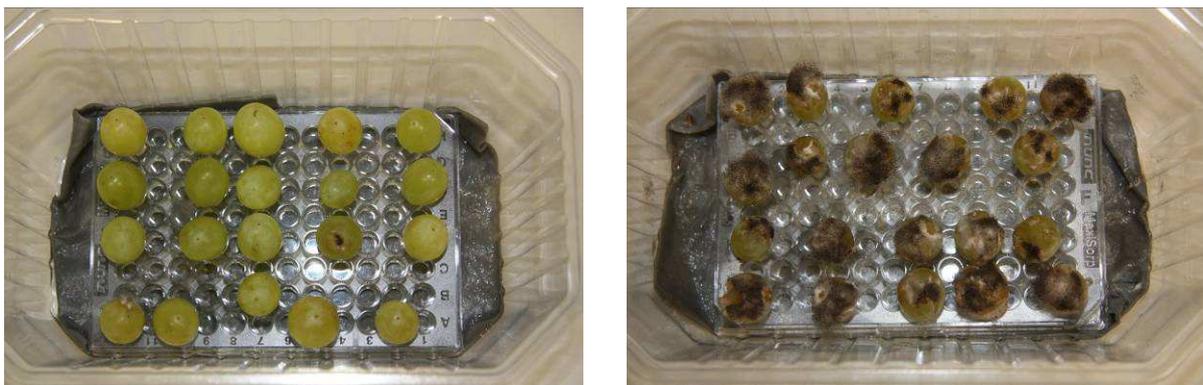
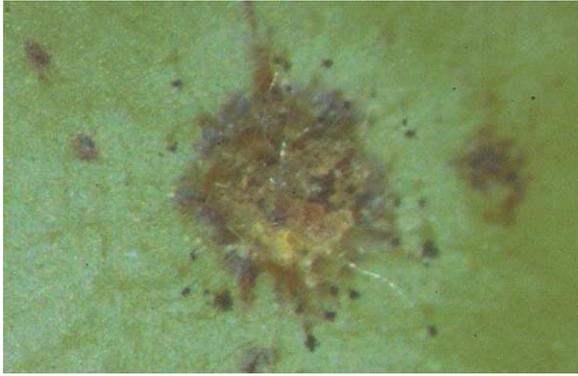


Abbildung 14: Infektionen von Beeren der Sorte Thompson seedless durch *A. tubingensis* ohne (links) und mit mehrfacher künstlicher Verletzung der Beerenhaut (rechts), 4 Tage nach Inokulation bei 25°C.



**Abbildung 15: Sporulation von *A. tubigenensis* auf der Narbe.**

Ein weiterer interessanter Aspekt wurde durch die unterschiedlichen Infektionsraten an sterilisierten und unsterilisierten Beeren deutlich. Die zuvor oberflächensterilisierten Beeren wiesen eine geringere Besiedlung durch *Aspergillus* (*A. carbonarius* und *A. tubigenensis*) auf. Dies kann auf Interaktionen des Pilzes mit der Mikroflora auf der Beerenhaut hinweisen. Die Interaktionen mit beispielsweise *Botrytis cinerea* oder *Penicillium expansum*, die beide an reifen Beeren im Herbst vermehrt auftreten, wären in diesem Zusammenhang interessante epidemiologische Untersuchungsaspekte.

#### Infektionsversuche mit verschiedenen Rebsorten und *Aspergillus*-Arten

Pro Ansatz wurden, wie unter Material und Methoden beschrieben, jeweils 20 Traubenbeeren der Rebsorten Grauburgunder, Riesling und Spätburgunder verwendet. Zur Inokulation dienten Konidien suspensionen (je  $10^6$  Konidien/ml) verschiedener *Aspergillus*-Arten. Erwartungsgemäß setzte bei allen Varianten mit verletzter Beerenhaut der Befall durch die jeweilige *Aspergillus*-Art früher ein und erreichte deutlich höhere Werte für die Befallsstärke und -häufigkeit als bei den Varianten mit intakter Beerenhaut. Bei den Varianten mit unverletzter Beerenhaut war häufig ein Befall durch *Botrytis cinerea* feststellbar. *B. cinerea* kann intakte Beerenhäute durchdringen.

Bei der Rebsorte **Riesling** (Tabelle 29, Anhang) wiesen von allen Inokulationen nur die Varianten mit Verletzungen einen Befall auf. Im Gegensatz zu den Beeren von Grauburgunder (105 °Oe) und Spätburgunder (103 °Oe) hatten die Rieslingbeeren aber mit durchschnittlich

72 °Oe einen deutlich geringeren Reifegrad. Bei einer Variante mit Verletzung wurde durch *A. niger* 0,64 µg/l OTA gebildet (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Wachstum und Konidienbildung von *A. niger* auf Einzelbeeren von Riesling, mit Verletzung.**

Bei den Versuchen mit Einzelbeeren der Sorte Spätburgunder (s. Tabelle 27, Anhang) konnten bei *A. wentii* und *A. japonicus* Infektionen nur bei verletzter Beerenhaut erreicht werden, auch bei *A. awamori* und *A. carbonarius* trat ein vergleichsweise geringer Befall der unverletzten Beeren erst nach mehrwöchiger Inkubation auf. Einen früheren und stärkeren Befall zeigten dagegen die mit *A. niger* und *A. tubingensis* inokulierten, unverletzten Beeren. Bei den mit *A. niger* infizierten, unverletzten Beeren wurden mit 10,9 µg/l bzw. 10,0 µg/l die höchsten OTA-Konzentrationen erreicht, bei den verletzten Beeren trotz stärkerem Befall nur 7,5 µg/l. Die Infektionen mit anderen *Aspergillus*-Arten führten nicht zu einer nachweisbaren OTA-Bildung.

Ein ähnliches Ergebnis ergab sich auch bei der Rebsorte **Grauburgunder** (Tabelle 28, Anhang). Auch hier war der Befall der unverletzten Beeren durch *A. tubingensis* und *A. niger* am höchsten, bei *A. carbonarius*, *A. awamori*, *A. wentii*, und *A. japonicus* dagegen vergleichsweise gering. OTA-Bildung war messbar bei einer Variante mit Verletzung und Inokulation durch *A. carbonarius* (2,90 µg/l), bei einer Variante (mit Verletzung) durch *A. awamori*

(0,56 µg/l) und *A. japonicus* (0,40 µg/l) sowie bei zwei Varianten (mit und ohne Verletzung) durch *A. niger*. (1,30 µg/l bzw. 0,35 µg/l).

### 3.1.3.2 Infektionsversuche mit Fungizid-behandelten Einzelbeeren

Mit Einzelbeeren der Rebsorte Riesling, Durchschnittsmostgewicht 72 °Oe, wurde unter den gleichen Inkubationsbedingungen wie bei den unter 2.3.2.1 beschriebenen Versuchen die Wirkung der Fungizide Cantus, Melody Combi, Scala, Switch und Teldor auf den Befall durch *Aspergillus awamori* und *Aspergillus niger* getestet.

Alle Beeren wurden wie bereits beschrieben auf Mikrotiterplatten gesetzt, einmal angestochen und mit einer Fungizidsuspension (doppelter Basisaufwand besprüht, s. Tabelle 10)

**Tabelle 10: Aufwandmengen Fungizidversuch**

<b>Fungizidkonzentrationen:</b>		<b>doppelter Basisaufwand</b>	
	Basis kg bzw. L/ha	Anw. konz %	bzw. ml/l
Cantus*	0,3	0,075	<b>1,50</b>
Melody Combi	0,6	0,15	<b>3,00</b>
Scala	0,5	0,125	<b>2,50</b>
Switch	0,24	0,06	<b>1,20</b>
Teldor	0,4	0,1	<b>2,00</b>

Nach einer Stunde Antrocknungszeit wurden die Beeren mit Tropfen von je 10 µl einer Konidienlösung (10<sup>6</sup> Konidien/ml) der Isolate CBS 121.48 (*Aspergillus awamori*) und CBS 119559 (*Aspergillus niger*) direkt auf die Verletzungsstelle inokuliert. Als Kontrolle dienten bei sonst gleicher Behandlung Einzelbeeren, bei denen je 10 µl bidest. Wasser auf die Verletzungsstelle aufgesetzt wurde.

Eine Woche nach der Infektion war bei den mit Melody Combi, Scala und Switch behandelten Varianten der Befall geringer als bei der unbehandelten Kontrolle. Die Fungizide Cantus und Teldor zeigten dagegen keinerlei Wirkung. Bei den mit Teldor behandelten Einzelbeeren war der Befall bereits zum ersten Boniturtermin höher als bei der unbehandelten Kontrolle. Mit fortschreitender Versuchsdauer ließ der Einfluss der Fungizidbehandlung bei allen Varianten schnell nach.

Im Saft der mit *Aspergillus niger* behandelten Beeren konnten bei der Variante mit Cantus-Behandlung (Wirkstoff Boscalid) mit 9 µg/l die höchsten OTA-Konzentrationen gemessen werden, gefolgt von der Kontrolle (7,75 µg/l) und der Teldor-Variante (2,13 µg/l) . In der Rei-

henfolge Kontrolle, Teldor-Variante, Cantus-Variante war auch die stärkste Konidienbildung zu beobachten (s. auch Tabelle 30, Anhang).



**Abbildung 17:** Wachstum und Konidienbildung von *A. niger* auf Traubenbeeren nach Behandlung mit den Fungiziden Cantus (oben links), Melody combi (Mitte links), Scala (unten links), Switch (oben rechts) und Teldor (Mitte rechts). Unten rechts: Kontrolle unbehandelt.

### 3.1.3.3 Lichteinfluss auf OTA-Bildung

Um den Einfluss unterschiedlicher Lichtverhältnisse auf das Wachstum und die Mykotoxinbildung bei verschiedenen *Aspergillus*-Arten zu untersuchen, wurden je 20 Beeren eine Tafeltraubensorte (Imperial Seedless/Argentinien) ,wie bereits beschrieben, auf Mikrotiterplatten gesetzt, die Beerenhaut angestochen und durch Aufsetzen eines Tropfens (10  $\mu$ l) einer Konidien suspension (10<sup>6</sup> Konidien/ml) inokuliert. Angeimpft wurde mit Konidien der Arten *A. niger*, *A. awamori*, *A. tubingensis*, *A. carbonarius* und *A. wentii*, inkubiert bei 25 °C in feuchten Schalen. Eine Hälfte der Ansätze wurde einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Wechsel ausgesetzt, die andere Hälfte ausschließlich im Dunkeln gehalten. Unter diesen Bedingungen bildete nur *A. niger* Ochratoxin A, wobei hier die im Dunkeln erreichte OTA-Konzentration fast dreifach höher lag als die bei wechselnden Lichtverhältnissen (Tabelle 11). Dies bestätigt Beobachtungen, wonach die Lichtverhältnisse einen Einfluss auf die Ochratoxin A- Bildung haben (Geisen et al. 2009).

**Tabelle 11: OTA-Bildung bei unterschiedlichen Lichtverhältnissen**

Nr.	Aspergillus-Art	Isolat	Inkubation	OTA µg/l
1	<i>A. niger</i>	CBS 119558	25 °C Hell – dunkel im Wechsel	4,46
2	<i>A. awamori</i>	CBS 127.48		n.n.
3	<i>A. tubingensis</i>	CBS 103.12		n.n.
4	<i>A. carbonarius</i>	CBS 101.14		n.n.
5	<i>A. wentii</i>	DSM 3701		n.n.
6	<i>A. niger</i>	CBS 119558	25 °C Nur dunkel	12,82
7	<i>A. awamori</i>	CBS 127.48		n.n.
8	<i>A. tubingensis</i>	CBS 103.12		n.n.
9	<i>A. carbonarius</i>	CBS 101.14		n.n.
10	<i>A. wentii</i>	DSM 3701		n.n.

n.n. nicht nachweisbar

### 3.1.3.4 Infektionsversuche Trauben in vitro

Auch die Infektionsversuche an ganzen Trauben in vitro zeigen, dass eine OTA-Bildung durch die häufig in deutschen Weinbaugebieten vorkommende Art *Aspergillus niger* bei entsprechenden Kulturbedingungen möglich ist (Tabelle 12).

**Tabelle 12: OTA-Bildung an künstlich infizierten Trauben nach einwöchiger Inkubation bei 21 °C**

Probe	Traubensorte	Infiziert mit	µg/l OTA
AR-1	Cabernet sauvignon	<i>Aspergillus niger</i>	4,34
AR-2	Cabernet sauvignon	<i>Aspergillus niger</i>	1,24
AR-3	Cabernet sauvignon	<i>Aspergillus niger</i>	0,82
AR-4	Cabernet sauvignon	<i>Aspergillus niger</i>	2,30
AW-1	Riesling	<i>Aspergillus niger</i>	0,06
AW-2	Riesling	<i>Aspergillus niger</i>	0,09
AW-3	Riesling	<i>Aspergillus niger</i>	0,21
AW-4	Riesling	<i>Aspergillus niger</i>	15,52
PR-1	Cabernet sauvignon	<i>Penicillium expansum</i>	n.n.
PR-2	Cabernet sauvignon	<i>Penicillium expansum</i>	n.n.
PR-3	Cabernet sauvignon	<i>Penicillium expansum</i>	n.n.
PR-4	Cabernet sauvignon	<i>Penicillium expansum</i>	n.n.
PW-1	Riesling	<i>Penicillium expansum</i>	0,06
PW-2	Riesling	<i>Penicillium expansum</i>	n.n.
PW-3	Riesling	<i>Penicillium expansum</i>	n.n.
PW-4	Riesling	<i>Penicillium expansum</i>	0,05

Probe	Traubensorte	Infiziert mit	µg/l OTA
BR-1	Cabernet sauvignon	<i>Botrytis cinerea</i>	n.n.
BR-2	Cabernet sauvignon	<i>Botrytis cinerea</i>	n.n.
BR-3	Cabernet sauvignon	<i>Botrytis cinerea</i>	n.n.
BR-4	Cabernet sauvignon	<i>Botrytis cinerea</i>	n.n.
BW-1	Riesling	<i>Botrytis cinerea</i>	0,03
BW-2	Riesling	<i>Botrytis cinerea</i>	0,08
BW-3	Riesling	<i>Botrytis cinerea</i>	n.n.
BW-4	Riesling	<i>Botrytis cinerea</i>	n.n.
MR-1	Cabernet sauvignon	Gemischte Suspension	0,07
MR-2	Cabernet sauvignon	Gemischte Suspension	n.n.
MR-3	Cabernet sauvignon	Gemischte Suspension	0,04
MR-4	Cabernet sauvignon	Gemischte Suspension	k. M.
MW-1	Riesling	Gemischte Suspension	n.n.
MW-2	Riesling	Gemischte Suspension	n.n.
MW-3	Riesling	Gemischte Suspension	n.n.
MW-4	Riesling	Gemischte Suspension	k. M.
RK1	Cabernet sauvignon	Kontrolle nicht inokuliert, nicht inkubiert (Standzeit 1 Woche bei 15 °C	n.n.
RK2	Cabernet sauvignon		n.n.
RW1	Riesling		n.n.
RW2	Riesling		n.n.

n.n.: nicht nachweisbar, k. M.: keine Messung

### 3.1.3.5 Infektionsversuche Freiland

#### Herbst 2009

Obwohl bei der Bonitur am 14.10.09 augenscheinlich kein Befall durch *Aspergillus spec.* festzustellen war, konnte bei den Versuchen mit der Sorte Spätburgunder dennoch teilweise eine OTA-Bildung, vor allem an den mit *A. niger* infizierten Trauben festgestellt werden. In Spuren war eine OTA-Bildung auch bei den mit *A. awamori* und *A. tubingensis* beimpften Spätburgunder-Trauben sowie in wenigen Fällen bei den Rebsorten Riesling und Grauburgunder nachweisbar (Tabelle 13).

**Tabelle 13: Infektionsversuche Freiland 2009: OTA-Bildung**

Versuchsbeginn:	18.09.2009		OTA µg/l		
Versuchsende:	14.10.2009		Spätburgunder	Riesling	Grauburgunder
Kontrolle		ohne Verletzung	n.n.	n.n.	n.n.
Kontrolle		mit Verletzung	n.n.	n.n.	n.n.
<i>A. awamori</i>	8314	ohne Verletzung	n.n.	0,06	n.n.
<i>A. awamori</i>	8314	mit Verletzung	n.n.	n.n.	n.n.
<i>A. awamori</i>	8315	ohne Verletzung	n.n.	n.n.	0,02
<i>A. awamori</i>	8315	mit Verletzung	0,06	n.n.	n.n.
<i>A. niger</i>	8317	ohne Verletzung	n.n.	n.n.	n.n.
<i>A. niger</i>	8317	mit Verletzung	1,27	n.n.	n.n.
<i>A. niger</i>	8318	ohne Verletzung	0,11	n.n.	n.n.
<i>A. niger</i>	8318	mit Verletzung	0,06	n.n.	n.n.
<i>A. tubingensis</i>	8307	ohne Verletzung	0,07	0,05	n.n.
<i>A. tubingensis</i>	8307	mit Verletzung	0,02	n.n.	n.n.
<i>A. tubingensis</i>	8308	ohne Verletzung	0,05	n.n.	n.n.
<i>A. tubingensis</i>	8308	mit Verletzung	n.n.	n.n.	n.n.
<i>A. carbonarius</i>	8310	ohne Verletzung	n.n.	0,9	n.n.
<i>A. carbonarius</i>	8310	mit Verletzung	n.n.	n.b.	n.b.
<i>A. carbonarius</i>	8311	ohne Verletzung	n.n.	0,02	n.n.
<i>A. carbonarius</i>	8311	mit Verletzung	n.n.	n.n.	n.n.

Legende: n.n. nicht nachweisbar, n.b. nicht bestimmt

### Herbst 2010

Die **Grauburgunder**-Trauben am Standort Haardter Herrenletten wurden zwischen der Inokulation am 28.09.2010 und der Lese am 26.10.2010 im Abstand von mehreren Tagen auf den Befall durch *Botrytis cinerea*, *Aspergillus spec.*, *Penicillium spec.* und andere Sekundärfäuleerreger bonitiert. Während der Botrytisbefall der Trauben sehr schnell zunahm und zum Zeitpunkt der Lese meist zwischen 50 und 75 % erreicht hatte, war ein Befall durch die anderen Fäulniserreger nicht feststellbar.

Auch bei der Rebsorte **Riesling** am Standort Mußbacher Schlittweg (Inokulation 28.09.10, Lese 14.10.10) und der Sorte **Spätburgunder** am Standort Mußbacher Hundertmorgen (Inokulation 28.09.10, Lese 19.10.10) ergab sich bei den Bonituren ein ähnliches Bild. Der Botry-

tisbefall erreichte beim Spätburgunder bis 50%, bei Riesling lag er zwischen 50 und 100%.

Die Analyse auf Ochratoxin A war in allen Fällen negativ (Tabelle 14).

Mit 9,8 °C mittlerer Temperatur über den Versuchszeitraum war es 2010 deutlich kühler als 2009 mit durchschnittlich 15,5 °C. Auch die stärkeren Niederschläge am 10. Oktober bei gleichzeitig relativ hohen Temperaturen könnten 2009 das Wachstum und die OTA-Bildung begünstigt haben. Grundsätzlich sind auch in deutschen Weinbaugebieten zeitweise Bedingungen gegeben, die eine Ochratoxin A-Bildung zumindest in geringen Konzentrationen ermöglichen.

**Tabelle 14: Infektionsversuche Freiland 2010**

Inokulation am:		28.09.2010					
Versuchsende (Lese):		19.10.2010		14.10.2010		26.10.2010	
Variante		Spätburgunder (Hundertmorgen)		Riesling (Schlittweg)		Grauburgunder (Herrenletten)	
		°Oe	OTA µg/l	°Oe	OTA µg/l	°Oe	OTA µg/l
verletzt, inokuliert	a)	102	n.n.	107	n.n.	138	n.n.
	b)	91	n.n.	101	n.n.	137	n.n.
verletzt, nicht inokuliert	a)	96	n.n.	113	n.n.	131	n.n.
	b)	99	n.n.	101	n.n.	128	n.n.
unverletzt, inokuliert	a)	96	n.n.	103	n.n.	116	n.n.
	b)	95	n.n.	102	n.n.	124	n.n.
Kontrolle unverletzt, nicht inokuliert		97	n.n.	92	n.n.	116	n.n.

Legende: n.n. nicht nachweisbar, °Oe Grad Oechsle

### **3.1.4 Analyse von Weinen und Traubenmosten auf OTA-Gehalte**

#### Untersuchungen von Weinen:

Von den 388 untersuchten Weinen aus dem Premiumsegment enthielten 41 (11 %) Ochratoxin A im Bereich von 0,02 µg/l bis 0,43 µg/l. Damit wurde in keinem Fall der Grenzwert von 2 µg/l erreicht. Von den 272 deutschen Weinen aus diesem Segment enthielten 18 (6,6 %) Ochratoxin A in der Größenordnung von 0,02 µg/l bis 0,42 µg/l, bei den 65 untersuchten Discounter-Weinen waren bei 13 Weinen (20 %) Spuren von Ochratoxin A in Konzentrationen zwischen 0,03 und 0,15 µg/l nachweisbar, vier davon aus deutschen Anbaugebieten (9,3%). Die höchsten OTA-Gehalte bei den Discounter-Weinen wurden mit 0,15 µg/l bzw.

0,12 µg/l in Rotwein-Verschnitten aus mehreren EU-Ländern (Weine in Tetrapack) gefunden. Mit 20 % ist der Anteil OTA-haltiger Weine bei dieser Untersuchung etwas höher als bei den Weinen aus dem Premiumsegment. Die gefundenen Konzentrationen sind aber auch hier meist nur gering und liegen alle deutlich unter der zulässigen Höchstmenge (Tabellen 15 bis 18).

**Tabelle 15: Übersicht OTA-Analysen in Weinen verschiedener Herkunft**

	Anzahl analysierte Weine					Weine mit OTA							
	Premium		Discounter		Ges.	Premium		Discounter		Gesamt		OTA-Konz. [µg/l]	
	Anz.	%	Anz.	%	Anz.	Anz.	%	Anz.	%	Anz.	%	von	bis
Weine, gesamt	388	85,7	65	14,3	453	41	11,0	13	20,0	54	11,9	0,02	0,43
Weißweine	179	46,1	24	36,9	203	21	4,6	1	1,9	22	10,8	0,02	0,43
Rotweine	201	51,8	41	63,1	242	20	4,4	12	22,2	32	13,2	0,02	0,32
Deutsche Weine	272	70,1	43	66,2	315	18	6,6	4	9,3	22	7,0	0,02	0,42

Vor allem wegen der späteren Reife sowie der kompakten Traubenstruktur sind Riesling und Spätburgunder besonders fäulnisgefährdet und daher auch in einigen Fällen mit Ochratoxin A kontaminiert.

**Tabelle 16: Ochratoxin A-Gehalte in 272 untersuchten deutschen Weinen (Premiumsegment)**

OTA µg/l	Sorte/Bezeichnung	Jahrgang	Anbaugebiet
0,02	Spätburgunder	2005	Franken
0,02	Riesling, Spätlese	2007	Mosel-Saar-Ruwer
0,02	Ruländer, Eiswein	2007	Baden
0,02	Riesling, Spätlese	2007	Mosel-Saar-Ruwer
0,03	Spätburgunder	2005	Rheingau
0,06	Riesling, Spätlese	2007	Mosel-Saar-Ruwer
0,08	Rivaner	2007	Rheinhessen
0,09	Riesling, Spätlese	2007	Mosel-Saar-Ruwer
0,09	Riesling, Spätlese	2007	Mosel-Saar-Ruwer
0,09	Riesling	2007	Nahe
0,10	Traminer	2008	Sachsen
0,11	Spätburgunder, trocken	2005	Baden
0,13	Spätburgunder	2006	Ahr
0,14	Silvaner	2007	Pfalz
0,15	Spätburgunder, trocken	2006	Baden
0,16	Spätburgunder	2007	Pfalz
0,30	Spätburgunder, trocken	2006	Baden
0,42	Riesling	2007	Nahe

Der in den deutschen Weinbaugebieten besonders von Traubenfäule betroffene Jahrgang 2006 ist nicht durch ein vermehrtes OTA-Auftreten aufgefallen. Abgesehen von der geringen

Stichprobenzahl könnte ein Grund dafür auch sein, dass stark faules Lesegut entweder gar nicht zur Herstellung qualitativ hochwertiger Weine verwendet wird oder faule Tauben vor der Verarbeitung ausgesondert werden.

**Tabelle 17: OTA-Gehalte deutscher Premium-Weine nach Rebsorte und Jahrgang aufgeschlüsselt**

Rebsorte	untersucht	mit OTA	Konz. bereich µg/l	%
Spätburgunder	103	7	0,02 – 0,30	6,8
Riesling	67	7	0,02 – 0,42	10,4
Jahrgang	untersucht	mit OTA	Konz. bereich µg/l	%
2005	17	3	0,02 – 0,11	17,6
2006	52	3	0,13 – 0,30	5,8
2007	192	11	0,02 – 0,42	5,7
2008	3	1	0,10	

**Tabelle 18: Ochratoxin A-Gehalte in 43 untersuchten deutschen Discounter-Weinen**

OTA µg/l	Sorte/Bezeichnung	Jahrgang	Anbaugebiet
0,04	Rotwein-Cuvée	2007	Pfalz
0,04	Weißburgunder, QbA	2007	Baden
0,09	Spätburgunder, QbA	2007	Baden
0,09	Portugieser Beerenauslese	2008	Pfalz

Da die Auswahl der Weine nicht repräsentativ war, kann bezüglich des tatsächlichen prozentualen Anteils OTA-haltiger Weine in Bezug auf das Gesamtangebot keine Aussage getroffen werden. Die Untersuchungen belegen jedoch eindeutig, dass auch bei Weinen aus deutschen Anbaugebieten Ochratoxin A-Kontaminationen regelmäßig vorkommen, wenn auch (bisher) nur in sehr geringen Konzentrationen deutlich unter dem zulässigen Höchstwert von 2 µg/l. Bei rund 70 % (15 von 22) der untersuchten deutschen Weine mit positivem OTA-Befund lag die gemessene OTA-Konzentration bei unter 0,1 µg/l.

Untersuchungen von Traubenmosten:

In 4 von insgesamt 27 untersuchten Traubenmosten (überwiegend Burgundersorten und Riesling, Lesedatum September 2008), die aus faulem Lesegut hergestellt waren, konnte Ochratoxin A in einer Größenordnung von < 0,01 bis 0,08 µg/l gefunden werden.

### 3.1.5 Einfluss kellertechnischer Verfahren auf OTA-Gehalte

#### 3.1.5.1 Gär- und Schönungsversuche

Bei allen Varianten (Tabelle 19) mit Zusatz von Ochratoxin A war kein wesentlicher Unterschied im Gärverlauf im Vergleich zu den Kontrollen festzustellen. Auch zwischen den Varianten mit 2 bzw. 10 µg/l Ochratoxin A ergaben sich keine Unterschiede (Abbildung 18).

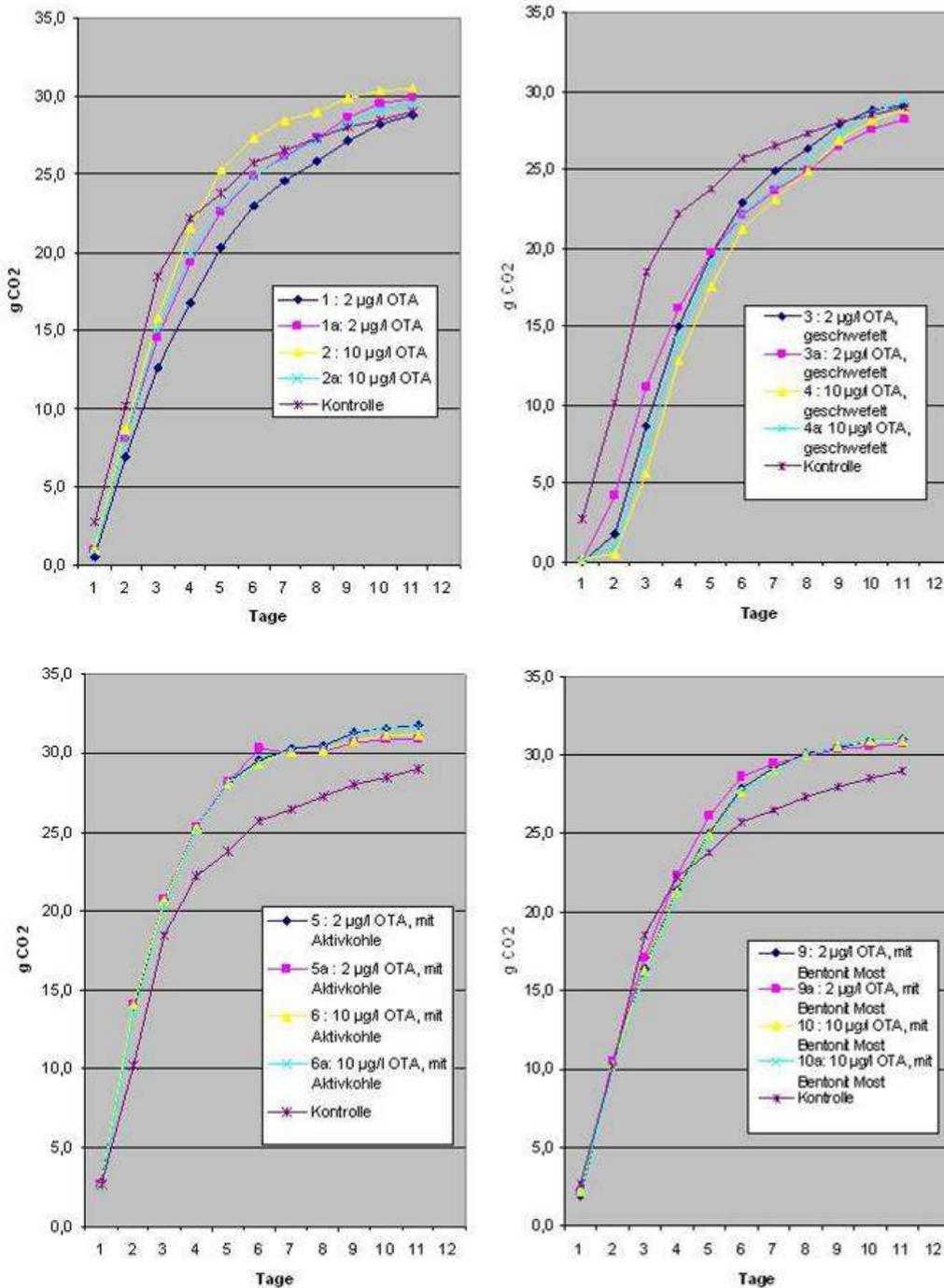


Abbildung 18: Gärverlauf von Silvaner-Most mit Zusatz von OTA und verschiedenen Schönungsmitteln

**Tabelle 19: Verhalten von Ochratoxin A im Prozess der Weinbereitung**

Varianten		Silvaner, OTA		Huxelrebe, OTA		Riesling, OTA		Spätburgunder, OTA	
		µg/l	µg/g	µg/l	µg/g	µg/l	µg/g	µg/l	µg/g
		Wein	Hefe	Wein	Hefe	Wein	Hefe	Wein	Hefe
K	Kontrolle, Gärung mit Hefe	n.a.	n.a.	0,26?	0,02	0,12?	n.n.	n.a.	n.a.
Ka	Kontrolle, Gärung mit Hefe	n.a.	n.a.	0,22?	0,05	0,08?	n.n.	n.a.	n.a.
1	2 µg/l OTA	n.n.	0,01	0,94	n.n.	1,00	n.n.	1,13	n.a.
1a	2 µg/l OTA	n.n.	0,02	1,49	n.n.	1,35	n.n.	1,05	n.a.
2	10 µg/l OTA	n.n.	n.n.	5,28	0,04	4,54	n.n.	n.a.	n.a.
2a	10 µg/l OTA	n.n.	0,04	6,03	n.n.	5,91	0,11	n.a.	n.a.
3	2 µg/l OTA, Zugabe K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,71	0,02	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,92	n.a.
3a	2 µg/l OTA, Zugabe K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,29	n.n.	0,02	n.n.	n.n.	n.n.	1,00	n.a.
4	10 µg/l OTA, Zugabe K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1,0	0,04	0,10	0,17	n.n.	n.n.	n.a.	n.a.
4a	10 µg/l OTA, Zugabe K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1,47	0,01	0,07	0,22	n.n.	n.n.	n.a.	n.a.
5	2 µg/l OTA, Aktivkohle	n.n.	k. M.	n.n.	0,39	0,05	0,03	0,77	n.a.
5a	2 µg/l OTA, Aktivkohle	n.n.	k. M.	n.n.	0,1	0,03	0,02	0,75	n.a.
6	10 µg/l OTA, Aktivkohle	n.n.	k. M.	0,06	n.n.	0,14	0,13	0,82	n.a.
6a	10 µg/l OTA, Aktivkohle	0,23	k. M.	0,04	n.n.	0,06	0,10	0,88	n.a.
7	2 µg/l OTA, Gelatine Most/Wein*	1,14	n.n.	1,39	n.n.	1,09	0,03	1,27	n.a.
7a	2 µg/l OTA, Gelatine Most/Wein*	1,16	n.n.	1,42	n.n.	0,88	n.n.	1,16	n.a.
8	10 µg/l OTA, Gelatine Most	4,91	0,04	6,03	n.n.	4,67	n.n.	n.a.	n.a.
8a	10 µg/l OTA, Gelatine Most	4,69	0,11	5,95	n.n.	6,09	0,13	n.a.	n.a.
9	2 µg/l OTA, Bentonit Most	n.n.	0,01	0,88	n.n.	0,45	0,02	n.a.	n.a.
9a	2 µg/l OTA, Bentonit Most	n.n.	n.n.	0,82	0,12	0,60	0,01	n.a.	n.a.
10	10 µg/l OTA, Bentonit Most	n.n.	0,02	3,53	0,15	2,46	0,14	n.a.	n.a.
10a	10 µg/l OTA, Bentonit Most	n.n.	0,02	3,82	0,12	2,84	0,11	n.a.	n.a.
11	2 µg/l OTA, Bentonit Wein	0,27	0,20	0,02	n.n.	n.n.	0,02	n.a.	n.a.
11a	2 µg/l OTA, Bentonit Wein	0,24	0,29	0,02	n.n.	n.n.	n.n.	n.a.	n.a.
12	10 µg/l OTA, Bentonit Wein	n.n.	0,02	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.a.	n.a.
12a	10 µg/l OTA, Bentonit Wein	0,04	n.n.	0,03	n.n.	n.n.	n.n.	n.a.	n.a.
13	2 µg/l OTA, K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , Aktivk., Bent.	k. M.	k. M.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.a.	n.a.
13a	2 µg/l OTA, K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , Aktivk., Bent.	k. M.	k. M.	n.n.	0,16	n.n.	0,02	n.a.	n.a.
14	10 µg/l OTA, K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , Akt.k., Bent.	k. M.	k. M.	n.n.	0,26	n.n.	0,21	n.a.	n.a.
14a	10 µg/l OTA, K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , Akt.k., Bent.	k. M.	k. M.	n.n.	0,72	n.n.	0,22	n.a.	n.a.
15	2 µg/l OTA, K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , Gelat., Bent.	k. M.	k. M.	0,07	n.n.	0,03	n.n.	n.a.	n.a.
15a	2 µg/l OTA, K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , Gelat., Bent.	k. M.	k. M.	0,05	n.n.	0,04	0,01	n.a.	n.a.
16	10 µg/l OTA, K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , Gelat., Bent.	k. M.	k. M.	0,1	n.n.	0,04	0,15	n.a.	n.a.
16a	10 µg/l OTA, K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , Gelat., Bent.	k. M.	k. M.	0,11	n.n.	0,06	0,15	n.a.	n.a.

k.M.: keine Messung, n.n.: nicht nachweisbar, n.a.: nicht auswertbar

Ein Teil der Gär- und Schönungsversuche war wegen eines Fehlers bei der Probenaufarbeitung leider nicht auswertbar (s. Kennzeichnung „n.a.“ und „k. M.“ in Tabelle 19). Insbesondere waren davon die wichtigen Versuche mit der Rebsorte Spätburgunder betroffen. Unter Vorbehalt lassen sich aus den erzielten Ergebnissen jedoch schon einige Aussagen ableiten, die aber noch weiter überprüft werden müssen (Tabelle 19).

Gärung und Schwefelung: Bereits bei den Varianten, denen außer Ochratoxin A nur Reinzuchthefer zugesetzt wurde, waren von den ursprünglichen OTA-Konzentrationen im Jungwein nur noch etwa 50 – 60 Prozent nachweisbar. Möglicherweise wird Ochratoxin A von den Hefezellwänden adsorbiert, eventuell auch teilweise metabolisiert. Die Angaben in der Literatur zur Reduzierung des OTA-Gehaltes durch Zugabe von Reinzuchthefer oder Hefezellwänden bzw. während des Gärprozesses sind jedoch unterschiedlich und hängen neben der Art der verwendeten Hefe bzw. dem Aufbau der Hefezellwände auch von den Inhaltsstoffen des Mediums (z. B. Zucker, Phenole, Eiweiße, organische Säuren, kolloidale Partikel) und damit auch von der jeweiligen Rebsorte ab (u. a. Beajoui et al., 2004, Fernandes et al., 2007, Lallemant, 2007, Leong et al. 2006, Mateo et al., 2010, Meca et al., 2010, Varga et al., 2006). Bei längerer Standzeit kann vermutlich durch Autolyse der Hefezellwände zuvor gebundenes Ochratoxin A auch wieder aus dem Hefetrub freigegeben werden (Lallemant, 2007). Bei den Varianten, denen zusätzlich noch in praxisüblicher Menge Kaliumdisulfid zugesetzt wurde, war vor allem bei den mit 10 µg/l OTA dotierten Versuchen der Rückgang von nachweisbarem Ochratoxin A erheblich, teilweise war kein OTA mehr nachweisbar.

Aktivkohle, Bentonit, Gelatine: Bei Zusatz von Aktivkohle zum Most sind in den Jungweinen erwartungsgemäß ebenfalls nur noch geringe Prozentwerte der ursprünglichen Ochratoxin A-Konzentrationen messbar, bei den Weißweinen ist die Reduzierung stärker als bei Spätburgunder. Der Grund dürfte in der bei Spätburgunder stärkeren Beladung der Aktivkohle mit Farbstoffen zu suchen sein. Bei Aktivkohleschönungen kann es zu Farb- oder Aromaverlusten kommen, so dass dieses Verfahren nur eingeschränkt zur Anwendung kommen kann.

Auch bei den Varianten, denen das in der Kellerwirtschaft als Schönungsmittel sehr gebräuchliche Tonmineral Bentonit (überwiegend Aluminiumhydroxysilikat) zugesetzt wurde, war Ochratoxin A nur noch in verringerter Konzentration oder gar nicht mehr nachweisbar.

Bentonitzugabe zum Wein zeigte dabei einen deutlich stärkeren Effekt als die Zugabe des Tonminerals zum Most. Möglicherweise ist die Verringerung der OTA-Gehalte bei den Varianten mit Bentonitzugabe zum Most auch ausschließlich auf die Gärung bzw. eine Adsorption an Hefezellwände zurückzuführen. Leong et al. (2006) beobachteten bei Zugabe von Bentonit zum geklärten Traubensaft keinen Effekt. Wie auch in der Literatur beschrieben (u. a. Leong et al., 2006), zeigte der Zusatz von Gelatine zum Most bei diesen Versuchen keinen größeren Effekt bezüglich der Reduzierung des OTA-Gehaltes als die Gärung.

Kombinierter Einsatz von Schönungsmitteln: Bei allen auswertbaren Varianten mit Zugabe von Kaliumdisulfit, Aktivkohle und Bentonit bzw. Kaliumdisulfit, Gelatine und Bentonit war im Jungwein Ochratoxin A nicht mehr (Varianten mit Aktivkohle) oder nur noch in sehr kleinen Mengen nachweisbar.

### 3.1.5.2 Maischegärung

Sowohl bei den Varianten mit Zusatz von Reinzuchtheefe als auch bei den nicht beimpften, setzte unter den gegebenen Kulturbedingungen bereits am Tag 2 die Gärung ein, so dass unter den sich bildenden anaeroben Verhältnissen ein nennenswertes Wachstum der inokulierten *Aspergillus* bzw. *Penicillium*-Arten nicht zu erwarten war (Abbildungen 19 - 20).

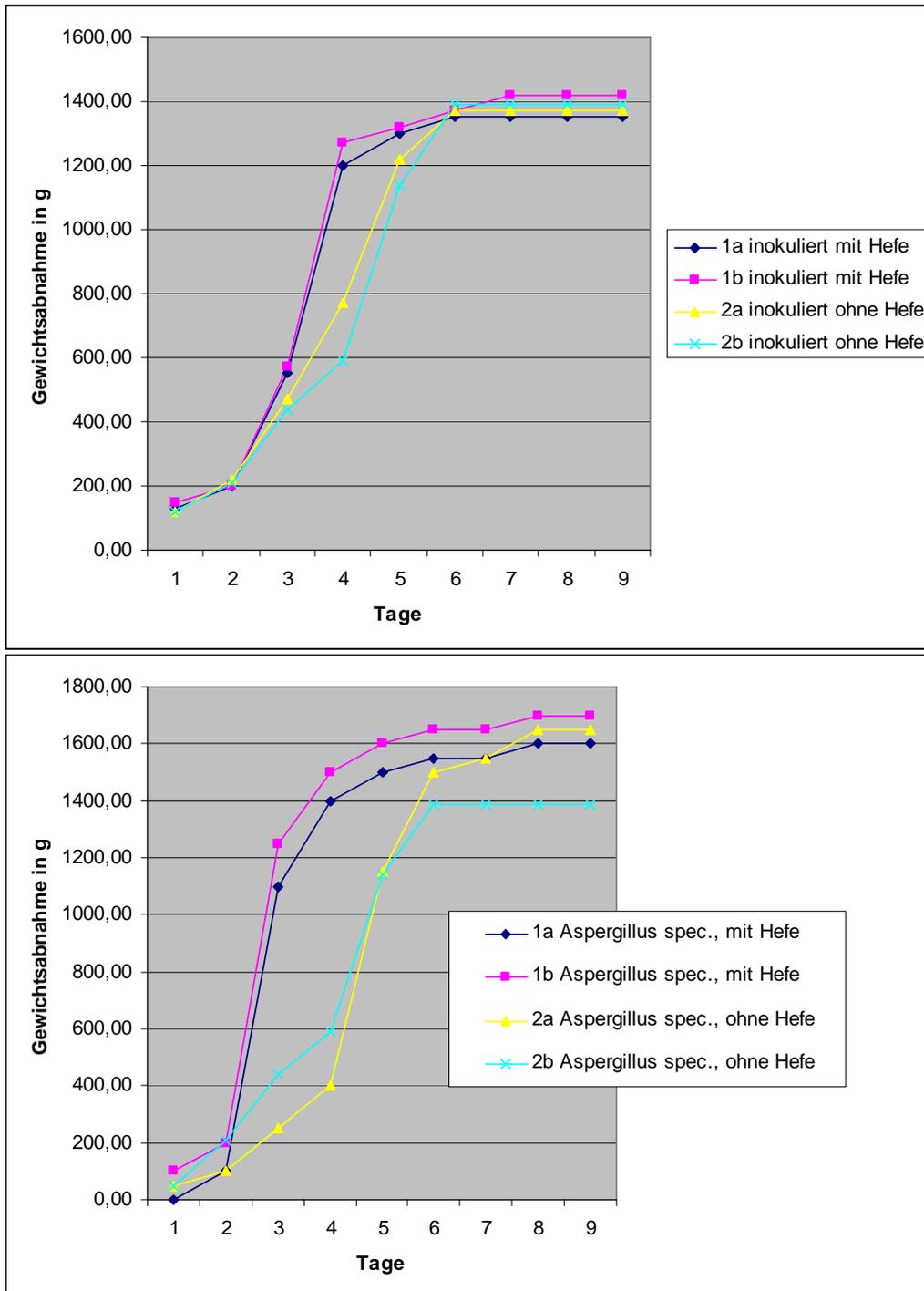


Abbildung 19: Gärverlauf von Maischen (oben: Portugieser, unten Spätburgunder), inokuliert mit Konidien von *Aspergillus spec.*

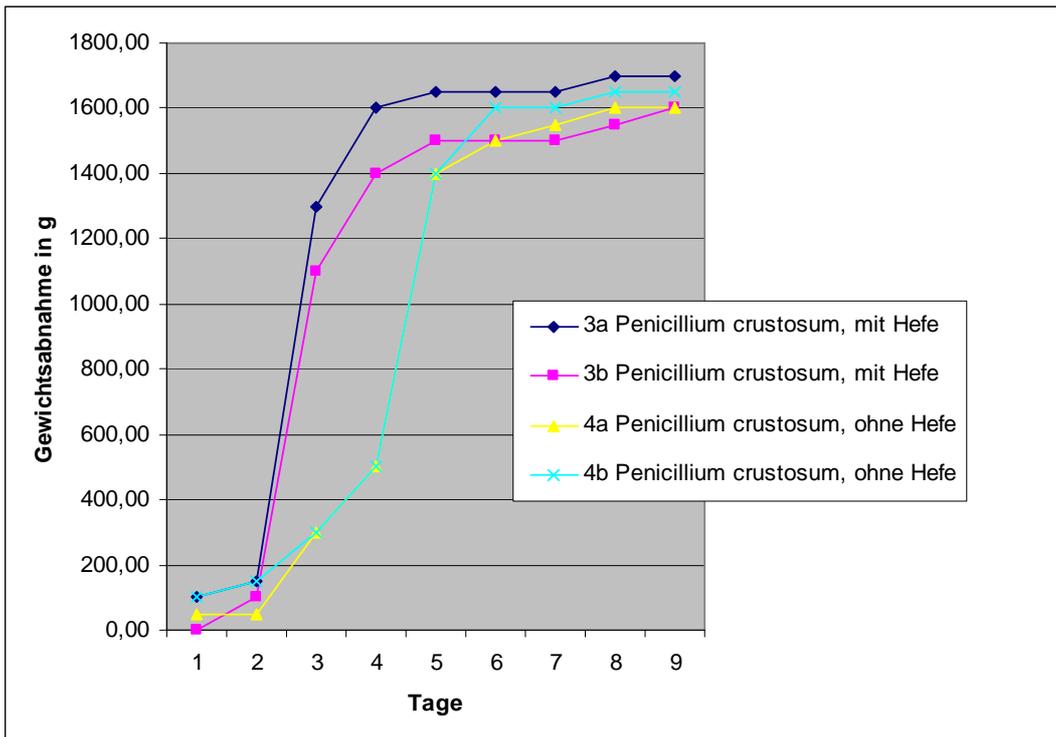


Abbildung 20: Gärverlauf Spätburgunder Maische, inokuliert mit Konidien von *P. crustosum*

In den Tabellen 20 – 22 sind die Ergebnisse der Ochratoxin A-Analysen zusammengefasst. Bei den Varianten mit *Aspergillus*-Inokulation (Portugieser und Spätburgunder) war keinerlei OTA-Bildung feststellbar.

Dagegen konnten unmittelbar nach der Pressung bei allen mit *Penicillium crustosum* beimpften Spätburgunder-Maischen Spuren von Ochratoxin A nachgewiesen werden (s. Tabelle 22). Nach dem Absetzen des Hefetrubes war bei den mit *P. crustosum* infizierten Varianten im Jungwein kein, im Hefetrub Ochratoxin A nur noch bei einer Variante in geringen Mengen nachweisbar. Aus diesen ersten Untersuchungen geht hervor, dass bei einer Maischegärung unter den genannten Bedingungen und je nach vorhandenem Inokulum auf dem Lesegut eine Ochratoxin A-Bildung zumindest in Spuren möglich ist.

Das im Direktablauf und der Pressfraktion nach der Kelterung noch vorhandene OTA war in den Jungweinen nach dreiwöchiger Standzeit nicht mehr messbar, zum Teil jedoch noch im Hefetrub.

**Tabelle 20: OTA-Bildung auf Portugieser-Maische bei Inokulation mit *Aspergillus spec***

Var.	Portugieser, Inokulation mit <i>Aspergillus spec.</i>	OTA-Gehalte µg/l			
		Ausgangsmaische	Pressfraktion, Direktablauf	Jungwein	Hefetrub
1a	Maischefass, mit Hefe	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
1b	Maischefass, mit Hefe	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2a	Maischefass, ohne Hefe	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2b	Maischefass, ohne Hefe	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
3	offener Behälter, ohne Hefe	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

**Tabelle 21: OTA-Bildung auf Spätburgunder-Maische bei Inokulation mit *Aspergillus spec***

Var.	Spätburgunder, Inokulation mit <i>Aspergillus spec.</i>	OTA-Gehalte µg/l			
		Ausgangsmaische	Pressfraktion, Direktablauf	Jungwein	Hefetrub
1a	Maischefass, mit Hefe	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
1b	Maischefass, mit Hefe	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2a	Maischefass, ohne Hefe	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2b	Maischefass, ohne Hefe	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
5	offener Behälter, ohne Hefe	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

**Tabelle 22: OTA-Bildung auf Spätburgunder-Maische bei Inokulation mit *Penicillium crustosum***

Var.	Spätburgunder, Inokulation mit <i>P. crustosum</i>	OTA-Gehalte µg/l			
		Ausgangsmaische	Pressfraktion, Direktablauf	Jungwein	Hefetrub
3a	Maischefass, mit Hefe	n.n.	0,12	n.n.	n.n.
3b	Maischefass, mit Hefe	n.n.	0,09	n.n.	n.n.
4a	Maischefass, ohne Hefe	n.n.	0,07	n.n.	0,01
4b	Maischefass, ohne Hefe	n.n.	0,05	n.n.	0,08
6	offener Behälter, ohne Hefe	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Legende: n.n. nicht nachweisbar

### **3.2 Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit der Ergebnisse, weiterer Forschungsbedarf**

Die erzielten Untersuchungsergebnisse zeigen, dass auch in den deutschen Weinbaugebieten die Voraussetzungen für eine Ochratoxin A-Kontamination gegeben sein können. Inokulum möglicher OTA-Bildner ist den deutschen Weinbaugebieten flächendeckend vorhanden, so dass es vor allem in Jahren mit höheren Temperaturen während der Reifephase der Trauben zur Bildung von Ochratoxin A kommen kann. Daraus ergibt sich ein weiterer Grund, durch anbautechnische Verfahren Fäulnis weitgehend zu vermeiden bzw. stark faules Lese- oder Trauben mit erkennbarem Befall durch Sekundärfäuleerreger wie *Aspergillus spec.* oder *Penicillium spec.* von einer Verwertung auszuschließen.

Die weiterhin erzielten Ergebnisse der Freiland-Infektionsversuche sowie die Untersuchung von Weinen und Traubensäften auf OTA-Gehalte ergaben aber auch, dass im Normalfall unter den Klimabedingungen deutscher Rebstandorte nicht mit höheren OTA-Konzentrationen auf Trauben bzw. in den daraus hergestellten Produkten zu rechnen ist. In keinem Fall konnte Ochratoxin A oberhalb des EU-Grenzwertes von 2µg/kg gemessen werden bzw. waren während des Versuchszeitraumes unter realen Bedingungen die Voraussetzungen für eine Überschreitung dieses Grenzwertes gegeben.

Auch die bisherigen Ergebnisse der Gär- und Schönungsversuche sowie der Versuche zur OTA-Bildung auf Maische legen nahe, dass bei Einhaltung der üblichen Qualitätsstandards in Anbau und Kellerwirtschaft eine Verbrauchergefährdung durch Ochratoxin A-kontaminierte Weine deutscher Herkunft praktisch ausgeschlossen werden kann.

Allerdings muss das Auftreten OTA-bildender Pilzarten an Trauben in den deutschen Anbaugebieten weiterhin überwacht werden.

Weiterer Forschungsbedarf besteht bezüglich des Verhaltens von Ochratoxin A bei Anwendung der verschiedenen, in Deutschland gebräuchlichen kellerwirtschaftlichen Verfahren. Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass im Most vorhandenes Ochratoxin A während der Gärung und durch verschiedene Schönungsmaßnahmen teilweise deutlich reduziert werden kann, was auch in der Literatur in ähnlicher Form bereits beschrieben wurde. Die

erzielten Ergebnisse sind jedoch noch nicht ausreichend abgesichert. Daher müssen vor allem für rote Rebsorten und unter Berücksichtigung weiterer kellerwirtschaftlicher Verfahren bzw. Prozessschritte weitere Versuche durchgeführt werden. Die Literaturangaben hierzu stammen überwiegend aus südlichen Ländern und sind sehr unterschiedlich. Da sie teilweise sehr spezifisch für bestimmte Verfahren, Rebsorten, Hefestämme usw. gelten, können sie nicht ohne weitere Überprüfung auf die in Deutschland angewandten Verfahren zur Weinbereitung übertragen werden. Weitgehende Übereinstimmung besteht in der Literatur bezüglich der Adsorption von Ochratoxin A an Hefezellwände, bei der Quantifizierung der dadurch bewirkten Reduktion von vorhandenem OTA gibt es jedoch unterschiedliche Angaben. Eigene Messungen deuten zumindest an, dass möglicherweise auch ein Metabolisierungsschritt stattfinden könnte. Dies muss jedoch noch weiter untersucht werden.

Näher untersucht werden sollte auch die Rolle verschiedener Penicillien wie z. B. *P. crustosum* und *P. purpurogenum*, die in den nördlichen Weinbaugebieten möglicherweise neben den Aspergillen ebenfalls als Ochratoxin A-Produzenten in Betracht kommen.

## 4 Zusammenfassung

Unter entsprechenden klimatischen Voraussetzungen kann es auch in den deutschen Weinbaugebieten zu Ochratoxin A-Kontaminationen des Lesegutes bzw. der verarbeiteten Produkte kommen. Aus Boden-, teilweise auch aus Rinden- und Traubenproben aller deutschen Weinbauregionen konnten potentielle Ochratoxin A-Bildner isoliert werden. Zu 70 Prozent handelte es sich bei den Isolaten um die Art *Aspergillus niger/awamori*, zu 13 % um *A. tubingensis* und mit ca. 11 Prozent ist *A. wentii* vertreten. Unter Laborbedingungen wurden durch diese *A. tubingensis*-Isolate im Durchschnitt 15,4 µg/l, durch *Aspergillus niger/awamori* 5,7 µg/l und durch *A. wentii* 1 µg/l Ochratoxin A gebildet. Auf Trauben wurde unter Laborbedingungen durch *Aspergillus niger* bis zu 15,5 µg/l OTA gebildet.

Die im mediterranen Raum bezüglich der Fähigkeit zur Bildung von Ochratoxin A bedeutendste Art *Aspergillus carbonarius* konnte in den deutschen Weinbaugebieten nicht gefunden werden.

Infektionsversuche im Labor mit *A. carbonarius* und *A. tubingensis* belegen, dass bei Vorhandensein entsprechender Infektionsbedingungen Traubenbeeren bei nur geringfügigen Verletzungen der Beerenhaut oder sogar über die Narbe infiziert werden können. *A. carbonarius* zeigte sich dabei aggressiver als *A. tubingensis*. Dies wurde durch weitere Infektionsversuche mit verschiedenen *Aspergillus*-Arten an den Rebsorten Riesling, Grau- und Spätburgunder bestätigt. Vor allem *A. niger* infizierte auch augenscheinlich unverletzte Beeren. In den durch diesen Pilz infizierten Beeren konnten OTA-Konzentrationen bis 11 µg/l gemessen werden. Auch im Freiland wurde vor allem durch *A. niger* und *A. tubingensis* an künstlich inokulierten Trauben OTA gebildet (0,02 – 1,27 µg/l).

Die Ergebnisse der Infektionsversuche an fungizidbehandelten Einzelbeeren zeigten, dass von einer Fungizidbehandlung (Botrytizide) keine ausreichende Wirkung zu erwarten ist. In der Praxis wäre eine späte Behandlung gegen Fäuleerreger wegen der einzuhaltenden Wartezeit in der Regel ohnehin nicht möglich. Der höchste Ochratoxin A-Gehalt wurde bei einer mit *Aspergillus niger* infizierten und dem botrytiziden Wirkstoff Boscalid behandelten Variante gefunden.

Die Inkubation infizierter Einzelbeeren bei verschiedenen Lichtverhältnissen (Wechsel hell-dunkel, nur dunkel) ergab bei Kultur von *A. niger* in Dunkelheit eine etwa dreifach höhere OTA-Produktion als bei wechselnden Lichtverhältnissen.

Insgesamt wurden 453 ausgesuchte Wein auf OTA untersucht, davon 315 aus verschiedenen deutschen Weinanbaugebieten. 12 % der Weine waren mit Ochratoxin A kontaminiert, bei den deutschen Weinen waren es 7 %. Von den 388 untersuchten Weinen aus dem Premiumsegment enthielten 41 (11 %) Ochratoxin A im Bereich von 0,02 µg/l bis 0,43 µg/l. Damit wurde in keinem Fall der Grenzwert von 2 µg/l erreicht. Von den 272 deutschen Weinen aus diesem Segment enthielten 18 (6,6 %) Ochratoxin A in der Größenordnung von 0,02 µg/l bis 0,42 µg/l, bei den 65 untersuchten Discounter-Weinen waren bei 13 Weinen (20 %) Spuren von Ochratoxin A in Konzentrationen zwischen 0,03 und 0,15 µg/l nachweisbar, vier davon aus deutschen Anbaugebieten (9,3%).

Bei den durchgeführten Gär und Schönungsversuchen wurde während der Weinbereitung das in Konzentrationen von 2 bzw. 10 µg/l zugesetzte Ochratoxin A allein durch die Gärung um 50- 60 % verringert. Vor allem durch die Zugabe von Aktivkohle aber auch durch Bentonitzusatz zum Wein konnten die OTA-Konzentrationen zum großen Teil bis unter die Nachweisgrenze verringert werden.

Versuche mit inokulierten Maischen ergaben, dass auch bei massiver Inokulation mit *Aspergillus spec.* und einer Maischestandzeit von 9 Tagen kein Ochratoxin A in den Jungweinen nachzuweisen war. Bei einer mit *Penicillium crustosum* infizierten Variante waren dagegen Spuren von Ochratoxin A (max. 0,12 µg/l) zu finden.

Als Quintessenz aller Ergebnisse ist festzustellen, dass zwar potentielle Ochratoxin A-Bildner in den deutschen Weinbaugebieten flächendeckend vorhanden sind, dass es aber unter den herrschenden Klimabedingungen und den üblichen Qualitätsstandards bei Anbau und Keller-technik nur selten zu Ochratoxin A-Kontaminationen von Trauben und Traubenerzeugnissen kommt. Dies wird auch bestätigt durch die in den untersuchten deutschen Weinen gefundenen OTA-Konzentrationen. Von 315 untersuchten Weinen deutscher Herkunft konnte in 22

OTA nachgewiesen werden, bei 15 (rund 70 %) dieser Weine lag die OTA-Konzentration unter 0,1 µg/l und damit weit unterhalb des EU-Grenzwertes von 2 µg/l.

Auch unter Berücksichtigung der Tatsache, dass es sich bei den Weinen um gezielt ausgesuchte Proben mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für eine OTA-Kontamination handelt, ist daher eine Verbrauchergefährdung durch Ochratoxin A-haltige deutsche Wein derzeit auszuschließen.

## 5 Soll-Ist-Vergleich des Vorhabens

Die unter Punkt 1 „Ziele und Aufgabenstellung“ als Arbeitsziele formulierten Fragen konnten fast vollständig beantwortet werden. Teilweise wurde die in der ursprünglichen Projektskizze formulierte Aufgabenstellung noch erweitert, so etwa durch die systematisch angelegte, deutschlandweite Untersuchung von Bodenproben auf potentiell OTA-bildende *Aspergillus*-Arten sowie die epidemiologischen Infektionsversuche an Einzelbeeren. Teilweise waren die Untersuchungsergebnisse aber auch noch nicht völlig befriedigend. Dies betrifft insbesondere alle Bereiche die Witterungseinflüssen unterliegen. So konnten beispielsweise die Freiland-Infektionsversuche im Untersuchungszeitraum nur unter Bedingungen durchgeführt werden, die für eine Infektionsausbreitung an den Trauben weniger günstig waren. Interessant wäre aber eine Untersuchung von Infektionsverläufen und OTA-Bildung während eines sehr warmen Herbstes wie etwa 2006.

Aufgrund der erzielten Ergebnisse wurde die ursprünglich vorgesehene Aufgabenstellung noch um eine orientierende Untersuchung zu kellerwirtschaftlichen Aspekten erweitert. Dazu wurde der Untersuchungszeitraum um ein Jahr verlängert. Untersucht werden sollten die Möglichkeiten einer OTA-Bildung während der Maischegärung sowie der Einfluss von Gärung und Schönungsmaßnahmen auf vorhandene Ochratoxin A-Gehalte. Aufgrund einer teilweise fehlerhaften Probenaufarbeitung konnte leider ein Teil der hierzu angelegten Versuche nicht ausgewertet werden. Die erzielten Ergebnisse bestätigen jedoch teilweise die in der Literatur gefundenen Angaben und geben Anlass für weitere, die speziellen Bedingungen des deutschen Weinbaus berücksichtigende, Untersuchungen. Der Zweck einer orientierenden Untersuchung in diesem Bereich kann daher als erfüllt angesehen werden.

## 6 Literatur

ATOUI, A., MITCHELL, D., MATHIEU, F., MAGAN, N., LEBRIHI, A. (2007): Partitioning of Ochratoxin A in mycelium and conidia of *Aspergillus carbonarius* and the impact on toxin contamination of grapes und wine. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 4, 961-968.

BATTILANI, P. AND PIETRI, A. (2002): Ochratoxin A in grapes and wine. *European Journal of Plant Pathology*. 108 (7), 639-643.

BATTILANI, P., GIORNI, P. AND PIETRI, A. (2003): Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. *European Journal of Plant Pathology*. 109 (7), 715-722.

BATTILANI, P.; MAGAN, N., LOGRIECO, A. (2006): European research on Ochratoxin A in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 111; S. 2-4.

BAYERISCHES LANDESAMT FÜR GESUNDHEIT UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (2004): Ochratoxin A-Belastung in Wein, Traubensaft und –most sowie Weinessig – Untersuchungsergebnisse 2004. [www.lgl.bayern.de](http://www.lgl.bayern.de)

BEJAOU, H.; MATHIEU, F.; TAILLANDIER, P.; LEBRIHI, A. (2004): Ochratoxin A removal in synthetic and natural grapejuices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1038-1044.

BELLI, N.; RAMOS, A.J.; CORONAS, I.; SANCHIS, V., MARIN, S. (2005): *Aspergillus carbonarius* growth and Ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. *Journal of Applied Microbiology*, 98; S. 839-844.

BELLI, N.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. MARIN, S. (2006): Effect of photoperiod and day-night temperatures simulating field conditions on growth and Ochratoxin A production of *aspergillus carbonarius* strains isolated from grapes. *Food Microbiology*, 23; S. 622-627.

DROUILLARD, J-B, SAGE, L., PLADEAU, V., DUBERNET, M. (2003): Ochratoxine A dans les vins. *Phytoma - La Défense des Végétaux*, N° 565, S. 30 – 35

ESTEBAN, A.; ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R., CABANES, F.J. (2006): Study of the effect of water activity and temperature on Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. *Food Microbiology*, 23; S. 634-640.

ESTEBAN, A.; ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R., CABANES, F.J. (2004): Effect of temperature and incubation time on production of Ochratoxin A by black aspergilli. *Res. Microbiol.*, 155; S. 861-866.

EUROPEAN COMMISSION (2002), Reports on tasks for scientific cooperation (SCOOP), task 3.2.7.: Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU member states

FERNANDEZ, A., RATOLA, N., CERDEIRA, A., ALVES, A., VENANCIO, A. (2007): Changes in Ochratoxin A concentration during winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.* 58 (1), 92 - 96.

GEISEN, R. UND SCHMIDT-HEYDT, M. (2009): MycoRed- Mykotoxine reduzieren! Forschungsreport 2, 22-25.

GONZALEZ-SALGADO, A.; PATINO, B.; VAZQUEZ, C., GONZALEZ-JAEN, M.T. (2005): Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section *Nigri* by PCR assays. *FEMS Microbiological Letters*, 245; S. 353-361.

GOTTER, I. (2005): Ochratoxin A: Gesetzliche Höchstwerte ab 2005. *Das Deutsche Weinmagazin* Nr. 20, S. 26 – 29.

JØRGENSEN, K. (2005): Occurrence of Ochratoxin A in commodities and processed food – a review of EU occurrence data. *Food Additives and Contaminants, Supplement 1*, 26 - 30

KLICH, M. (2002): Identification of common *Aspergillus* species. *Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Niederlande*; 116 S.

LALLEMAND (2007): Effective tools for reducing Ochratoxin A. [www.lallemmandwine.com](http://www.lallemmandwine.com)

LEONG, S-L.L, HOCKING, A. D., SCOTT, E. S. (2006): The effect of juice clarification, static or rotary fermentation and fining on Ochratoxin A in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12 (3), 245-251.

MAJERUS, P., OTTENEDER, H., (1996): Nachweis und Vorkommen von Ochratoxin A in Wein und Traubensaft. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 92, 388 – 390

MATEO, E. M., MEDINA, A., MATEO, F., VALLE-ALGARRA, F. M., PARDO, I., JIMENEZ, M. (2010): Ochratoxin A removal in synthetic media by living and heat-inactivated cells of *Oenococcus oeni* isolated from wines. *Food Control* 21, S. 23-28.

MECA, G.; BLAIOTTA, G., RITIENI, A. (2010): Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. *Food Control* 21, S. 579-583.

MEDINA, A.; MATEO, R.; LOPEZ-OCANA, L.; VALLE-ALGARRA, F.M., JIMÉNEZ, M. (2005): Study of Spanish grape mycobiota and Ochratoxin A production by isolates of *aspergillus tubigenis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71; S. 4696-4702.

MEDINA, A., E.M. MATEO, F.M. VALLE-ALGARRA, F. MATEO, R. MATEO, M. JIMÉNEZ (2008): Influence of nitrogen and carbon sources on the production of Ochratoxin A by ochratoxinogenic strains of *Aspergillus* spp. isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 122 (1-2), 93-9.

PERRONE, G., A. SUSCA, G. STEA, G. MULÉ (2004): PCR assay for identification of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus japonicus*. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 641-649.

PERRONE, G., G. MULÈ, A. SUSCA, P. BATTILANI, A. PIETRI, A. LOGRIECO (2006): Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. *Applied Environmental Microbiology*, 72 (1), 680-685.

PERRONE, G., STEA, G., EPIFANI, F., VARGA, J., FRISVAD, J.C., SAMSON, R.A. (2011): *Aspergillus niger* contained the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biology* 115, 1138 - 1150.

SAMSON, R. A., A. HOEKSTRA, J. C. FRISVAD (2004): Introduction to food-and airborne fungi. Seventh edition, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands.

SUSCA, A., G. STEA, G. MULÉ, G. PERRONE (2007): Polymerase chain reaction (PCR) identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on the calmodulin gene. *Food Additives and Contaminants*, 24 (10), 1154-1160.

VARGA, J., KEVEL, E., RINYU, E. TEREN, J., KOZAKIEWICZ, Z. (1996): Ochratoxin Production by *Aspergillus* Species. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, (12), 4461-4464.

VARGA, J., KOZAKIEWICZ, Z. (2006): Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. *Trends in Food Science & Technology* 17, 72-81

VISCONTI, A., G. PERRONE, G. COZZI, M. SOLFRIZZO (2008): Managing Ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 25 (2), 193-202.

WALTER, R. (2008): Untersuchungen zur Grünfäule (*Penicillium spec.*) an Weintrauben. Dissertation, Universität Hohenheim.

WHITE, T. J., T. BRUNS, S. LEE, J. W. TAYLOR (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis, D.H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White.(eds.): *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, 315-322.

WOLFF, J., GAREIS, M., (1999): Ochratoxin A in Lebensmitteln und Belastung des Verbrauchers - Bericht über eine bundesweite Studie. *Forschungsreport* 2, 14 – 18.

ZIMMERLI, B., DICK, R. (1996): Ochratoxin A in table wine an grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 13, No.6, 655 – 668.

## **7 Projektbeteiligung und Danksagung**

Das Forschungsprojekt wurde finanziell unterstützt durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz.

An der Durchführung des Projektes waren die folgenden Mitarbeiter der Abteilung Phyto-  
medizin des DLR Rheinpfalz beteiligt:

Dr. Bernd Altmayer (Projektplanung und -leitung, Berichterstattung), Dr. Ruth Walter (Ver-  
suchsplanung, mykologische Arbeiten, Identifizierung isolierter Arten), Dr. Michael Twertek  
(chemische Analytik) und Susanne Jausel (mykologische Arbeiten, Identifizierung isolierter  
Arten, Versuchsdurchführung)

Für die Finanzierung und die Unterstützung bei der Abwicklung des Projektes gilt dem Bun-  
desministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz sowie der Bundesan-  
stalt für Landwirtschaft und Ernährung mein besonderer Dank.

Allen Projektbeteiligten danke ich für das große Engagement bei der Bewältigung der teil-  
weise sehr schwierigen Aufgaben.

Neustadt an der Weinstraße im Januar 2012

B. Altmayer

## 8 Anhang

### 8.1 PCR-Protokolle

Tabelle 23 a-c: Unspezifische PCR-Reaktionen

a) PCR mit den Primern CL1 und CL2A (Calmodulin-Gen)			
CL1	5`-GA(GA)T(AT)CAAGGAGGCCTTCTC-3`		
CL2A	5`-TTTTTGCATCATGAGTTGGAC-3`		
PCR-Produkt	ca. 760 bp		
Primer	je 40 pmol		
Protokoll	°C	Zeit	Zyklen
	95	4 min.	1
	95	1 min.	35
	56 (mod.)	1 min.	
	72	2 min.	
	72	8 min.	1

b) PCR mit den Primern Bt2a und Bt2b (β-Tubulin-Gen)			
Bt2a	5`-GGTAACCAACTCGGTGCTGCTTTC-3`		
Bt2b	5`-AACCTCAGTGATGACCCCTTGGC-3`		
PCR-Produkt	ca. 495 bp		
Primer	je 10 pmol (mod.)		
Protokoll	°C	Zeit	Zyklen
	94	1 min.	1
	94	1 min.	32
	68	1 min.	
	72	1 min.	
	72	10 sec	1

c) PCR mit den Primern ITS4 und ITS5 (ITS-Region)			
ITS4	5`-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3`		
ITS5	5`-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3`		
PCR-Produkt	ca. 600 bp		
Primer	je 25 pmol		
Protokoll	°C	Zeit	Zyklen
	94	2 min.	1
	95	40 sec.	35
	56	1 min.	
	72	2 min.	
	72	10 min.	1

**Tabelle 24 a-e: Spezifische PCR-Reaktionen**

<b>a) PCR mit den Primern TUB1 und TUB2</b>			
TUB1	5`-TCGACAGCTATTTCCCTT-3`		
TUB2	5`-TAGCATGTCATATCACGGGCAT-3`		
Spezifisch für:	<b><i>A. tubingensis</i></b>		
PCR-Produkt	Ca. 505 bp		
Primer	je 10 pmol (mod.)		
Protokoll	°C	Zeit	Zyklen
	95	5 min.	1
	94	50 sec	40 (mod.)
	60	50 sec	
	72	1 min.	
	72	4 min.	1

<b>b) PCR mit den Primern JAPO1 und JAPO2 (Calmodulin-Gen)</b>			
JAPO1	5`-TTACTGATTCATTTCTCGTGATYCT-3`		
JAPO2	5`-TCAAGCAGGGAATGTGTGGA-3`		
Spezifisch für:	<b><i>A. japonicus</i></b>		
PCR-Produkt	ca. 583 bp		
Primer	je 10 pmol (mod.)		
Protokoll	°C	Zeit	Zyklen
	95	5 min.	1
	94	50 sec	40 (mod.)
	58	50 sec	
	72	1 min.	
	72	7 min.	1

<b>c) PCR mit den Primern NIG1 und NIG2</b>			
NIG1	5`-GATTCGACAGCATT(CT/TC)CAGAA-3`		
NIG2	5`-AAAGTCAATCACAATCCAGCCC-3`		
Spezifisch für:	<b><i>A. niger</i></b>		
PCR-Produkt	ca. 245 bp		
Primer	je 10 pmol (mod.)		
Protokoll	°C	Zeit	Zyklen
	95	5 min.	1
	94	50 sec	40 (mod.)
	60	50 sec	
	72	1 min.	
	72	4 min.	1

d) PCR mit den Primern ITS1 und NIG (ITS-Region)			
ITS1	5`-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3`		
NIG	5`-CCGGAGAGAGGGGACGGC-3`		
Spezifisch für:	<b><i>A. niger</i></b>		
PCR-Produkt	ca. 420 bp		
Primer	je 20 pmol (mod.)		
Protokoll	°C	Zeit	Zyklen
	95	4,5 min.	1
	95	30 sec	25
	66	25 sec	
	72	40 sec	
	72	5 min.	1

e) PCR mit den Primern CARBO1 und CARBO2 (Calmodulin-Gen)			
CARBO1	5`-AAGCGAATCGATAGTCCACAAGAATAC-3`		
CARBO2	5`-TCTGGCAGAAGTTAATATCCGGTT-3`		
Spezifisch für:	<b><i>A. carbonarius</i></b>		
PCR-Produkt	ca. 371 bp		
Primer	je 15 pmol		
Protokoll	°C	Zeit	Zyklen
	95	5min.	1
	94	50s	40 (mod.)
	59 (mod.)	50s	
	72	1min.	
	72	7min.	1

## 8.2 Probenahmeorte und cfu-Werte

Tabelle 25: Kolonie bildende Einheiten (cfu) von *Aspergillus spec.* in Bodenproben

Nr.	Probenahmeort	colony forming units (cfu) je g Trockengewicht (TG) Boden
1	Schweigen	496
2	Schweighofen	0
4	Oberotterbach	1691
5	Niederotterbach	374
7	Minfeld	693
8	Pleisweiler Oberhofen	749
10	Barbelroth	0
11	Mühlhofen	107
13	Klingenmünster	133
14	Eschbach	10
15	Impflingen	544
16	Herxheim	0
17	Birkweiler	0
19	Offenbach/Queich	349
20	Knittelsheim	497
21	Albersweiler-St. Johann	445
22	Godramstein	10
23	Gleisweiler	0
24	Walsheim	0
25	Hochstadt	0
26	Weyher	28
29	Weingarten	0
31	Mechttersheim	253
33	Lachen -Speyerdorf	751
34	Haardt	1201
35	Mußbach	411
36	Edenkoben	2237
37	Altdorf	99
39	Maikammer	251
40	Kirrweiler	8793
41	Königsbach	2060
43	Deidesheim	1148
45	Meckenheim	100
48	Rödersheim	0
49	Wachenheim	661
52	Bad Dürkheim	231
53	Ellerstadt	0
55	Erpolzheim	1087
56	Leistadt	188
57	Kallstadt	358
58	Weisenheim/Berg	92
60	Freinsheim	566
61	Kleinkarlbach	196
62	Gerolsheim	0
63	Asselheim	0
64	Kleinniedesheim	0
65	Bockenheim	291
66	Worms-Horchheim	9
67	Monsheim	0
68	Pfeddersheim	92

<b>Nr.</b>	<b>Probenahmeort</b>	<b>colony forming units (cfu) je g Trockengewicht (TG) Boden</b>
69	Zellertal-Zell	264
71	Flomborn	1139
72	Gundersheim	105
73	Westhofen	88
74	Dautenheim	97
75	Bechtheim	1097
76	Guntersblum	0
77	Volxheim	0
78	Waldböckelheim	0
79	Schornsheim	0
80	Hargesheim	104
81	Nierstein	10
82	Stadecken-Elsheim	206
83	Dromersheim	1.730
84	Bodenheim	0
85	Ingelheim	294
86	Assmannshausen	0
87	Hattenheim	619
88	Kaub	206
89	Lorch	938
90	Altenahr	0
91	Ahrweiler	104
92	Dernau	0
93	Baccharach	285
94	Boppard	0
95	Moselweiß	99
96	Koborn-Gondorf	0
97	Niederfell	0
98	Hatzenport	1.491
99	Müden	284
100	Klotten	243
101	Ellenz-Poltersdorf	0
102	Ediger-Eller	0
103	Bullay	110
104	Burg	0
105	Wolf	0
106	Zeltingen	90
107	Bernkastel	98
108	Brauneberg	739
109	Piesport	399
110	Trittenheim	192
111	Klüsserath	2.472
112	Mehring	402
113	Schweich	7.300
114	Kasel	743
115	Krettnach	1.569
116	Filzen	90
117	Wellen	0
118	Palzem	0
119	Perl	0
120	Serrig	0
121	Ockfen	569
122	Alsbach	0
123	Bensheim-Auerbach	0
124	Heppenheim	0

<b>Nr.</b>	<b>Probenahmeort</b>	<b>colony forming units (cfu) je g Trockengewicht (TG) Boden</b>
125	Weinheim-Hohensachsen	0
126	Dossenheim	1.749
127	Leimen	1.684
128	Rauenberg	806
129	Malsch	0
130	Heidelsheim	869
131	Unter/Obergrombach	90
132	Weingarten	957
133	Oberderdingen	560
134	Sulzfeld	186
135	Sinsheim-Weiler	38
136	Neckarsulm	18
137	Weinsberg	405
138	Bretzfeld	575
139	Obersulm-Affaltrach	1.706
140	Löwenstein	1.457
141	Obergruppenbach	646
142	Ilsfeld	397
143	Großbottwar	118
144	Ludwigsburg (Hoheneck)	187
145	Markgröningen	90
146	Metterzimmern	98
147	Hohenhaslach	90
148	Besigheim	100
149	Mundelsheim	455
150	Cleebronn	650
151	Lauffen	709
152	Castell	0
153	Rödelsee	631
154	Iphofen	101
155	Volkach	110
156	Nordheim	104
157	Sommerach	0
158	Sulzfeld	2.071
159	Frickenhausen	199
160	Sommerhausen	193
161	Randersacker	837
162	Würzburg	317
163	Veitshöchheim	104
164	Thüngersheim	896
165	Karlstadt (Stetten)	110
166	Bürgstadt	220
167	Großheubach	102
168	Klingenberg	0
169	Sinzheim	0
170	Bühl (Kappelwindeck)	2.395
171	Kappelrodeck	116
172	Oberkirch (Wolfhag)	0
173	Durbach	0
174	Ortenberg	0
175	Gengenbach	0
176	Lahr	5.435
177	Kippenheim	9
178	Herbolzheim	9
179	Malterdingen	0

<b>Nr.</b>	<b>Probenahmeort</b>	<b>colony forming units (cfu) je g Trockengewicht (TG Boden)</b>
180	Sexau	0
181	Glottertal	0
182	Sasbach	0
183	Ihringen	505
184	Eichstetten	192
185	Merdingen	0
186	Merzhausen	1.017
187	Staufen im Breisgau	368
188	Oberweiler	105
189	Schliengen	194
190	Efringen-Kirchen	406
191	Bodman	202
192	Hödingen	0
193	Meersburg	0
194	Wangen	0
195	Freyburg	0
196	Freyburg	0
197	Freyburg	0

### 8.3 OTA-bildende *Aspergillus*-Isolate

Tabelle 26: OTA-bildende *Aspergillus*-Isolate von verschiedenen Standorten

Isolat	Standort	Isolate		µg OTA/l	<i>Aspergillus</i> -Art
		ges.	OTA		
8550	Schweigen	10	3	<b>57,33</b>	<i>A. tubingensis</i>
8551				3,05	<i>A. tubingensis</i>
8557				42,55	<i>A. tubingensis</i>
8561	Oberrotterbach	10	3	23,63	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8562				28,50	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8568				20,72	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8575	Niederrotterbach	8	1	0,11	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8578	Minfeld	9	7	11,84	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8580				17,51	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8581				9,97	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8582				33,12	<i>A. tubingensis</i>
8583				17,49	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8584				<b>58,56</b>	<i>A. tubingensis</i>
8585				23,95	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8589	Pleisweiler-Oberhofen	10	2	1,17	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8596				13,96	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8601	Klingenmünster	5	1	0,05	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8613	Knittelsheim	5	1	4,57	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8615	Godramstein	2	1	11,26	<i>A. tubingensis</i>
8618	Hochstadt	1	1	0,22	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8619	Weyher	2	1	0,64	<i>A. tubingensis</i>
8621	Weingarten	1	1	0,44	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8623	Meckersheim	3	1	20,37	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8625	Lachen-Speyerdorf	7	3	17,70	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8628				0,07	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8631				<b>62,78</b>	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8633	Haardt	8	5	17,03	<i>A. tubingensis</i>
8634				14,05	<i>A. tubingensis</i>
8637				4,11	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8638				1,12	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8639				0,61	<i>A. terreus</i>
8640	Mußbach	4	1	0,19	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8646	Edenkoben	8	4	1,18	<i>A. wentii</i>
8647				0,12	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8649				0,10	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8650				2,83	<i>A. wentii</i>
8654	Maikammer	5	3	0,35	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8655				0,25	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8656				0,08	<i>A. niger/ A. awamori</i>

Isolat	Standort	Isolate		µg OTA/l	Aspergillus-Art
		ges.	OTA		
8660	Kirrweiler	37	16	0,25	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8663				0,14	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8664				0,14	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8667				0,24	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8669				0,32	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8671				0,33	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8672				0,16	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8673				0,40	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8677				0,12	<i>A. japonicus</i>
8680				0,28	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8681				0,16	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8683				0,15	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8684				0,03	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8687				0,04	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8691				0,05	<i>A. japonicus</i>
8693				0,30	<i>A. japonicus</i>
8708	Wachenheim	8	2	1,64	<i>A. wentii</i>
8709				2,45	<i>A. wentii</i>
8716	Bad Dürkheim	4	2	0,56	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8717				0,93	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8721	Erpolzheim	7	4	0,67	<i>A. wentii</i>
8722				0,43	<i>A. wentii</i>
8726				0,45	<i>A. wentii</i>
8727				0,68	<i>A. wentii</i>
8728	Leistadt	5	5	4,75	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8729				0,11	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8730				0,33	<i>A. wentii</i>
8731				0,61	<i>A. wentii</i>
8732				3,30	<i>A. wentii</i>
8733	Kallstadt	1	1	14,72	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8734	Weisenheim/Berg	1	1	1,29	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8737	Freinsheim	9	2	0,03	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8738				0,03	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8750	Bockenheim	3	1	0,31	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8751	Pfeddersheim	1	1	2,82	<i>A. ustus</i>
8752	Zellertal Zell	3	3	1,04	<i>A. wentii</i>
8753				2,93	<i>A. wentii</i>
8754				1,21	<i>A. wentii</i>
8763	Dautenheim	2	2	0,55	<i>A. wentii</i>
8764				0,83	<i>A. wentii</i>
8765	Bechtheim	7	5	0,34	<i>A. wentii</i>
8766				0,27	<i>A. wentii</i>
8768				0,22	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8769				0,17	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8771				0,14	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8861	Hagersheim	1	1	0,36	<i>A. wentii</i>

Isolat	Standort	Isolate		µg OTA/l	Aspergillus-Art
		ges.	OTA		
8867	Dromersheim	10	5	0,20	<i>A. wentii</i>
8868				0,30	<i>A. wentii</i>
8870				0,41	<i>A. wentii</i>
8871				0,37	<i>A. wentii</i>
8874				0,67	<i>A. tubingensis</i>
8881	Hattenheim	8	6	0,39	<i>A. tubingensis</i>
8882				0,16	<i>A. tubingensis</i>
8883				0,18	<i>A. tubingensis</i>
8884				0,28	<i>A. tubingensis</i>
8885				0,23	<i>A. tubingensis</i>
8886				1,03	<i>A. wentii</i>
8888	Lorch	10	5	0,13	<i>A. tubingensis</i>
8889				0,28	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8890				0,28	<i>A. tubingensis</i>
8891				0,16	<i>A. tubingensis</i>
8892				0,23	<i>A. tubingensis</i>
8898	Baccharach	3	3	8,49	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8899				2,08	<i>A. tubingensis</i>
8901				4,13	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8905	Hatzenport	10	5	1,38	<i>A. tubingensis</i>
8906				0,18	<i>A. japonicus</i>
8907				0,82	<i>A. tubingensis</i>
8909				6,15	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8911				0,19	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8914	Müden	4	1	4,22	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8918	Klotten	5	1	2,18	<i>A. tubingensis</i>
8922	Bullay	2	2	4,03	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8923				1,64	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8924	Zeltingen	1	1	9,39	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8925	Bernkastel	3	2	3,01	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8926				12,05	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8929	Brauneberg	10	8	12,88	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8930				5,40	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8931				2,74	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8932				4,30	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8933				0,26	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8934				1,05	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8936				0,97	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8937				5,02	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8939				Piesport	10
8945	0,38	<i>A. niger/ A. awamori</i>			
8947	2,64	<i>A. niger/ A. awamori</i>			

Isolat	Standort	Isolate		µg OTA/l	Aspergillus-Art
		ges.	OTA		
8949	Trittenheim	10	6	5,32	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8950				8,86	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8952				1,34	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8953				2,14	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8954				5,11	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8955				5,74	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8962	Klüsserath	10	3	0,54	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8965				0,24	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8966				0,44	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8971	Mehring	10	4	1,25	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8974				0,21	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8975				0,29	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8977				3,22	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8978	Schweich	10	6	0,80	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8979				0,64	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8980				0,58	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8981				0,44	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8982				0,71	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8984				0,29	<i>A. japonicus</i>
8988	Kasel	10	2	2,66	<i>A. niger/ A. awamori</i>
8996				1,44	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9001	Krettnach	10	1	0,71	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9008	Filzen	1	1	<b>56,63</b>	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9016	Dossenheim	10	4	3,77	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9017				0,56	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9018				0,41	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9023				0,55	<i>A. japonicus</i>
9032	Leimen	9	2	<b>78,18</b>	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9035				0,97	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9039	Rauenberg	8	1	6,47	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9052	Heidelsheim	9	5	0,41	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9053				0,48	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9056				0,66	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9059				0,10	<i>A. japonicus</i>
9060				0,33	<i>A. tubingensis</i>
9062	Unter/Obergrombach	10	10	1,53	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9063				1,05	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9064				1,50	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9065				1,59	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9066				2,05	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9067				2,12	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9068				1,44	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9069				2,13	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9070				2,13	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9071				0,89	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9072	Weingarten	10	1	2,25	<i>A. niger/ A. awamori</i>

Isolat	Standort	Isolate		µg OTA/l	Aspergillus-Art
		ges.	OTA		
9124	Obersulm-Affaltrach	10	5	0,90	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9126				0,50	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9127				1,03	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9128				1,18	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9130				0,65	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9135	Löwenstein	10	3	13,34	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9137				4,35	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9139				16,39	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9154	Ilsfeld	2	2	2,97	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9155				1,72	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9157	Großbottwar	2	1	2,20	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9158	Ludwigsburg(Hohenecken)	2	2	31,38	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9159				3,41	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9160	Markgröningen	1	1	2,70	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9167	Mundelsheim	5	1	2,95	<i>A. versicolor</i>
9171	Cleebronn	7	1	1,55	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9178	Lauffen	8	1	3,15	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9273	Rödelsee	7	1	10,26	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9290	Sulzfeld	9	5	7,40	<i>A. tubingensis</i>
9291				4,38	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9292				<b>114,32</b>	<i>A. tubingensis</i>
9293				3,44	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9294				8,84	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9297	Frickenhausen	3	1	2,05	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9323	Bürgstadt	4	3	5,40	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9325				4,73	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9326				7,60	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9327	Großheubach	1	1	1,85	<i>A. fumigatus</i>
9352	Kippenheim	1	1	3,03	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9353	Herbolzheim	1	1	2,21	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9355	Ihringen	10	2	0,22	<i>A. japonicus</i>
9357				<b>63,49</b>	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9364	Eichstetten	2	1	12,46	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9367	Merzhausen	9	2	47,90	<i>A. tubingensis</i>
9370				4,10	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9380	Schliengen	4	1	1,89	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9388	Bodman	2	2	10,42	<i>A. niger/ A. awamori</i>
9389				2,16	<i>A. niger/ A. awamori</i>

## 8.4 Boniturergebnisse Infektionsversuche Einzelbeeren

Tabelle 27: Infektionsversuche an Einzelbeeren, Spätburgunder

Spätburgunder, Hundertmorgen, 103 °Oe, Versuchsansatz: 24.09.09															
Datum der Bonitur:			28.09.09		01.10.09		06.10.09		12.10.09		16.10.09		20.10.09		OTA µg/l
% Befallshäufigkeit,- stärke:			BH	BS	BH	BS									
<i>A. carbonarius</i>	8310	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	2	n.n.
<i>A. carbonarius</i>	8310	mV	100	10	100	14	100	53	100	87	100	100	100	100	n.n.
<i>A. carbonarius</i>	8311	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	n.n.
<i>A. carbonarius</i>	8311	mV	90	1	100	3	100	4	100	10	100	15	100	34	n.n.
<i>A. awamori</i>	8314	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2	n.n.
<i>A. awamori</i>	8314	mV	100	1	100	3	100	63	100	85	100	91	100	94	n.n.
<i>A. awamori</i>	8314	oV	95	7	0	0	0	0	0	0	0	0	10	4	n.n.
<i>A. awamori</i>	8314	mV	65	3	100	20	100	85	100	97	100	100	100	100	n.n.
<i>A. niger</i>	8317	oV	0	0	0	0	0	0	10	1	10	5	30	15	10,91
<i>A. niger</i>	8317	mV	95	7	100	19	100	49	100	97	100	100	100	100	7,46
<i>A. niger</i>	8318	oV	0	0	0	0	15	1	15	7	15	15	35	20	10,00
<i>A. niger</i>	8318	mV	65	3	95	12	75	17	100	84	100	100	100	100	n.n.
<i>A. tubingensis</i>	8307	oV	0	0	0	0	5	1	20	5	20	13	50	24	n.n.
<i>A. tubingensis</i>	8307	mV	100	4	100	10	100	49	100	87	100	100	100	100	n.n.
<i>A. tubingensis</i>	8308	oV	0	0	0	0	0	0	10	3	10	6	20	10	n.n.
<i>A. tubingensis</i>	8308	mV	80	4	100	7	100	21	100	72	100	95	100	100	n.n.
<i>A. japonicus</i>	8312	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
<i>A. japonicus</i>	8312	mV	85	1	100	4	100	6	100	9	100	14	100	22	n.n.
<i>A. japonicus</i>	8313	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
<i>A. japonicus</i>	8313	mV	90	3	100	7	100	11	100	20	100	39	100	58	n.n.
<i>A. wentii</i>	3701	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
<i>A. wentii</i>	3701	mV	75	3	100	5	100	7	100	8	100	9	100	10	n.b.
<i>A. wentii</i>	8650	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
<i>A. wentii</i>	8650	mV	85	3	90	4	90	7	90	8	90	8	90	8	n.b.
Kontrolle	Dest.	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
Kontrolle	Dest.	mV	0	0	0	0	15	9	15	9	30	16	30	17	n.b.

Legende: oV ohne Verletzung, mV mit Verletzung, BH Befallshäufigkeit, BS Befallsstärke, n.n. nicht nachweisbar, n.b. nicht bestimmt

**Tabelle 28: Infektionsversuche an Einzelbeeren, Grauburgunder**

Grauburgunder, Schlittweg, 105 °Oe, Versuchsansatz: 24.09.09													
Datum der Bonitur:			28.09.09		01.10.09		06.10.09		12.10.09		20.10.09		OTA µg/l
% Befallshäufigkeit,- stärke:			BH	BS	BH	BS	BH	BS	BH	BS	BH	BS	
<i>A. carbonarius</i>	8310	oV	0	0	5	0	5	0	5	1	5	1	n.n.
<i>A. carbonarius</i>	8310	mV	100	32	100	84	100	98	100	100	100	100	2,90
<i>A. carbonarius</i>	8311	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
<i>A. carbonarius</i>	8311	mV	100	4	100	7	100	9	100	9	100	11	n.b.
<i>A. awamori</i>	8314	oV	0	0	0	0	5	0	10	2	10	6	n.n.
<i>A. awamori</i>	8314	mV	75	4	100	10	100	15	100	43	100	62	n.n.
<i>A. awamori</i>	8314	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.n.
<i>A. awamori</i>	8314	mV	100	9	100	24	100	58	100	96	100	96	0,56
<i>A. niger</i>	8317	oV	0	0	0	0	10	1	35	7	40	10	0,35
<i>A. niger</i>	8317	mV	90	20	90	45	95	87	95	91	100	92	1,30
<i>A. niger</i>	8318	oV	0	0	0	0	10	1	15	7	55	22	n.n.
<i>A. niger</i>	8318	mV	90	9	90	22	100	70	100	90	100	91	n.n.
<i>A. tubingensis</i>	8307	oV	0	0	5	1	50	9	55	15	55	26	n.n.
<i>A. tubingensis</i>	8307	mV	90	4	100	11	100	30	100	60	100	83	n.n.
<i>A. tubingensis</i>	8308	oV	0	0	0	0	0	0	20	3	20	6	n.n.
<i>A. tubingensis</i>	8308	mV	100	5	100	11	100	49	100	79	100	94	n.n.
<i>A. japonicus</i>	8312	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.n.
<i>A. japonicus</i>	8312	mV	100	2	100	2	100	6	100	11	100	16	n.n.
<i>A. japonicus</i>	8313	oV	0	0	5	1	5	1	5	1	5	1	n.b.
<i>A. japonicus</i>	8313	mV	100	11	100	22	100	43	100	60	100	60	0,40
<i>A. wentii</i>	3701	oV	0	0	0	0	0	0	5	0	15	3	n.b.
<i>A. wentii</i>	3701	mV	90	3	95	5	95	7	95	9	95	10	n.b.
<i>A. wentii</i>	8650	oV	0	0	0	0	10	1	40	12	65	26	n.b.
<i>A. wentii</i>	8650	mV	80	3	80	4	80	4	80	4	85	7	n.b.
Kontrolle	Dest.	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
Kontrolle	Dest.	mV	0	0	0	0	15	3	15	6	30	14	n.b.

Legende: oV ohne Verletzung, mV mit Verletzung, BH Befallshäufigkeit, BS Befallsstärke, n.n. nicht nachweisbar, n.b. nicht bestimmt

**Tabelle 29: Infektionsversuche an Einzelbeeren, Riesling**

Riesling, Schlittweg, 72 °Oe, Versuchsansatz: 10.09.09															
Datum der Bonitur:			14.09.09		18.09.09		24.09.09		28.09.09		01.10.09		06.10.09		OTA µg/l
% Befallshäufigkeit,- stärke:			BH	BS	BH	BS	BH	BS	BH	BS	BH	BS	BH	BS	
<i>A. carbonarius</i>	8310	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
<i>A. carbonarius</i>	8310	mV	100	32	100	62	100	63	100	69	100	74	100	79	n.n.
<i>A. carbonarius</i>	8311	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
<i>A. carbonarius</i>	8311	mV	100	2	100	5	100	5	100	5	100	5	100	6	n.n.
<i>A. awamori</i>	8314	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
<i>A. awamori</i>	8314	mV	85	3	100	34	100	48	100	78	100	93	100	95	n.n.
<i>A. awamori</i>	8314	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
<i>A. awamori</i>	8314	mV	95	14	100	83	100	87	100	93	100	94	100	100	n.n.
<i>A. niger</i>	8317	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
<i>A. niger</i>	8317	mV	100	18	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0,64
<i>A. niger</i>	8318	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
<i>A. niger</i>	8318	mV	100	16	100	94	100	100	100	100	100	100	100	100	n.n.
<i>A. tubingensis</i>	8307	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
<i>A. tubingensis</i>	8307	mV	95	6	100	42	100	52	100	80	100	97	100	100	n.n.
<i>A. tubingensis</i>	8308	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
<i>A. tubingensis</i>	8308	mV	90	4	100	7	100	14	100	39	100	60	100	92	n.n.
<i>A. japonicus</i>	8312	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
<i>A. japonicus</i>	8312	mV	80	2	100	4	100	5	100	5	100	6	100	6	n.n.
<i>A. japonicus</i>	8313	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
<i>A. japonicus</i>	8313	mV	100	9	100	37	100	39	100	40	100	40	100	40	n.n.
<i>A. wentii</i>	3701	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
<i>A. wentii</i>	3701	mV	95	4	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5	n.n.
<i>A. wentii</i>	8650	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
<i>A. wentii</i>	8650	mV	100	5	100	6	100	10	100	10	100	10	100	11	n.n.
Kontrolle	Dest.	oV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
Kontrolle	Dest.	mV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.

Legende: oV ohne Verletzung, mV mit Verletzung, BH Befallshäufigkeit, BS Befallsstärke, n.n. nicht nachweisbar, n.b. nicht bestimmt

**Tabelle 30: Infektionsversuche an Einzelbeeren mit Fungizidbehandlung**

Riesling, Schlittweg, 72 °Oe, Versuchsansatz 11.09.09														
Datum der Bonitur:		15.09.09		18.09.09		24.09.09		28.09.09		02.10.09		06.10.09		OTA µg/l
% Befallshäufigkeit,- stärke:		BH	BS	BH	BS	BH	BS	BH	BS	BH	BS	BH	BS	
<i>A. awamori 8314</i>	Cantus	10	0,3	95	7,1	95	20,6	95	39,3	100	55,3	100	76,5	n.n.
<i>A. awamori 8314</i>	Melody Combi	0	0	25	1,9	85	5,9	100	27,1	100	49,3	100	76	n.n.
<i>A. awamori 8314</i>	Scala	0	0	0	0	35	2	95	9,5	100	17,2	100	36,6	n.n.
<i>A. awamori 8314</i>	Switch	0	0	5	0,1	65	2,3	100	14,2	100	40,5	100	83,5	n.n.
<i>A. awamori 8314</i>	Teldor	80	3,4	100	52,1	100	80,8	100	93,3	100	95,3	100	95,3	n.n.
<i>A. awamori 8314</i>	Kontr.	5	0,1	75	10,3	75	23,8	100	52,8	100	62,9	100	75,9	n.n.
<i>A. niger 8318</i>	Cantus	0	0	95	20	100	53,6	100	88,6	100	94,3	100	95,3	9,00
<i>A. niger 8318</i>	Melody Combi	0	0	60	17,9	85	35,1	90	71,3	100	83,1	100	85,6	1,44
<i>A. niger 8318</i>	Scala	0	0	40	0,6	95	6,5	100	40,8	100	79	100	100	0,50
<i>A. niger 8318</i>	Switch	0	0	0	0	95	5,4	100	55,1	100	90,6	100	95,1	n.n.
<i>A. niger 8318</i>	Teldor	95	6,5	100	96	100	100	100	100	100	100	100	100	2,13
<i>A. niger 8318</i>	Kontr.	30	0,9	95	47,5	100	87,8	100	99	100	100	100	100	7,75
Kontrolle Bidest	Cantus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
Kontrolle Bidest	Melody Combi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
Kontrolle Bidest	Scala	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
Kontrolle Bidest	Switch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
Kontrolle Bidest	Teldor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.
Kontrolle Bidest	Kontr.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.b.

Legende: oV ohne Verletzung, mV mit Verletzung, BH Befallshäufigkeit, BS Befallsstärke, n.n. nicht nachweisbar, n.b. nicht bestimmt